

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
DISTÚRBIOS DA COMUNICAÇÃO HUMANA**

**ASSOCIAÇÃO ENTRE AUDIÇÃO, TABAGISMO
E GENOTOXICIDADE EM ADULTOS JOVENS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Andressa Boer Fronza

**Santa Maria, RS, Brasil
2010**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ASSOCIAÇÃO ENTRE AUDIÇÃO, TABAGISMO E GENOTOXICIDADE EM ADULTOS JOVENS

por

Andressa Boer Fronza

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Distúrbios da Comunicação Humana, Área de Concentração Audição e Linguagem, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM/RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Distúrbios da Comunicação Humana**

Orientador: Aron Ferreira da Silveira, Prof. Dr.
Coorientadora: Ivana Beatrice Manica da Cruz, Prof^a. Dr^a.
Coautora: Tania Tochetto, Prof^a. Dr^a.

Santa Maria, RS, Brasil
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

F936a Fronza, Andressa Boer
Associação entre audição, tabagismo e genotoxicidade em adultos
jovens . / Andressa Boer Fronza – Santa Maria , 2010.

120 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Distúrbios
da Comunicação Humana – Universidade Federal de Santa Maria, 2010.

“Orientação: Prof. Dr. Aron Ferreira da Silveira”.

“Coorientação: Prof^a. Dr^a. Ivana Beatrice Manica da Cruz”.

Inclui anexos.

1. Audição. 2. Tabagismo. 3. Genotoxicidade. I. Silveira, Aron Ferreira
da. II. Cruz, Ivana Beatrice Manica da. III. Título.

CDU: 612.85-053.8(043.3)

Bibliotecária Responsável: Lizandra Veleza Arabidian CRB/10-1492

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em
Distúrbios da Comunicação Humana**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**ASSOCIAÇÃO ENTRE AUDIÇÃO, TABAGISMO
E GENOTOXICIDADE EM ADULTOS JOVENS**

Elaborada por
Andressa Boer Fronza

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Distúrbios da Comunicação Humana

COMISSÃO EXAMINADORA:

Aron Ferreira da Silveira, Prof. Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Adriane Ribeiro Teixeira, Prof^a. Dr^a. (UFRGS)
(Membro)

Tania Tochetto, Prof^a. Dr^a. (UFSM)
(Membro/Coautora)

Santa Maria, 02 de março de 2010.

DEDICATÓRIA

**Aos meus pais, GENTIL e MARIA CLAUDETE,
por sempre mostrarem o caminho correto.
Exemplos de vida e dedicação.**

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Aron Ferreira da Silveira, por todos os ensinamentos transmitidos durante a orientação no curso de mestrado. Pela simplicidade, prontidão e dedicação em todo o percurso.

À Prof^a. Dr^a. Ivana Beatrice Manica da Cruz, por ser um exemplo de pesquisadora e ensinar o caminho para tornar-me uma. Por todas as orientações, auxílios estatísticos e por sua forma simples de ensinar a biologia molecular.

À Prof^a. Dr^a. Tânia Tochetto, pelas valiosas orientações e sugestões durante a execução da pesquisa e no momento de dissertar. Pelo empenho em me auxiliar e por sempre querer contribuir mais com a audiologia, fazendo com que desenvolvêssemos um excelente trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Adriane Ribeiro Teixeira, por ser membro da banca examinadora desta dissertação, com valiosas sugestões e comentários estimulantes, que me gratificaram por ter realizado esta pesquisa.

À grande amiga e colega Daniele Coronel Mena Barreto, pelo modelo de profissional e principalmente pelo companheirismo para executarmos a

pesquisa. Pelos ensinamentos compartilhados, pela paciência comigo. Por tornar o curso de mestrado um momento divertido de nossas vidas.

À Farmacêutica Taís Algarve, pela coleta de sangue dos voluntários da pesquisa e ensinamento da execução dos testes de genotoxicidade.

À Greice dos Santos, Maria Fernanda Cattani, Michel Mansur e todos os bolsistas de iniciação científica do Laboratório de Biogenômica, pelos auxílios e pela prontidão em dirimir dúvidas.

Aos voluntários participantes da pesquisa, pela disponibilidade e interesse em realizar as avaliações.

Ao Prof. José Henrique, pelo auxílio no tratamento estatístico dos dados da pesquisa.

À Angela Moro, Angélica Boer Fronza e Konrad Felix Laufs, pelo auxílio na tradução dos resumos e artigo.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Distúrbios da Comunicação Humana da UFSM.

À Universidade Federal de Santa Maria, por ter propiciado o curso de mestrado com excelente infra-estrutura e conceito.

Às irmãs que eu escolhi, Daniele Coronel Mena Barreto, Larissa Lautenschlager, Sheila Cadore, Bruna Machado Correa, Michele Moro, Angela Moro e Luciane Pacheco. Por tornarem os dias mais alegres. Pela amizade.

Aos amigos, familiares e todos que contribuíram de alguma forma para a realização desta pesquisa.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais, Gentil Fronza e Maria Claudete Boer Fronza, por me incentivarem, serem minha base, estarem sempre presentes e confiarem em mim.

À minha irmã, Angélica Boer Fronza, e ao meu irmão, Felipe Boer Fronza, pelo apoio, compreensão e amizade fraterna constante.

Ao meu namorado, Tiago Petry, pelo incentivo, auxílio e conforto durante o curso de mestrado, como Fonoaudiólogo, como Amigo, como meu AMOR. Por ser alegria e essência em minha vida.

Muito obrigada por me fazerem FELIZ!

*“Se você quiser encontrar paz e alegria neste mundo,
espalhe em torno de si otimismo e bondade.
Não se deixe ficar inativo na comodidade que nada produz.
É pelo trabalho em benefício do próximo que
armazenamos energias, a fim de vencer os embates da vida.
Não pare jamais, não perca as oportunidades
que se apresentam diariamente de fazer o bem,
para que o bem venha abundante sobre você”.*

- Carlos Torres Pastorino -

LISTA DE FIGURAS

MATERIAL E MÉTODO

- FIGURA 01 – Classificação do Dano ao DNA dos indivíduos analisados. Quanto maior o nível de dano maior o número a ele atribuído. Classe 0 representa células sem dano e classe 4 o mais alto dano..... 46
- FIGURA 02 – Teste dos Micronúcleos dos indivíduos analisados: (A) Célula sem micronúcleos; (B) Células com um ou mais micronúcleos; (C) Célula binucleada..... 47

ARTIGO DE PESQUISA: RELAÇÃO DO TABAGISMO COM A AUDIÇÃO E AÇÃO GENOTÓXICA EM ADULTOS JOVENS

- FIGURA 01 – Classificação do Dano ao DNA dos indivíduos analisados. Quanto maior o nível de dano maior o número a ele atribuído. Classe 0 representa células sem dano e classe 4 o mais alto dano..... 56
- FIGURA 02 – Teste dos Micronúcleos dos indivíduos analisados: (A) Célula sem micronúcleos; (B) Células com um ou mais micronúcleos; (C) Célula binucleada..... 57
- FIGURA 03 – Distribuição do grupo dos tabagistas quanto ao tempo de adesão ao tabaco..... 59
- FIGURA 04 – Distribuição do grupo dos tabagistas quanto à quantidade diária de cigarros..... 60
- FIGURA 05 – Limiares auditivos de tabagistas e não tabagistas..... 61
- FIGURA 06 – Amplitude das emissões otoacústicas evocadas produto de distorção de tabagistas e não tabagistas, segundo o gênero, a frequência e o lado da orelha..... 63
- FIGURA 07 – Índice médio de dano ao DNA por Ensaio Cometa entre tabagistas e não tabagistas..... 64

ARTIGO DE PESQUISA: ASSOCIAÇÃO ENTRE FUNÇÕES DA VIA AUDITIVA EFERENTE E GENOTOXICIDADE EM ADULTOS JOVENS

FIGURA 01	- Classificação do Dano ao DNA dos indivíduos analisados. Quanto maior o nível de dano maior o número a ele atribuído. Classe 0 representa células sem dano e classe 4 o mais alto dano.....	81
FIGURA 02	- Teste dos Micronúcleos dos indivíduos analisados: (A) Célula sem micronúcleos; (B) Células com um ou mais micronúcleos; (C) Célula binucleada.....	83
FIGURA 03	- Queixa de dificuldade de ouvir em ambientes ruidosos em mulheres adultas jovens normo-ouvintes, tabagistas e não tabagistas ($p=0,03$).....	86

LISTA DE TABELAS

ARTIGO DE PESQUISA: RELAÇÃO DO TABAGISMO COM A AUDIÇÃO E AÇÃO GENOTÓXICA EM ADULTOS JOVENS

TABELA 01	– Amplitudes das emissões otoacústicas evocadas produto de distorção de tabagistas e não tabagistas segundo a frequência na orelha do lado direito.....	62
TABELA 02	– Amplitudes das emissões otoacústicas evocadas produto de distorção de tabagistas e não tabagistas segundo a frequência na orelha do lado esquerdo.....	62
TABELA 03	– Índices de Danos ao DNA de tabagistas e não tabagistas avaliados pelo Teste dos Micronúcleos.....	65

ARTIGO DE PESQUISA: ASSOCIAÇÃO ENTRE FUNÇÕES DA VIA AUDITIVA EFERENTE E GENOTOXICIDADE EM ADULTOS JOVENS

TABELA 01	– Queixas auditivas relacionadas às funções da via auditiva eferente em adultos jovens normo-ouvintes.....	84
TABELA 02	– Ocorrência do efeito de supressão das emissões otoacústicas produto de distorção em adultos jovens normo-ouvintes.....	84
TABELA 03	– Comparação entre os indicadores de genotoxicidade conforme o gênero e hábito de tabagismo.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

8-OH-dG	–	8-hydroxydeoxy-guanosina
ACh	–	Acetilcolina
ASHA	–	<i>American Speech–Language–Hearing Association</i>
ATP		Adenosina tri-fosfato
COS	–	Complexo olivar superior
DMSO	–	Dimetilsulfóxido
DNA	–	<i>Deoxyribose Nucleic Acid</i>
EDTA	–	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EOAEPD	–	Emissões otoacústicas produto de distorção
EOAs	–	Emissões otoacústicas
F1(Mn)	–	Frequência de um micronúcleo
F2(Mn)	–	Frequência de dois micronúcleos
F3(Mn)	–	Frequência de três ou mais micronúcleos
H ₂ O	–	Água
IC	–	Intervalo de confiança
ID	–	Índice de dano
IPRF	–	Índice percentual de reconhecimento de fala
LRF	–	Limiar de reconhecimento de fala
NaCl	–	Cloreto de sódio
NaOH	–	Hidróxido de sódio

NT	–	Não tabagistas
O2	–	Oxigênio
OD	–	Orelha do lado direito
OE	–	Orelha do lado esquerdo
OR	–	<i>Odds ratio</i>
PAIR	–	Perda auditiva induzida por ruído
Relação S/R	–	Relação sinal–ruído
SAF	–	Serviço de Atendimento Fonoaudiológico
SOCM	–	Sistema olivo coclear medial
SOD2	–	Manganês superóxido dismutase
T	–	Tabagistas
TBARS	–	Tiobarbitúrico-reactivas
Tris-Base	–	Hidroximetil – base
Tris-HCl	–	Hidroximetil ácido clorídrico
UFSM	–	Universidade Federal de Santa Maria
WHO	–	<i>World Health Organization</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	–	Porcentagem
®	–	Marca registrada
°C	–	Grau Celsius
μL	–	Microlitro
A	–	Ampere
dB	–	Decibel(s)
dBNA	–	Decibel(s) Nível de Audição
dBNPS	–	Decibel(s) Nível de Pressão Sonora
dG	–	deoxy-Guanosina
Hz	–	Hertz
M	–	Molar
mA	–	Micro amperes
ml	–	Mililitro
mM	–	miliMolar
mm ³	–	Milimetro cúbico
pH	–	potencial hidrogeniônico
RPM	–	Rotações por minuto
V	–	Voltz
x	–	vezes
α	–	Alfa

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I	– Carta de aprovação do comitê de ética em pesquisa	104
ANEXO II	– Instrumento de avaliação do projeto de pesquisa “Nutrigenética e Tabagismo: Estudos <i>In Vivo</i> e <i>Ex Vivo</i> da Dieta e Atividade Física na Modulação dos Efeitos Pró- oxidantes do Fumo”.....	105

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE I	–	Termo de consentimento livre e esclarecido	114
APÊNDICE II	–	Protocolo de anamnese audiológica	116
APÊNDICE III	–	Protocolo de avaliação audiológica	117
APÊNDICE IV	–	Protocolo de avaliação das EOAEPD e efeito de supressão das EOAEPD.....	118
APÊNDICE V	–	Protocolo de análise do teste Ensaio Cometa.....	119
APÊNDICE VI	–	Protocolo de análise do teste dos Micronúcleos.....	120

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1	Tabagismo como fator etiológico para perda auditiva.....	23
2.1.1	Tabagismo e perda auditiva induzida por ruído.....	26
2.2	Emissões otoacústicas e tabagismo.....	29
2.3	Via auditiva eferente.....	30
2.4	Genotoxicidade e tabagismo.....	33
2.4.1	Ensaio Cometa.....	37
2.4.2	Teste dos Micronúcleos.....	37
3	MATERIAL E MÉTODO.....	40
3.1	Delineamento.....	40
3.2	Local e data das avaliações.....	40
3.3	Considerações éticas.....	40
3.4	Amostra.....	41
3.5	Metodologia.....	41
3.6	Análise Estatística.....	48
4	ARTIGO DE PESQUISA: RELAÇÃO DO TABAGISMO COM A AUDIÇÃO E AÇÃO GENOTÓXICA EM ADULTOS JOVENS.....	49
4.1	Resumo	49
4.2	Abstract	50
4.3	Introdução	50
4.4	Material e Método	53
4.4.1	Análise Estatística.....	58
4.5	Resultados	58
4.5.1	Caracterização da amostra.....	58
4.5.2	Tempo de tabagismo, quantidade diária e marca de cigarro.....	58
4.5.3	Limiares auditivos de tabagistas e não tabagistas.....	60

4.5.4	Amplitude das emissões otoacústicas evocadas produto de distorção em tabagistas e não tabagistas.....	62
4.5.5	Testes de avaliação de genotoxicidade em tabagistas e não tabagistas.....	63
4.6	Discussão	66
4.7	Conclusões	70
4.8	Referências Bibliográficas	71
5	ARTIGO DE PESQUISA: ASSOCIAÇÃO ENTRE FUNÇÕES DA VIA AUDITIVA EFERENTE E GENOTOXICIDADE EM ADULTOS JOVENS.....	74
5.1	Resumo	74
5.2	Abstract	75
5.3	Introdução	75
5.4	Material e Método	78
5.4.1	Análise estatística.....	83
5.5	Resultados	84
5.5.1	Funções da via auditiva eferente.....	84
5.5.2	Indicadores de genotoxicidade.....	86
5.5.3	Associação entre funções da via auditiva eferente e indicadores de genotoxicidade com a influência potencial do gênero e tabagismo.....	88
5.6	Discussão	88
5.7	Conclusões	91
5.8	Referências Bibliográficas	91
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
	ANEXOS	103
	ANEXO I – Carta de aprovação do comitê de ética em pesquisa da UFSM	104
	ANEXO II – Instrumento de avaliação do projeto de pesquisa “Nutrigenética e Tabagismo: Estudos <i>In Vivo</i> e <i>Ex Vivo</i> da Dieta e Atividade Física na Modulação dos Efeitos Pró-oxidantes do Fumo”.....	105
	APÊNDICES	113
	APÊNDICE I – Termo de consentimento livre e esclarecido	114
	APÊNDICE II – Protocolo de anamnese audiológica	116
	APÊNDICE III – Protocolo de avaliação audiológica	117
	APÊNDICE IV – Protocolo de avaliação das EOAEPD e efeito de supressão das EOAEPD.....	118
	APÊNDICE V – Protocolo de análise do teste Ensaio Cometa.....	119
	APÊNDICE VI – Protocolo de análise do teste dos Micronúcleos.....	120

1 INTRODUÇÃO

A perda auditiva é o mais comum dano sensorial humano, resultado de causas genéticas ou ambientais, ou ainda uma combinação dos dois elementos.

Conforme Morton (1991), aproximadamente uma em cada mil crianças são afetadas durante o nascimento ou durante a primeira infância, e um número similar é afetado depois da idade adulta. Além disso, perto de 30% dos adultos têm uma inclinação para sofrer uma significativa perda auditiva após os 65 anos de idade.

Em 2006, a *American Speech–Language–Hearing Association* (ASHA) revelou que 28 milhões de indivíduos nos Estados Unidos apresentaram algum grau de perda auditiva, sendo que 80% dos casos são irreversíveis. Isto se deve a inúmeros fatores, tais como: exposição a ruído intenso, ingestão de medicamentos ototóxicos, alterações metabólicas e circulatórias, infecções, traumas de várias naturezas, hereditariedade e inalação de substâncias tóxicas. Dentre as substâncias tóxicas inaladas, pode-se citar o tabaco.

Uma recente pesquisa de comportamento de risco da juventude realizado pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (2007) indicou que 18,7% dos estudantes do gênero feminino e 21,3% do gênero masculino fumaram de 9 a 12 cigarros durante os últimos 30 dias precedentes ao referido estudo.

O tabagismo, antes visto como um estilo de vida, é atualmente reconhecido como uma dependência química que expõe os indivíduos a inúmeras substâncias tóxicas. Conforme a *World Health Organization – WHO* (2007) o total de mortes devido ao uso do tabaco atingiu a cifra de 4,9 milhões de óbitos anuais, o que corresponde a mais de 10 mil mortes por dia. Caso as atuais tendências de expansão do seu consumo sejam mantidas, esses números aumentarão para 10 milhões de óbitos anuais por volta do ano 2030, sendo metade delas em indivíduos em idade produtiva, entre 35 e 69 anos.

O tabaco contém substâncias nocivas e viciosas. Evidências científicas mostram que todas as formas de tabagismo exercem algum efeito nocivo à saúde humana, em certo período da vida, frequentemente resultando em morte ou impotência. Fumantes

têm maiores chances de desenvolver câncer, principalmente de pulmão, e muitas outras doenças fatais ou não fatais.

Com relação ao sistema auditivo, estudos afirmaram uma positiva associação entre tabagismo e perda da audição (NOORHASSIM & RAMPAL, 1998; CRUICKSHANKS et al, 1998; SHARABI et al, 2002; AGRAWAL et al, 2009; OLIVEIRA & LIMA, 2009). Maffei & Miani (1962) fizeram os primeiros relatos de que fumar pode afetar os limiares auditivos através dos mecanismos antioxidantes ou do suprimento vascular no sistema auditivo. Adicionalmente, Browing, Gatehouse & Lowe (1986) afirmaram que o tabaco pode afetar o suprimento coclear sanguíneo, pois aumenta a viscosidade do sangue e reduz o oxigênio disponível nas trocas vasculares periféricas, e estes efeitos são identificados na etiologia de lesões cocleares.

Embora as estatísticas da perda auditiva associada ao tabagismo não estejam disponíveis para grupos etários mais jovens, vários estudos epidemiológicos têm indicado que à medida que aumenta a idade, a prevalência de perda auditiva é maior em fumantes quando comparados a não fumantes.

O sistema auditivo é constituído por vias auditivas aferentes e eferentes que atuam integradamente. De acordo com Bruel et al (2001), as funções das vias auditivas eferentes são: diminuição da amplitude das emissões otoacústicas (EOAs), diminuição do potencial de ação do nervo coclear, proteção contra o ruído, localização da fonte sonora, melhora na detecção da fonte sonora em ambientes ruidosos. A via auditiva eferente pode ser avaliada através do efeito de supressão das EOAs.

Genotoxicidade é a capacidade que algumas substâncias têm de induzir alterações no material genético de organismos a elas expostos. O material genético humano é composto pelo Ácido Desoxirribonucléico (convencionalmente chamado de DNA, *Deoxyribose Nucleic Acid* – DNA).

A principal alteração associada ao aumento do estresse oxidativo via tabagismo inclui danos nas moléculas de DNA das células. Tais danos podem ser tão extensos que induzem a morte celular ou mesmo a ocorrência de mutações que podem desencadear processos carcinogênicos. Atualmente, através da biologia molecular, existem específicos testes de genotoxicidade, como o “Ensaio Cometa” e a “Análise dos Micronúcleos”.

Conforme Silva et al (2003), a Técnica do Cometa (eletroforese em gel de células individuais) tem ampla utilização para testar a indução de danos e reparos do DNA. As vantagens desta técnica incluem a sua simplicidade, rápida realização e sua alta sensibilidade para vários tipos de danos no DNA. De acordo com a Fenech (2000), a Análise do Micronúcleo é o ensaio, *in vivo*, mais amplamente utilizado para a detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos) e aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal), sendo internacionalmente aceito como parte da bateria de testes recomendada para a avaliação do potencial mutagênico e para o registro de novos produtos químicos que entram anualmente no mercado mundial. Micronúcleos são núcleos pequenos, separados e adicionais ao núcleo principal das células, produzidos durante a telófase da mitose por perda de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros.

São de conhecimento científico as inúmeras alterações provocadas pelo tabagismo no ser humano, uma vez que o tabaco aumenta o estresse oxidativo, que por sua vez interfere na função de diversos órgãos e sistemas corporais. Na prática audiológica, percebe-se frequentemente o relato do paciente com queixas auditivas, ser tabagista. Até o momento, foram realizados vários estudos com o intuito de analisar os efeitos do fumo na audição, porém são escassos os estudos fazendo esta interrelação e, principalmente, combinados a possível genotoxicidade causada pelo tabaco. Não foi encontrado na literatura compulsada nenhum estudo que avaliou o efeito de supressão das EOAs de indivíduos tabagistas.

Pelo exposto, os objetivos desta pesquisa consistiram em analisar a função auditiva e também a via auditiva eferente e ainda, valendo-se da biologia molecular observar as possíveis alterações no sistema auditivo, causadas por estresse oxidativo, de uma população tabagista.

Esta dissertação está estruturada de acordo com o modelo alternativo, o qual deve ser apresentado com uma introdução, revisão de literatura, material e método, dois artigos de pesquisa e referências bibliográficas.

O primeiro artigo de pesquisa versa sobre a função coclear, avaliada por meio dos limiares auditivos e amplitude das emissões otoacústicas produto de distorção

(EOAEPD), e os indicadores de genotoxicidade de adultos jovens normo-ouvintes tabagistas.

O segundo artigo de pesquisa aborda a associação entre as funções da via auditiva eferente e genotoxicidade em adultos jovens, além de possíveis variáveis intervenientes, como o tabagismo e o gênero.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Neste capítulo é apresentada uma revisão dos estudos concernentes ao tema central desta pesquisa, encontrados na literatura nacional e, principalmente, internacional. O relato destes estudos está subdividido em achados que relacionaram: tabagismo como fator etiológico para perda auditiva; emissões otoacústicas e tabagismo; via auditiva eferente; genotoxicidade e tabagismo.

Em cada subtítulo, as citações estão em ordem cronológica de publicação.

2.1 Tabagismo como fator etiológico para perda auditiva

Maffei & Miani (1962) referiram que fumar pode afetar os limiares auditivos através dos mecanismos antioxidantes ou do suprimento vascular no sistema auditivo.

Zelman (1973) relatou que fumar produz aumento do nível de dióxido de carbono e nicotina. Esse fato pode comprimir veias sanguíneas ou causar contração das veias e oclusões trombóticas.

Bobbin & Gondra (1976), ao analisarem a ototoxicidade da nicotina em animais experimentais, concluíram que a nicotina não é uma droga potencialmente ototóxica. Porém, Handrock & Matthias (1982), igualmente estudando a ototoxicidade da nicotina, através de trabalhos laboratoriais em animais experimentais, observaram que a nicotina afeta a estrutura celular da cóclea e, conseqüentemente, os limiares auditivos, considerando-a uma droga ototóxica.

Cunningham et al (1983) relataram que, pelo fato de o tabagismo diminuir o diâmetro do vaso sanguíneo, o mesmo pode estar relacionado com a degeneração do gânglio espiral da cóclea.

Browing, Gatehouse & Lowe (1986) referiram que o tabaco pode afetar o suprimento vascular coclear, pois aumenta a viscosidade sanguínea e reduz o oxigênio

disponível nas trocas vasculares periféricas, sendo que estes efeitos são identificados na etiologia de lesões cocleares.

Brant et al (1996) relataram que o histórico de tabagismo é frequentemente notado em casos de presbiacusia.

Cruickshanks et al (1998) estudaram a relação entre o ato de fumar e perda auditiva. Executaram otoscopia, timpanometria e audiometria tonal liminar por via aérea e óssea, em 3753 adultos com idades entre 48 e 92 anos, fumantes e não fumantes, sem histórico de exposição ao ruído. Concluíram que fumantes são 1,69 vezes mais suscetíveis a desenvolver perda auditiva comparados a não fumantes e sugeriram que modificações no hábito de fumar podem prevenir ou excluir o declínio na sensibilidade auditiva em função da idade. Relataram, ainda, que os não fumantes que convivem com fumantes no mesmo ambiente (fumantes passivos) são mais suscetíveis a desenvolver perda auditiva do que aqueles que não convivem com fumantes.

Noorhassim & Rampal (1998) estudaram a combinação de efeitos do tabaco e idade na diminuição da capacidade da audição. Dividiram 263 residentes de uma área rural, que não eram expostos ao ruído, em quatro grupos: não fumantes e fumantes com menos de 40 anos de idade; não fumantes e fumantes com mais de 40 anos de idade. Após a realização da audiometria tonal liminar nesses grupos, concluíram que 51,3% dos indivíduos com diminuição da capacidade auditiva eram fumantes com mais de 40 anos de idade. Observaram, ainda, que o número de cartelas de cigarro diário consumido e a idade foram estatisticamente significantes na inclinação dos fatores de risco para a diminuição da capacidade auditiva. Afirmaram, assim, que idade e hábito de fumar são efeitos adversos multiplicadores da diminuição da capacidade auditiva.

Sharabi et al (2002), com o objetivo de analisar a associação entre tabagismo e perda de audição, que não é induzida por ruído, e caracterizar o tipo de perda auditiva encontrada em fumantes, avaliaram 13308 homens com idade entre 20 e 68 anos através de audiometria tonal liminar nas frequências de 250 a 8000Hz. Os autores verificaram que a prevalência de qualquer tipo de perda auditiva em indivíduos com idade abaixo de 35 anos foi de 4,5%, comparado a 10,5% entre aqueles acima de 35 anos ($p < 0,0001$). A incidência significativamente maior de qualquer tipo de perda auditiva foi encontrada em fumantes (11,8%) e ex-fumantes (11,7%) do que em não

fumantes (8,1%) ($p < 0,0001$). O incremento de risco do tabagismo para o desenvolvimento da perda auditiva entre os indivíduos com menos de 35 anos de idade foi de 43% e 17% entre aqueles acima de 35 anos. Concluíram que a perda auditiva é maior nos fumantes que nos não fumantes e nos adultos jovens o efeito do tabagismo é maior.

Ferrite & Santana (2005) afirmaram que é possível que distintas substâncias ototóxicas estejam presentes na composição química do cigarro, sendo consideradas possíveis causadoras de diminuição da acuidade auditiva.

Para Harkrider & Hedrick (2005), várias vias do sistema nervoso central, incluindo as vias auditivas, são colinérgicas, incorporando receptores nicotínicos. No sistema auditivo, esses receptores são normalmente ativados pelo neurotransmissor acetilcolina (ACh). Esses receptores também podem ser animados pela nicotina, que imita as ações de ACh, e por isso é conhecido como uma droga acetilcolinérgica. Os autores investigaram o papel dos mecanismos colinérgicos na propagação dos estímulos auditivos e relataram que os resultados são consistentes com a hipótese de que os mecanismos colinérgicos nicotínicos desempenham um papel na propagação de estímulos auditivos.

Lacerda et al (2005) relataram que uma das formas de exposição ao monóxido de carbono é o tabagismo ativo e essa exposição pode ter um efeito direto sobre o metabolismo coclear, afetando o sistema auditivo conseqüentemente.

Nomura et al (2005) afirmaram uma positiva associação entre fumantes e perda auditiva. Para esses autores, é possível que parar de fumar seja uma estratégia usual para a manutenção da acuidade auditiva.

John et al (2007) relataram que o fumo ou o excesso de peso podem contribuir para o estreitamento das artérias aterogênicas que nutrem a cóclea e, segundo os autores, a espessura das camadas média e íntima da carótida é um marcador para a aterosclerose generalizada. Os autores analisaram um subgrupo ($n=2619$) a partir de uma amostra da população geral, no nordeste da Alemanha Oriental com idade entre 45 e 81 anos. As avaliações incluíram autorrelatos sobre deficiência auditiva e os exames médicos da espessura das camadas média e íntima da carótida. Utilizando regressão logística ordinal para análise de dados e após o ajuste para cigarros por dia,

circunferência da cintura, diabetes, exposição ao ruído, idade e sexo, encontraram que a espessura das camadas média e íntima da carótida permaneceu um preditor de deficiência auditiva. O número de cigarros por dia e circunferência da cintura foram relacionados à espessura das camadas média e íntima da carótida, mas não à deficiência auditiva. Conforme John et al (2007), os resultados sugeriram uma associação positiva entre a espessura das camadas média e íntima da carótida e o transtorno de audição.

Agrawal et al (2009) avaliaram os fatores de risco para perda auditiva em adultos americanos. Após avaliarem com audiometria tonal liminar, nas frequências de 500 a 8000Hz, 3527 adultos com idade de 20 a 69 anos concluíram que riscos cardiovasculares, como tabagismo e diabetes, foram associados com perda auditiva tanto de baixas como de altas frequências, possivelmente devido a vulnerabilidade da cóclea a insuficiência microvascular.

Oliveira & Lima (2009) compararam os limiares auditivos em baixas e altas frequências, de um grupo de 30 indivíduos não tabagistas e 30 tabagistas, do sexo masculino com idades entre 18 e 40 anos. Observaram que os limiares auditivos foram piores no segundo grupo com diferenças estatisticamente significativas. Em baixas frequências, os limiares auditivos, embora dentro da normalidade, foram maiores no grupo tabagista. Em altas frequências observaram aumento pronunciado dos limiares auditivos no grupo tabagista.

2.1.1 Tabagismo e perda auditiva induzida por ruído

Virokannas & Anttonen (1995) avaliaram 443 pastores de renas (idade média de 43 anos) que frequentemente utilizavam instrumentos ruidosos e veículos, motos e motosserras. Conforme os autores, os limiares auditivos nas frequências de 3000 e 4000Hz deterioraram-se significativamente com o aumento da exposição ao ruído. Relacionaram a quantidade de fumo com o comprometimento da acuidade auditiva e o tempo de exposição ao ruído foi utilizado como covariância. A quantidade de cigarros

interferiu nos limiares auditivos apenas para os que haviam fumado aproximadamente 144000 cigarros (ou seja, 20 cigarros por dia por mais de 20 anos).

Mizoue, Miyamamoto & Shimizu (2003) avaliaram o efeito sinérgico do tabagismo e da exposição ao ruído na audição de 4624 trabalhadores homens de uma fábrica Japonesa. Relataram que o tabagismo, quando combinado com exposição ao ruído, pode ser um fator agravante para as perdas auditivas das altas frequências, já que o tabagismo não influenciou nos resultados das baixas frequências.

Palmer et al (2004) exploraram a interação do tabagismo e a exposição ocupacional ao ruído como fatores de risco para dificuldades da audição da população em geral. Para tal, enviaram um questionário para 21201 adultos em idade ativa, selecionados aleatoriamente. Foram feitas perguntas sobre hábitos de fumo, os anos passados em uma profissão ruidosa, dificuldade em entender a fala e uso de aparelhos de amplificação sonora. Associação de dificuldade auditiva com hábito de fumar foi analisada por regressão logística e comparada entre os extratos de exposição ao ruído. Verificaram que cerca de metade dos indivíduos já havia fumado, e metade desses ainda fumava. Entre 10418 que forneceram detalhes sobre a audição, 348 foram classificados como tendo dificuldade de audição moderada e 311 como graves. Os autores descreveram que os ex-fumantes tinham um risco mais elevado de dificuldade auditiva do que os não fumantes. Concluíram que fumar pode prejudicar audição, e os trabalhadores devem ser encorajados a se abster tanto do fumo como da exposição ao ruído.

Wild et al (2005) analisaram a influência de ser tabagista a longo tempo (mais de 10 anos) nos limiares auditivos de trabalhadores expostos a ruídos ocupacionais. Ambos os grupos tinham média de idade similar e mesmo tempo de exposição ao ruído ocupacional. A média dos limiares auditivos em 3000 e 4000Hz no grupo de fumantes foram significativamente maiores (7dB) do que o grupo de não fumantes. Nas demais frequências testadas (500, 1000, 2000, 6000 e 8000Hz) os autores não encontraram diferenças significativas entre os dois grupos. Os autores concluíram que fumantes expostos ao ruído ocupacional durante longo tempo têm maior risco de desenvolver perda permanente da audição em 3000 e 4000Hz quando comparados com não fumantes com similar história ocupacional.

Ferrite & Santana (2005) afirmaram em seu estudo com 535 homens trabalhadores de uma indústria metalúrgica do nordeste do Brasil, que a associação entre tabagismo, exposição ao ruído e idade, gera mais efeitos adversos na audição do que a associação entre idade e exposição ao ruído.

Cochiarella et al (2005) estudaram a associação de fatores de risco cardiovasculares e perda auditiva de altas frequências examinando 669 trabalhadores homens expostos ao ruído. Analisaram os limiares auditivos, os glóbulos brancos e uso de tabaco entre esses indivíduos. Verificaram que um aumento nos glóbulos brancos, contados de $1000/\text{mm}^3$, esteve associado com: um declínio de 1,9dB na audição dos trabalhadores não fumantes e 6,8dB de declínio na audição dos fumantes. Concluíram que a associação entre os fatores de risco cardiovascular, como o tabagismo e perda auditiva de altas frequências, são mais evidentes em adultos jovens com menos tempo de exposição ao ruído.

Callejo et al (2006) estudaram o efeito da supressão do tabagismo em indivíduos com perda auditiva induzida por ruído. Relataram que a exposição ao ruído e o tabagismo são fatores que, independentes, predisõem a perda auditiva neurosensorial e esse efeito é sinérgico e aditivo. Verificaram que a supressão do tabagismo anula a progressão da hipoacusia nos grupos laborais em que a exposição acústica não supera os 80dBNPS.

Pouryaghoub et al (2007) avaliaram 206 homens tabagistas e 206 homens não tabagistas, que trabalhavam expostos a ruído maior que 85dBA. Observaram que a percentagem de trabalhadores com limiares audiométricos maior ou igual a 30dB entre 1000 e 4000Hz em ambas orelhas foi de 49,5% em fumantes e 11,2% no grupo de não fumantes (OR=7,8; IC95%=4,7-13), e a percentagem de trabalhadores com limiar auditivo maior que 25 dB em 4000Hz, na melhor orelha foram 63,6% nos fumantes e 18,4% no grupo dos não fumantes. Essa diferença foi estatisticamente significativa após ajuste para idade e duração da exposição. Concluíram que o tabagismo pode acelerar a perda auditiva induzida por ruído, mas que ainda são necessárias investigações adicionais para compreender os mecanismos subjacentes.

2.2 Emissões otoacústicas e tabagismo

Conforme Kemp (1988), o registro das EOAs, usado com o propósito de avaliar a função coclear, tem demonstrado alteração das respostas antes que sejam registradas alterações no limiar auditivo.

Zorowka et al (1993) relataram que as emissões otoacústicas estão ausentes quando a cóclea é agredida por drogas ototóxicas.

Conforme Robinette & Glattke (1997), desde sua descoberta, as EOAs são largamente utilizadas no acompanhamento da função coclear em tratamentos com drogas ototóxicas ou em exposição a agentes nocivos à cóclea.

Valejo et al (2001) estudaram a utilização das EOAEPDs para detecção precoce da ototoxicidade. Para tal, estudaram prospectivamente a audição de pacientes que recebiam amicacina, usando audiometria tonal liminar e emissões otoacústicas produtos de distorção (EOAEPDs). Quando comparados os ouvidos com e sem alterações audiométricas, as variações das respostas não foram significativas em 1000, 2000 e 4000Hz; no entanto, em 6000 e 8000Hz mostraram diferenças significativas ($p < 0,05$). Os autores concluíram que a ototoxicidade pode ser monitorada eficazmente com EOAEPDs durante a administração da droga.

Negley et al (2007), com o objetivo de verificar diferenças nas EOAEPDs de tabagistas, avaliaram 24 adultos jovens (12 fumantes e 12 não fumantes) com idades entre 20 e 30 anos que eram tabagistas há no mínimo 5 anos. Todos os sujeitos também foram avaliados com timpanometria, audiometria convencional e audiometria de altas frequências. Os resultados da timpanometria e da audiometria convencional foram considerados normais em ambos os grupos, porém os tabagistas apresentaram amplitudes de EOAEPDs significativamente reduzidas em todas as frequências avaliadas, quando comparados aos não tabagistas e também apresentaram limiares significativamente elevados na audiometria de altas frequências. Para os autores, estes resultados indicaram que fumantes têm maior risco de dano coclear que os não fumantes, e que as EOAEPDs podem identificar precocemente alterações na função coclear de fumantes.

Torre III et al (2007) investigaram possíveis fatores de risco para as EOAEPDs em homens americanos adultos jovens normo-ouvintes. Avaliaram 436 homens, com faixa etária de 17 a 29 anos com questionários para obter dados demográficos e história de exposição ao ruído, exposição a solventes, histórico de tabagismo, e histórico da audição. Realizaram ainda otoscopia, timpanometria, audiometria tonal liminar (2000 a 8000Hz) e EOAEPDs (2300 a 8000Hz). Os resultados mostraram que as amplitudes das EOAEPDs foram menores nos fumantes de mais de 40 cigarros por dia, nos que relataram alta exposição de música ao vivo e nos que apresentam zumbido após a exposição ao ruído. Essas diferenças não foram estatisticamente significativas em todas as frequências. Os indivíduos com múltiplos fatores de risco apresentaram menores amplitudes de EOAEPDs em relação aos indivíduos com menos ou sem fatores de risco, entretanto essas diferenças também não foram estatisticamente significantes. Com relação ao hábito de tabagismo especificamente, os autores relataram que os tabagistas apresentaram em média 1 a 2dB a menos na amplitude das EOAEPDs que os não tabagistas, exceto na frequência de 6300Hz.

2.3 Via auditiva eferente

Collet et al (1990) investigaram a possibilidade da estimulação auditiva contralateral, ao longo de percursos do sistema auditivo eferente medial, alterar a ativação micromecânica coclear e, conseqüentemente, afetar EOAs evocadas em seres humanos. A primeira experiência, envolvendo 21 indivíduos saudáveis, mostrou redução da amplitude das EOAs sob baixa intensidade de ruído branco contralateral. Os autores relataram que o efeito de supressão das EOAs é encontrado em intensidades abaixo do limiar de reflexo acústico. Nesse estudo, realizaram mais dois experimentos (um selando a orelha contralateral com massa de silicone e outro investigando o papel da transmissão transcraniana do estímulo auditivo contralateral) que vieram a confirmar os achados de sua primeira experiência. Os autores concluíram que houve, portanto, um efeito de estímulo auditivo contralateral na ativação da

micromecânica coclear. Para os autores, a explicação mais adequada envolve o sistema coclear eferente medial, encontrado ao nível do tronco cerebral através das vias auditivas aferentes. Relataram que esse procedimento simples e não invasivo pode ser utilizado com humanos para exploração funcional do sistema olivococlear medial eferente.

Collet et al (1994) relataram que a influência da estimulação auditiva contralateral sobre as EOAs poderia ser resumida da seguinte forma: (1) alteração (principalmente uma diminuição) da amplitude das emissões otoacústicas; (2) alteração do espectro de resposta (frequência de deslocamento para cima de EOAs espontâneas); (3) alteração da fase; (4) efeito dependente da intensidade da estimulação contralateral; (5) efeito inversamente dependente da intensidade da estimulação ipsilateral; (6) especificidade de frequência do efeito supressivo. Relataram que o envolvimento do feixe medial é altamente provável, mas não se poderia excluir um caminho duplo, incluindo também o reflexo acústico.

Williams et al (1994) estudaram a supressão das EOAs através da utilização de um ruído contralateral. Verificaram que a supressão parece ser independente da atividade do reflexo acústico. Relataram que o sistema auditivo eferente, quando ativado pelo baixo nível de estimulação acústica contralateral, atua sobre o controle inibitório dos mecanismos celulares responsáveis pela geração das emissões otoacústicas em seres humanos.

Sahley et al (1997) referiram que o sistema eferente, por meio do trato olivococlear medial, modula os movimentos das células ciliadas externas pela liberação de acetilcolina na fenda sináptica.

Bruel et al (2001) relataram que as fibras auditivas eferentes originam-se nos mais diversos pontos do sistema nervoso central. No nível do complexo olivar superior, essas fibras projetam-se em direção à cóclea através de dois tratos distintos: o trato olivococlear medial, compreendido por neurônios largos e mielinizados que inervam predominantemente as células ciliadas externas e o trato olivococlear lateral, formado por neurônios não mielinizados e que faz sinapses com as células ciliadas internas. Para esses autores, os mecanismos fisiológicos de interação dos sistemas eferente e aferente ainda não foram bem esclarecidos. Todas as fibras eferentes originadas dos

mais diversos pontos do sistema nervoso central organizam-se no nível do complexo olivar superior. Para os mesmos autores, as funções das vias auditivas eferentes são: diminuição da amplitude das EOAs, diminuição do potencial de ação do nervo coclear, proteção contra o ruído, localização da fonte sonora e melhora na detecção da fonte sonora em ambientes ruidosos.

Fávero et al (2003) observaram que os pacientes com zumbido apresentaram menor efeito supressor do que pacientes sem zumbido, mostrando que o sistema eferente nesses pacientes é menos eficiente.

Conforme Guinan (2006), a via auditiva eferente é constituída pelos feixes olivococlear medial e lateral, os quais diferem anatômica e fisiologicamente e coordenam a função interdependente das duas orelhas. Para o autor, vários estudos indicam que o sistema auditivo eferente ajuda a reduzir o trauma acústico e diminuir o mascaramento pelo ruído de fundo, o que auxilia na compreensão da fala no ruído.

Lustig (2006) relatou que o efeito inibitório das EOAs é devido a uma reduzida vibração evocada da membrana basilar como resultado de uma supressão do processo ativo das células ciliadas externas.

Lustig (2006) estudou o receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 9$ e $\alpha 10$. Relatou que recentemente essas unidades foram identificadas como componentes críticos do sistema auditivo via sistema olivococlear medial e as propriedades farmacológicas deste receptor assemelham-se a resposta colinérgica de células ciliadas externas. Relatou, ainda, que este receptor desempenha um papel na mediação da resposta das fibras auditivas eferentes, pois é responsável pela inibição eferente coclear. O autor verificou em seu estudo mecanismos alternativos e complementares de células ciliadas externas e se a atividade eferente também poderia ser mediada através do receptor nicotínico de acetilcolina. O autor identificou proteínas que podem estar envolvidas na prevenção da morte celular e sugeriu que o receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 9$ e $\alpha 10$ representa um potencial terapêutico para vários problemas auditivos, incluindo a prevenção ou o tratamento de perda auditiva induzida por ruído e doenças debilitantes como vertigem ou zumbido.

Randy (2008) relatou que o complexo olivococlear superior (COS) é um aglomerado de núcleos situados no tronco cerebral e que constitui um elemento

essencial da via auditiva. O sistema olivococlear medial (SOCM) inclui dois núcleos principais, trato olivococlear medial (que tem como destino final as células ciliadas externas) e o trato olivococlear lateral superior (que tem como destino final as células ciliadas internas), e que desempenham um papel claro na localização da fonte sonora. Em torno dos núcleos principais existe um número de núcleos periolivares, que variam significativamente entre espécies de mamíferos em função de múltiplos aspectos da audição. Embora os núcleos periolivares tenham sido estudados em cobaias, estes núcleos não foram descritos em humanos. Em seu estudo, com base na localização da mieloarquitetura, morfologia neuronal e citoarquitetura, Randy (2008) objetivou definir os núcleos periolivares dentro do SOCM e fornecer estimativas do número de neurônios dentro destes núcleos. A partir do estudo de doze cérebros humanos o autor encontrou prova de seis grupos de células morfologicamente distintas: três no interior do corpo trapezóide e três ao longo do aspecto posterior do SOCM. Com base na análise de tecido humano corado para mielina, substância de Nissl, ou impregnado com prata, os núcleos periolivares em humanos aparecem bastante homólogos aos núcleos descritos em animais.

Não foram encontrados na literatura compulsada estudos que investiguem as funções da via auditiva eferente em indivíduos tabagistas.

2.4 Genotoxicidade e tabagismo

Kiyosawa et al (1990) relataram que espécies ativas de oxigênio podem ser geradas pela fumaça do cigarro e sugeriram que estão envolvidos na carcinogênese, devido ao tabagismo. Os autores investigaram o efeito do tabagismo sobre danos oxidativos do DNA em células de sangue periférico utilizando 8-hydroxydeoxyguanosina (8-OH-dG) como marcador. De dez voluntários saudáveis do sexo masculino com idade 20 e 22 anos, 5ml de sangue foram coletados antes e 10 minutos depois de fumar dois cigarros em 10 minutos. Após a lise das membranas das células sanguíneas de DNA isolaram leucócitos utilizando um extrator de DNA e os níveis de 8-OH-dG

foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica. Os resultados demonstraram que os níveis médios de 8-OH-dG aumentaram significativamente ($p < 0,05$) de $3,3 \pm 0,8$ dG para $5,1 \pm 2,5$ dG depois de fumar. Os autores concluíram que o tabagismo provoca danos oxidativos do DNA em células de sangue periférico em um tempo relativamente curto.

De acordo com Lucesoli & Fraga (1995), a existência em um organismo de um desequilíbrio em favor da geração excessiva de radicais livres, ou em detrimento da velocidade de remoção destas espécies, é conhecida como estresse oxidativo e pode conduzir à oxidação maciça de substratos biológicos. A cronicidade desse estresse oxidativo, no ambiente celular, pode causar severos problemas metabólicos e estar envolvida na origem e no desenvolvimento de numerosas doenças.

Conforme Clerici & Yang (1996), várias espécies reativas de oxigênio são gerados durante a redução do O_2 a H_2O (superóxido, peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila). Uma vez que essas moléculas potencialmente prejudiciais também são produzidas sob condições metabólicas normais na cóclea e sistemas de defesa antioxidante estão presentes para neutralizá-los.

Conforme Halliwell & Gutteridge (1999), são fontes exógenas de radicais livres as radiações gama e ultravioleta, os medicamentos, a dieta, o cigarro e os poluentes ambientais. Embora uma pequena quantidade de radicais livres seja necessária para manutenção da vida, sua produção excessiva, maior do que a sua velocidade de remoção, pode conduzir a diversas formas de dano celular, como o dano ao DNA (genotoxicidade).

McGregor (2000) afirmou que os agentes genotóxicos são caracterizados por possuírem atividade biológica primária, própria ou de metabólitos, capaz de alterar informações codificadas no DNA. A genotoxicidade ocorre quando a exposição a um agente tóxico leva à alteração da estrutura ou do conteúdo de cromossomos (clastogenicidade) ou da sequência de pares de bases do DNA (mutagenicidade).

Agnez-Lima et al (2001) descreveram que danos ao DNA podem ser induzidos por um grande número de agentes físicos e químicos do ambiente, bem como por compostos produzidos pelo metabolismo celular. Esse tipo de lesão pode interferir com processos celulares como replicação e transcrição, resultando em morte de células e/ou

mutações celulares. A baixa frequência de mutação nas células é devido à presença de vias enzimáticas, que reparam os danos ao DNA.

Van Campen et al (2002) relataram que o estresse oxidativo está implicado como um fator importante nos eventos cocleares como perda auditiva neurossensorial induzida por ruído ou medicamentos ototóxicos. Apesar das espécies reativas de oxigênio, também conhecidas como radicais livres de oxigênio, serem subprodutos normais do metabolismo aeróbico celular, essas moléculas instáveis podem prejudicar lipídeos celulares, proteínas e ácidos nucleicos em DNA se o saldo de antioxidantes correspondente é perturbado. As consequências de tais rupturas podem ser detectadas bioquímica e histologicamente, e podem ser demonstradas funcionalmente. Utilizando 35 ratos, os autores objetivaram determinar se uma exposição ao ruído intenso de banda larga por 2 horas, resultando em mudança permanente no limiar do rato, produz danos oxidativos mensuráveis para DNA coclear, e, relacionar o tempo de curso de peroxidação de danos de lipídios e o tempo e comprometimento funcional. Para conseguir isso, tanto danos ao DNA e peroxidação lipídica foram avaliados dentro do mesmo animal nas cócleas e em dois órgãos de controle (cérebro e fígado). Cóclea, cérebro, fígado, soro e urina foram analisados após uma, três, oito, 72 e 672 horas (28 dias) após a exposição. Um objetivo secundário foi estudar o processo de reparação após os danos oxidativos e avaliar o soro e urina para derivados bioquímicos de danos e reparação. Os danos oxidativos de DNA foram avaliados medindo 8-OH-dG por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica. A peroxidação lipídica foi medida através do ensaio do ácido tiobarbitúrico-reactivas (TBARS) colorimétrico para detecção de aldeídos (por exemplo, malondialdeído). A função auditiva foi avaliada por meio da Audiometria de Tronco Cerebral (para avaliar a sensibilidade auditiva) e das EOAEPDs (para avaliar a função das células ciliadas externas). A resposta auditiva de tronco cerebral e EOAEPDs mostraram progressiva elevação para os grupos de três e oito horas, seguida de notável recuperação para o grupo de 72 horas, e alguns para o agravamento do grupo 672horas. 8-OH-dG foi significativamente elevado para cóclea no grupo das oito horas, e no cérebro e do fígado para o grupo 72 horas. O TBARS foi significativamente elevado no soro para o grupo 72 horas. Com base nos danos oxidativos do DNA presentes na cóclea após

intensa exposição ao ruído, os autores concluíram que as oito primeiras horas seguintes a exposição podem ser consideradas um período crítico para o tratamento antioxidante.

Conforme Bjelland & Seeberg (2003), danos oxidativos ao DNA têm sido reconhecidos como uma importante causa de morte celular e mutações em todos os organismos aeróbicos e nos seres humanos podem ser considerados um importante promotor do câncer. Dentre os fatores de risco para danos oxidativos ao DNA, os autores citaram o tabagismo e o alcoolismo.

Arboleda-Moreno et al (2004) estudaram a genotoxicidade por exposição a tabagismo em jovens da Colômbia. Para tal, avaliaram a frequência de aberrações cromossômicas em linfócitos do sangue periférico de 32 jovens tabagistas e 32 jovens não tabagistas, com idade entre 19 e 29 anos. Os autores verificaram que a frequência de aberrações cromossômicas foi significativamente maior nos jovens tabagistas ($6,02 \pm 0,52$) do que em não tabagistas ($3,04 \pm 0,50$) e confirmaram a presença de uma associação entre tabagismo e genotoxicidade.

Para Valko et al (2004), ao longo dos anos, o acúmulo de danos ao DNA pode levar a modificações genéticas nas células, as quais podem ser mutagênicas ou carcinogênicas.

Csiszar et al (2009) relatou que o fornecimento adequado de nutrientes e oxigênio têm como consequência a produção de energia para que o organismo realize todas as suas atividades metabólicas. Essa produção ocorre via cadeia respiratória mitocondrial. Entretanto, cerca de 5% do oxigênio que é inspirado, ao invés de ser ocupado na produção de energia (adenosina tri-fosfato - ATP) gera espécies ativas de oxigênio (radicais livres). Essas moléculas são altamente reativas com outras moléculas celulares e se não forem controladas podem causar diversos danos fisiológicos e doenças. Por tal motivo, os radicais livres são controlados pelo organismo através de um sistema antioxidante enzimático. Esse sistema transforma radicais livres como o superóxido e o peróxido de hidrogênio (água oxigenada) em moléculas de água. Além deste sistema endógeno, moléculas antioxidantes provenientes de frutas e verduras atuam na defesa do nosso organismo contra os radicais livres. Entretanto, quando a

produção de radicais livres é maior do que o seu controle pelos sistemas antioxidantes exógenos e endógenos ocorre um fenômeno denominado estresse oxidativo.

2.4.1 Ensaio Cometa

O Ensaio Cometa, ou Eletroforese em Gel de Célula Única, é o mais popular método de estudo genotóxico que permite avaliar danos ao DNA de células individuais e possibilita quantificar quebras de fita. Qualquer tipo celular pode ser avaliado, bastando que haja presença de núcleo. O desenvolvimento da técnica deve-se principalmente aos trabalhos Shing et al (1988).

Conforme Shing et al (1988), as células submetidas ao Ensaio Cometa são incluídas em gel de agarose e dispostas em fina camada sobre lâminas histológicas. Através de soluções apropriadas, as membranas do núcleo e organelas são rompidas; os componentes citoplasmáticos e proteínas nucleares são retirados; e o material genético restante é submetido à eletroforese. A partir do núcleo, fragmentos de DNA migram no sentido anodo; quanto mais intensa for a indução de quebras, menores serão os fragmentos e maior a extensão de migração. Após a coloração, as lâminas são observadas em microscópio óptico e o DNA danificado em uma célula individual revela-se com forma similar a um cometa, com a cauda correspondendo aos fragmentos que migraram. O dano pode ser quantificado em células individuais, permitindo avaliar o potencial genotóxico de amostras.

Para Garcia et al (2004), em estudos *in vivo*, o Ensaio Cometa pode indicar efeitos genotóxicos em teleósteos pela exposição a substâncias de diferentes classes e mecanismos de ação.

2.4.2 Teste dos Micronúcleos

Para Stich & Rosin (1983), a presença de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa bucal reflete os eventos genotóxicos que ocorreram em células que estavam na camada basal do epitélio de uma a três semanas antes da obtenção dos esfregaços. Para os mesmos autores, o uso do tabaco provoca um aumento da frequência de micronúcleos, especialmente quando associado ao consumo de etanol, havendo um efeito sinérgico que potencializa o aparecimento dos micronúcleos. O aumento da frequência de micronúcleos na mucosa oral é indicativo de elevação das taxas de mutação e está relacionada ao desenvolvimento de carcinomas da mucosa oral.

Para Tolbert et al (1992), os micronúcleos podem ser únicos ou múltiplos e devem preencher os seguintes critérios: estrutura da cromatina similar e intensidade de cor semelhante ou mais fraca do que a do núcleo principal; borda evidente, sugerindo membrana nuclear; ter formato arredondado; localização intracitoplasmática; diâmetro menor do que 1/5 do núcleo principal.

De acordo com Fenech (2000), o estudo de danos ao DNA ao nível do cromossoma é uma parte essencial da toxicologia genética porque mutações cromossômicas são um evento importante na carcinogênese. Os ensaios de micronúcleos têm emergido como um dos métodos preferenciais para avaliar os danos de cromossomos porque eles permitem que tanto a perda de cromossomos como a sua ruptura possam ser medidos de maneira confiável.

Conforme Ramirez & Saldanha (2002), o micronúcleo em células esfoliadas é um núcleo adicional e separado do núcleo principal de uma célula, aparecem como DNA extracelular, representados por cromossomos inteiros ou fragmento de cromossomos que não foram incluídos no núcleo principal durante a mitose.

Para Suhas et al (2004), a renovação do epitélio bucal é de aproximadamente 25 dias e a formação de micronúcleos deve ser considerada um dano citogenético agudo e local.

Freita et al (2005) estudaram a ocorrência de danos cromossômicos em células esfoliadas da mucosa bucal e sua associação com fatores de risco para desenvolvimento de câncer bucal em uma amostra de 40 indivíduos divididos em dois grupos: Grupo 1 (n=20), formado por indivíduos expostos a fatores considerados de risco ao desenvolvimento do câncer bucal (fumo e álcool); Grupo 2 (N=20) constituído

por indivíduos sem exposição a estes fatores. A investigação da ocorrência, entre os grupos, dos fatores de risco foi avaliada a partir de informações obtidas em entrevista e os danos genéticos foram avaliados utilizando o Teste de Micronúcleo. Os resultados revelaram que mesmo uma fraca exposição ao tabaco e álcool isoladamente pode produzir genotoxicidade e que essa condição pode ser aumentada quando ocorrer combinação dos dois fatores.

Para Carrard et al (2007), o teste dos micronúcleos nas células descamadas do epitélio bucal é de grande aplicabilidade para o acompanhamento de pacientes de risco para câncer bucal e de análise do impacto de determinados agentes genotóxicos, como o fumo e o álcool no epitélio de revestimento oral, brônquico e esofágico.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Delineamento

O delineamento do presente estudo é do tipo caso-controle, quantitativo, contemporâneo que comparou os achados audiológicos entre tabagistas e não tabagistas e a possível associação com taxas de danos no DNA.

Esta pesquisa é parte do Projeto de Pesquisa “Nutrigenética e Tabagismo: Estudos *In Vivo* e *Ex Vivo* da Dieta e Atividade Física na Modulação dos Efeitos Pró-Oxidantes do Fumo”, aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria sob o Número 0146.0.243.000-07 (ANEXO I).

3.2 Local e data das avaliações

O presente estudo foi desenvolvido no Serviço de Atendimento Fonoaudiológico da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e no Laboratório de Biogenômica, do Departamento de Morfologia, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Santa Maria. As avaliações auditivas e confecção das lâminas histológicas foram efetuadas no período compreendido entre fevereiro e julho de 2009.

3.3 Considerações éticas

Foram avaliados somente aqueles indivíduos que concordaram com a realização dos procedimentos necessários para a execução da pesquisa e assinaram o Termo de

Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE I), após terem recebido maiores informações sobre o objetivo e metodologia do estudo proposto.

3.4 Amostra

A partir do conjunto de voluntários do referido projeto de pesquisa, composta por 1024 adultos jovens caucasianos (entre 18 e 32 anos), foi selecionado, através do processo de amostragem probabilística, um subgrupo de indivíduos. O tamanho da subamostra investigada foi estimado considerando um erro amostral de 5%, e um nível de confiança de 95% estando esse entre 56 a 69 sujeitos. Por esse motivo, foram incluídos 60 voluntários no estudo. No caso, 30 indivíduos tabagistas (denominado Grupo T) foram incluídos. Para critérios de comparação e sistematização do grupo estudado, foi adicionalmente selecionado um grupo controle de 30 indivíduos não tabagistas (denominado Grupo NT).

Os grupos foram corrigidos para gênero, idade (± 2 anos), perfil sócio-econômico e cultural e estilo de vida (ANEXO II). Os participantes receberam convite para participar do estudo via telefone e/ou e-mail.

Foram incluídos no Grupo T os sujeitos que referiram ter fumado no mínimo 100 cigarros nos últimos 90 dias.

3.5 Metodologia

Após as precedentes assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE I) e aplicação do instrumento de avaliação (ANEXO II), realizados durante a execução do projeto “Nutrigenética e Tabagismo: Estudos *In Vivo* e *Ex Vivo* da Dieta e Atividade Física na Modulação dos Efeitos Pró-Oxidantes do Fumo”, os indivíduos foram selecionados para compor os Grupos T e NT.

Todos os participantes foram submetidos a:

- a) *Anamnese* (APÊNDICE II): composta por perguntas fechadas de identificação, relativas aos sintomas auditivos, antecedentes pessoais e familiares, hábito de tabagismo, quantidade diária, marca de cigarro, tempo de exposição ao fumo.
- b) *Avaliação Audiológica Básica* (APÊNDICE III) composta da execução de:
 - Inspeção visual do meato acústico externo;
 - Audiometria Tonal Liminar por via aérea nas frequências de 250, 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 6000 e 8000Hz e por via óssea nas frequências de 500, 1000, 2000, 3000 e 4000Hz, quando necessário, com limiares pesquisados de forma descendente. Para execução da audiometria tonal liminar foi utilizado audiômetro digital de dois canais, marca Fonix, modelo FA-12, tipo I e fones auriculares tipo TDH-39P, marca Telephonics com calibração de acordo com a norma ISO 389-1991. Os indivíduos foram considerados normo-ouvintes quando a média de tons puros dos limiares de via aérea entre 500, 1000 e 2000 Hz, ficaram entre zero e 25dB, de acordo com Lloyd & Kaplan (1978).
 - Avaliação do Limiar de Reconhecimento de Fala (LRF), com palavras dissilábicas;
 - Verificação do Índice Percentual de Reconhecimento de Fala (IPRF), com palavras monossilábicas. Os resultados do IPRF deveriam estar entre 92 e 100% de acertos, indicando que o indivíduo não apresentou dificuldade para compreender a fala (JERGER, SPEAKS & TRAMMELL, 1968).
 - Medidas de Imatância Acústica: timpanometria e pesquisa dos reflexos acústicos contra e ipsilaterais. Para a execução das medidas de imatância acústica foi utilizado um analisador de orelha média INTERACOUSTIC AZ7, com fone TDH-39 e coxim MX-41, com tom-sonda de 220Hz à 70dBNA, e calibração segundo a norma ISO 389-1991. Os reflexos acústicos foram pesquisados nas frequências de 500, 1000, 2000 e 4000Hz. Os indivíduos deveriam apresentar Curva Timpanométrica do Tipo A, indicando mobilidade normal do sistema tímpano-ossicular (JERGER, 1970) e reflexos estapedianos presentes (JERGER & JERGER, 1989).

Os resultados foram anotados em protocolo padrão.

Caso algum indivíduo apresentasse alterações em qualquer um dos exames audiológicos seria encaminhado para avaliação com médico otorrinolaringologista.

d) Mensuração *das EOAEPD e avaliação do efeito de supressão das EOAEPD* (APÊNDICE IV). O registro das EOAEPD foi realizado dentro de cabine acusticamente tratada. O aparelho utilizado foi o Otoread Clínico da marca Interacoustics/Audiotest.

Na obtenção das EOAEPD (2F1-F2) foram utilizados dois tons puros na razão de $F2/F1=1,22$, onde F1 é apresentada na intensidade de 65dBNPS e F2 em 55dBNPS. Para medida das EOAEPD foram testadas as frequências de 1500, 2000, 3000, 4000 5000 e 6000Hz. Para as EOAEPD serem consideradas presentes, o critério da relação sinal/ruído utilizado foi de no mínimo 6dB.

A mensuração das EOAEPD foi executada primeiro na ausência e, após, na presença do ruído na orelha contralateral.

Foi utilizado como estímulo acústico supressor um ruído branco contralateral gerado por um audiômetro digital de dois canais, marca Fonix, modelo FA-12, tipo I e fones auriculares tipo TDH-39P, marca Telephonics, na intensidade de 60dBNA.

A fim de evitar manipulação da sonda das EOAEPD, o fone foi acoplado na orelha contralateral à captação das EOAEPD antes do início do teste.

O cálculo da supressão contralateral das EOAEPD foi obtido pela subtração do nível de resposta das EOAEPD com estimulação acústica contralateral do nível de resposta das EOAEPD sem estimulação acústica contralateral (DURANTE & CARVALLO, 2006). Valores negativos indicaram supressão das EOAEPD e valores positivos ou zero indicaram ausência de tal fenômeno. Quanto mais negativo o efeito de supressão, maior a atividade do SOCM.

As EOAPD foram mensuradas nas frequências de 2000, 3000, 4000, 5000 e 6000Hz. Considerou-se o efeito de supressão presente quando esse se manifestou em pelo menos três das cinco frequências testadas.

e) *Coleta de Amostra Sanguínea*: executada por farmacêutica, para posterior aplicação de um dos testes que averiguam danos ao DNA, O Teste Ensaio Cometa.

Com o paciente sentado em cadeira confortável e o braço escolhido para punção apoiado sobre uma mesa, posicionado em linha reta do ombro ao punho, sem o cotovelo estar dobrado e a palma da mão voltada para cima, de maneira que as veias

ficassem mais acessíveis, a farmacêutica selecionou o local escolhido para venopunção e realizou a assepsia da região valendo-se de algodão hidrófilo e álcool etílico volume 70%. Em seguida, garroteou o braço do voluntário, fazendo uso de um garrote de borracha, sem que o fluxo arterial fosse interrompido. O garrote não foi deixado no braço por mais de um minuto, pois isso acarretaria em edema, e foi retirado logo após terminar a venopunção. Para venopunção foram utilizadas seringas hipodérmicas sem agulha de 3 e 5ml da BD Plastipak® estéril (apirrogênio - atóxico, esterilizado a óxido de etileno) e agulhas hipodérmicas BD PrecisionGlide® 22 e 23G1 (0,70x25 e 0,60x25, respectivamente, apirrogênio - atóxico, esterilizado a óxido de etileno, parede fina bisel trifacetado). Os lacres da seringa e agulha foram retirados na frente do voluntário e em seguida, seringa e agulha foram conectadas. A farmacêutica realizou a punção e em seguida desconectou a agulha e transferiu imediatamente o sangue para tubo com anticoagulante de EDTA da Vacuette® de 2ml (K3E K3EDTA de tampa roxa e aro branco) e homogeneizou o sangue por inversão. O voluntário recebeu bandagem no local onde foi realizada a punção. Os tubos com amostra sanguínea foram revestidos com papel alumínio para evitar dano adicional ao DNA da amostra pela exposição à luz. Agulha e seringa foram descartadas em recipiente próprio para materiais perfurocortantes e infecto-contaminantes.

O Teste Cometa foi realizado de acordo com o método proposto por Singh et al (1988) e modificado por Collins et al (1995). Para cada indivíduo foram confeccionadas lâminas em duplicata. Todos os passos foram conduzidos sem luz direta para prevenir danos adicionais ao DNA. Para execução da técnica, foram misturados 5 μ L de amostra (leucócitos) com 90 μ L de 0,75% Agarose em um eppendorf. A solução foi adicionada em uma lâmina pré-coberta com 1% de agarose normal, e coberta por uma lamínula, que ficaram na geladeira por cinco minutos. Depois, a lamínula foi retirada cuidadosamente e a lâmina colocada em uma cuba com solução de lise (2,5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris-HCl, 1% Triton X-100 e 10% DMSO, pH 10,00) por um dia, a 4°C. As lâminas foram retiradas da solução de lise e lavadas com água destilada. Em seguida, foram colocadas em uma cuba horizontal contendo solução de eletroforese (1mM EDTA e 300mM NaOH, pH>13). As lâminas ficaram nessa solução por 20 minutos em repouso para permitir o desenovelamento do DNA, e posteriormente foi

realizada a eletroforese por 20 minutos a 25V e 300 mA. Após, as lâminas foram colocadas em uma cuba com solução neutralizadora (0,4M Tris-Base, pH 7,5) por cinco minutos. Em seguida, foram lavadas três vezes com água destilada e secaram até o outro dia (período de *over-night*) em temperatura ambiente. As lâminas foram reidratadas por cinco minutos e colocadas em uma cuba contendo solução fixadora (15% Ácido Tricloroacético, 5% Glicerol e 5% Sulfato de Zinco) por dez minutos. A seguir, foram lavadas três vezes e secaram em temperatura ambiente. Novamente foram reidratadas por cinco minutos e colocadas em uma cuba contendo solução corante por 25 minutos a 37°C. Para preparar a solução corante foram misturados 34ml da Solução B (0,2% Nitrato de Amônio, 0,2% Nitrato de Prata, 0,5% Ácido Tungstosilícico e 0,15% Formaldeído) com 66ml da Solução A (5% Carbonato de Sódio). Depois da coloração, as lâminas foram lavadas por três vezes em água destilada. A coloração foi interrompida colocando as lâminas em solução de Ácido Acético 1%. Após, as lâminas secaram em temperatura ambiente.

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico binocular da marca Olympus modelo CX40, com aumento de 400 vezes. Foram contadas, para cada amostra, 100 células (50 por lâmina). As cinco categorias usadas para classificação do Cometa são aquelas propostas por García (2004) e mostradas na Figura 01, a seguir. Com base nos resultados obtidos foi estabelecido o índice de dano ao DNA que indica genotoxicidade obtido através da divisão do número total de núcleos que apresentaram algum dano pelo número total de núcleos sem danos no DNA. Uma vez que foram feitas duas lâminas para cada indivíduo onde foram contados 50 núcleos por lâmina e que ambas as lâminas foram analisadas por dois observadores independentes, o índice de dano considerou a média dos danos observados pelos analisadores para 100 núcleos por indivíduo.

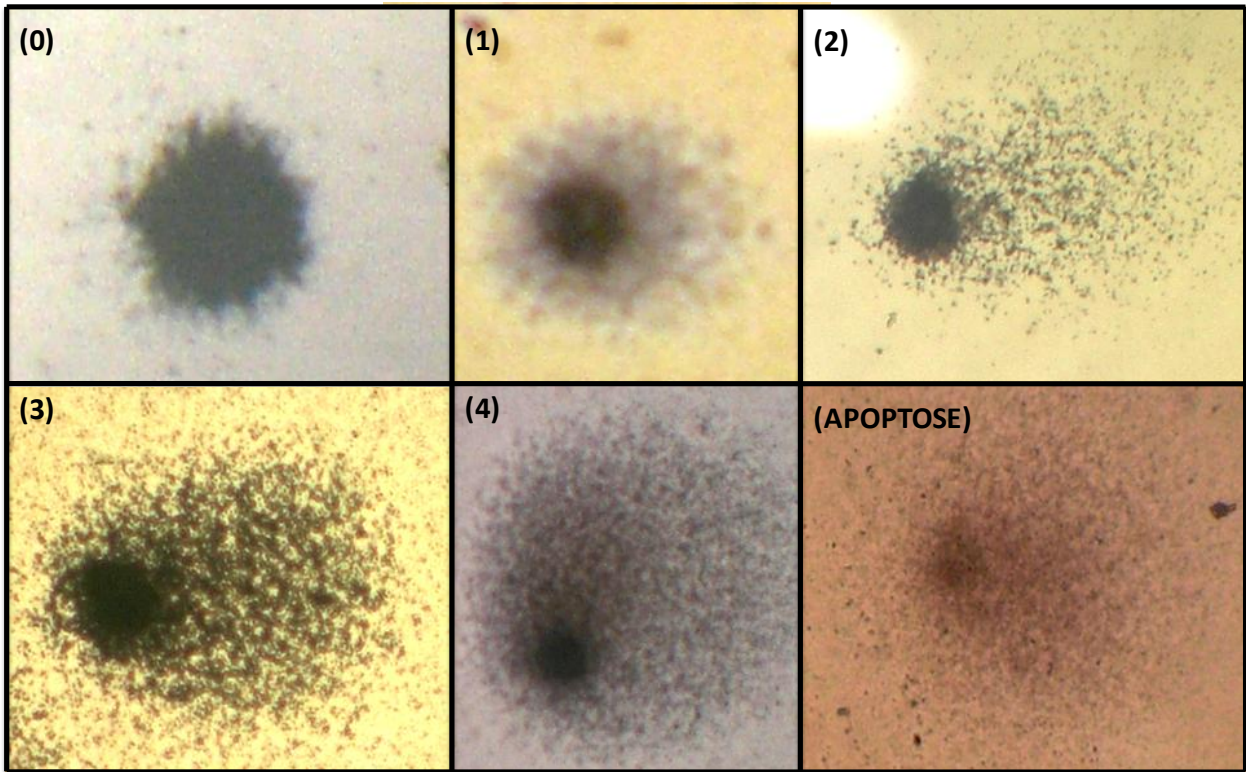


Figura 1 – Classificação do Dano ao DNA dos indivíduos analisados. Quanto maior o nível de dano maior o número a ele atribuído. Classe 0 representa células sem dano e classe 4 o mais alto dano.

Os resultados foram anotados em protocolo padrão (APÊNDICE V).

f) Coleta de amostra de células epiteliais descamadas da mucosa oral: Coletadas para posterior realização do teste Análise dos Micronúcleos, teste que avalia danos ao DNA. Para coleta de amostra de células epiteliais, foi solicitado que o sujeito mordiscasse levemente as bochechas para soltura das células e em seguida realizasse raspagem com uma espátula de madeira nas duas bochechas. A espátula contendo material celular foi colocada pelo sujeito em um tubo de ensaio cônico, contendo de 3 a 5ml de Solução Fisiológica 0,9%NaCl gelada.

Em seguida, os tubos de ensaio foram centrifugados por 10 minutos a 1000RPM. Para lavagem das células, a solução fisiológica foi trocada, cuidando para que não fossem retiradas as células contidas no fundo do tubo de ensaio. A solução foi homogeneizada com as células, utilizando pipeta Pasteur, e centrifugada novamente. O procedimento de lavagem das células/centrifugação foi repetido duas vezes. Em

seguida, foi acrescentado 1ml de solução fisiológica, homogeneizado e distribuído em duas lâminas (500 μ L em cada), pois foram confeccionadas em duplicata para cada indivíduo da amostra. As lâminas secaram em temperatura ambiente. Após, foi realizada a coloração das mesmas, utilizando o Kit Panótico de Coloração da marca Laborclin.

Depois de seco, o material foi observado em microscópio óptico binocular da marca Olympus, modelo CX40, com aumento de 400x para contagem dos micronúcleos presentes e posterior análise dos dados. Foram contadas 1000 células (500 por lâmina), classificados conforme demonstrado na Figura 02.

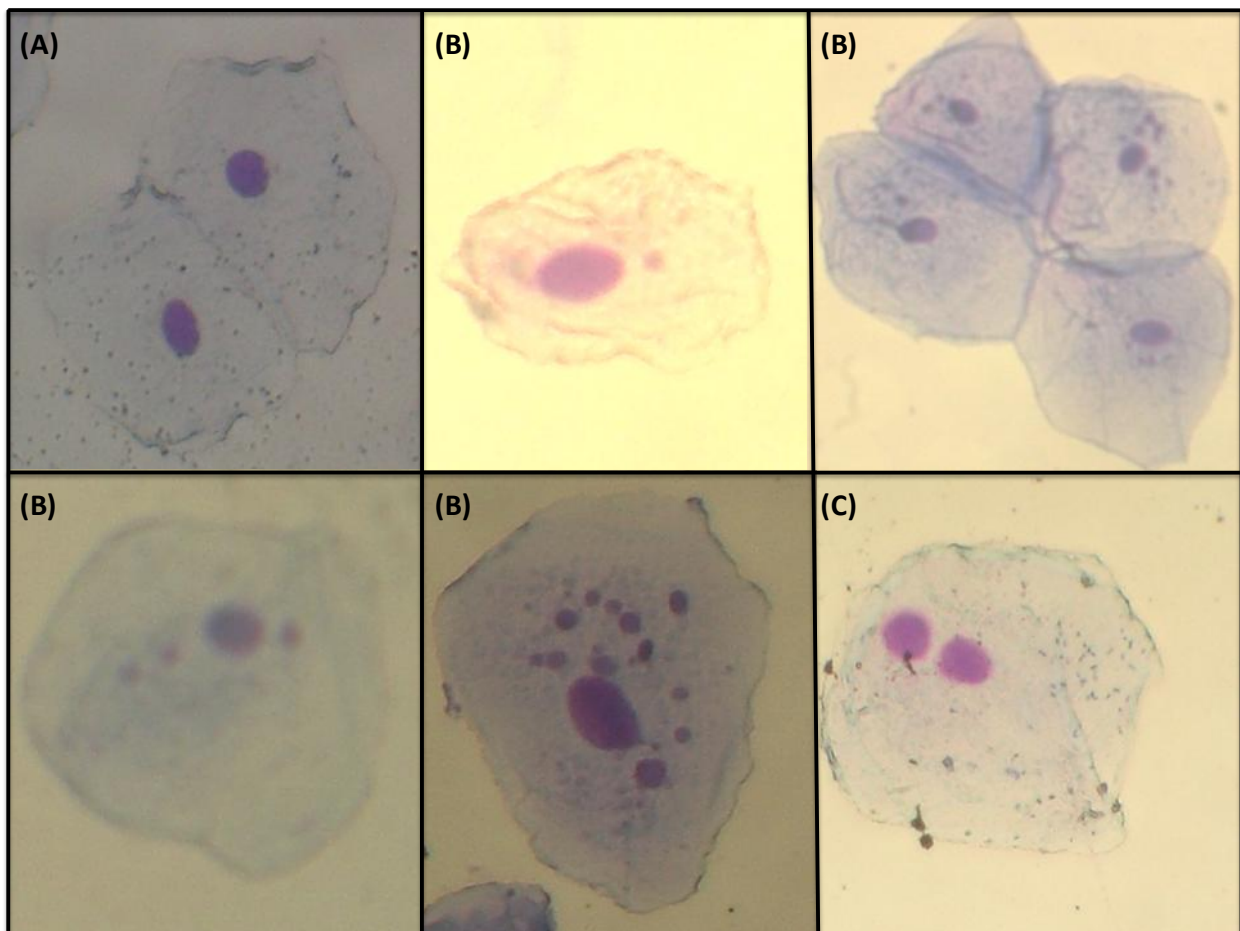


Figura 02 – Teste dos Micronúcleos dos indivíduos analisados: (A) Célula sem micronúcleos; (B) Células com um ou mais micronúcleos; (C) Célula binucleada.

Os resultados foram anotados em protocolo padrão (APÊNDICE VI).

3.6 Análise Estatística

Para os artigos de pesquisa oriundos desta dissertação, os dados foram submetidos à análise estatística através do programa SPSS versão 13.0. Os testes utilizados encontram-se descritos nos respectivos artigos.

4 ARTIGO DE PESQUISA

RELAÇÃO DO TABAGISMO COM A AUDIÇÃO E AÇÃO GENOTÓXICA EM ADULTOS JOVENS

Relation of smoking with hearing and genotoxic action in young adults

4.1 Resumo

Introdução: estudos descreveram associação positiva entre tabagismo e perda da audição e a principal alteração associada ao aumento do estresse oxidativo via tabagismo inclui danos genotóxicos. Objetivos: investigar a relação do tabagismo com a função coclear e se tal influência estaria associada com a genotoxicidade causada pelo tabaco. Material e método: estudo do tipo caso-controle, prospectivo-clínico, quantitativo que comparou os achados da amplitude das emissões otoacústicas produto de distorção (EOAEPDs) e limiares auditivos entre 30 tabagistas (T) e 30 não tabagistas (NT) adultos jovens (18 a 32 anos) normo-ouvintes e a possível associação com taxas de danos ao DNA que indicam genotoxicidade do tabaco. Resultados: foram observadas diferenças estatisticamente significativas na frequência de 6000Hz da orelha do lado direito, ocorrendo média significativamente maior no grupo T ($12,33 \pm 11,35$ dB) do que no grupo NT ($7,00 \pm 6,64$ dB) ($p=0,030$); não foi constatada associação entre o tempo de adição ao fumo e limiares auditivos; indivíduos que referiram fumar 20 ou mais cigarros ao dia, apresentaram limiares auditivos maiores na frequência de 2000Hz denotando diferenças estaticamente significativas ($p=0,05$); amplitude de EOAEPDs de tabagistas e não tabagistas foi dependente do gênero, nos fumantes do gênero masculino a amplitude apresentou-se significativamente menor que nos não fumantes, nas frequências de 4000 e 6000Hz na orelha do lado esquerdo; tabagistas apresentaram um número médio de danos ao DNA significativamente maior que os não tabagistas, evidenciado pelo teste Ensaio Cometa; indivíduos tabagistas com $ID \geq 0,13$ apresentaram limiares auditivos piores nas frequências de 8000Hz na orelha do lado direito e 4000Hz na orelha do lado esquerdo. Conclusões: foi possível observar que adultos jovens tabagistas apresentam sinais de alteração funcional do sistema auditivo, evidenciado pelos limiares auditivos mais elevados em determinadas frequências e pela redução da amplitude das EOAEPD e danos ao DNA, evidenciado pelo Ensaio Cometa.

Descritores: audição; genotoxicidade; tabagismo; audiometria.

4.2 Abstract

Introduction: Studies have described positive association between smoking and hearing loss and the main change associated with increased oxidative stress by smoking include genotoxic damage. **Objectives:** To investigate the relationship between smoking and the cochlear function and whether such influence would be associated with the genotoxicity caused by tobacco. **Methods:** a case-control, prospective-clinical, quantitative study, that compared the findings of the amplitude of the Distortion Product Otoacoustic Emissions (DPOEA) and hearing thresholds between 30 smokers (T) and 30 nonsmokers (NT) young adults (18 to 32 years) with normal hearing and possible association with rates of DNA damage indicating genotoxicity of tobacco. **Results:** We observed statistically significant differences in frequency of 6000Hz of the right ear, occurring an average significantly higher in group T (12.33 ± 11.35 dB) than in the NT group (7.00 ± 6.64 dB) ($p = 0.030$); no association was found between the time of addiction to smoking and hearing thresholds; individuals who reported smoking 20 or more cigarettes a day had higher auditory thresholds at 2000Hz showing statistically significant differences ($p = 0.05$); DPOEA amplitude of smokers and nonsmokers were dependent on gender, the male smokers the range was significantly lower than non-smokers, the frequencies of 4000 and 6000Hz in the left ear; smokers had a median DNA damage significantly higher than non-smokers, as evidenced by Assay Comet; smokers with ID ≥ 0.13 had worse hearing thresholds in the frequencies of 8000Hz in the right ear and 4000Hz in the left ear. **Conclusions:** we observed that young adult smokers have signs of functional impairment of the auditory system, demonstrated by higher hearing thresholds at specific frequencies and by the amplitude reduction of DPOEA and DNA damage, evidenced by the Comet Assay.

Key words: hearing; genotoxicity; smoking; audiometry.

4.3 Introdução

Dados epidemiológicos sobre perda auditiva no Brasil ainda são escassos, porém conforme estudos realizados em países desenvolvidos como o de Agrawal et al

(2008) aproximadamente 30 milhões de americanos apresentam algum grau de perda auditiva. Para a *American Speech–Language–Hearing Association* - ASHA (2006), 80% desses casos são irreversíveis. Isto se deve a inúmeros fatores, tais como: exposição a ruído intenso, ingestão de medicamentos ototóxicos, alterações metabólicas e circulatórias, infecções, traumas de várias naturezas, hereditariedade e inalação de substâncias tóxicas. Dentre as substâncias tóxicas inaladas, o tabaco está incluído.

Estima-se que a prevalência de tabagismo no Brasil seja de 12,9% a 25,2% para a população em geral, conforme dados do Ministério da Saúde Brasileiro de 2004. Infelizmente, não há dados brasileiros quem estimem a prevalência do tabagismo em adultos jovens, mas de acordo com Sharabi (2002) 32% dos adultos jovens americanos são tabagistas.

O tabagismo, que antigamente era visto como um estilo de vida é, atualmente, reconhecido como uma dependência química que expõe os indivíduos a inúmeras substâncias tóxicas que causam lesões crônicas no organismo. Conforme a *World Health Organization* – WHO (2007) o total de óbitos devido ao uso do tabaco atinge hoje a cifra de 4,9 milhões de óbitos anuais, o que corresponde a mais de 10 mil mortes diárias.

Alguns estudos observaram associação positiva entre tabagismo e perda da audição (NOORHASSIM & RAMPAL, 1998; CRUICKSHANKS et al, 1998; SHARABI et al, 2002; NOMURA et al, 2005; FERRITE & SANTANA, 2005; NEGLEY et al, 2007; AGRAWAL et al, 2009; OLIVEIRA & LIMA, 2009). Porém, a maior parte desses estudos incluiu indivíduos de todas as faixas etárias, o que dificulta a análise do efeito do tabaco, uma vez que idosos apresentam muitas co-morbidades e mais riscos para o desenvolvimento de problemas auditivos. Maffei & Miani (1962), que fizeram os primeiros relatos de que fumar pode afetar os limiares auditivos, propuseram que a influência negativa do tabaco na audição aconteceria através dos mecanismos associados ao aumento do estresse oxidativo e da diminuição do suprimento vascular do sistema auditivo. Adicionalmente, Browing, Gatehouse & Lowe (1986) afirmaram que o tabaco pode afetar o suprimento sanguíneo coclear, pois aumenta a viscosidade do sangue e reduz o oxigênio disponível nas trocas vasculares periféricas e esses efeitos são identificados na etiologia de lesões cocleares.

A audiometria tonal liminar e as emissões otoacústicas (EOAs) são testes que permitem avaliar a função coclear. Os limiares auditivos possibilitam determinar modificações morfológicas na cóclea, incluindo a presença de morte celular. Já as EOAs permitem avaliar especificamente a funcionalidade da via auditiva até as células ciliadas externas da cóclea e demonstram alterações das respostas antes que as mesmas sejam registradas no limiar auditivo do indivíduo (KEMP, 1988).

Genotoxicidade é a capacidade que algumas substâncias têm de induzir alterações no material genético de organismos a elas expostos. O material genético humano é composto pelo Ácido Desoxirribonucleíco (convencionalmente chamado de DNA, *Deoxyribose Nucleic Acid* – DNA).

A principal alteração associada ao aumento do estresse oxidativo via tabagismo inclui danos nas moléculas de DNA das células (WUNSCH FILHO & GATTAS, 2001; ARBOLEDA-MORENO et al, 2004; FREITA et al, 2005; MEIRELES et al, 2006). Tais danos podem ser tão extensos que induzem a morte celular ou mesmo a ocorrência de mutações que podem desencadear processos carcinogênicos. Existem testes específicos capazes de avaliar Danos ao DNA. Dentre esses, destacam-se o Teste de Genotoxicidade “Ensaio Cometa” e a “Análise dos Micronúcleos”.

Conforme Silva et al (2003), a Técnica do Ensaio Cometa (eletroforese em gel de células individuais) tem ampla utilização para testar a indução de danos e reparos do DNA. As vantagens desta técnica incluem a sua simplicidade, rápida realização e sua alta sensibilidade para vários tipos de danos ao DNA.

De acordo com Fenech (2000) os ensaios de micronúcleos têm emergido como um dos métodos preferenciais para avaliar os danos de cromossomos porque eles permitem que tanto a perda de cromossomos como a sua ruptura possam ser medidos de maneira confiável. Micronúcleos são núcleos pequenos, separados e adicionais ao núcleo principal das células, produzidos durante a telófase da mitose por perda de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros.

Por esse motivo, tanto o ensaio cometa quanto o de micronúcleos são internacionalmente aceitos como parte da bateria de testes recomendada para a avaliação de um dado potencial mutagênico.

Considerando que o tabagismo pode causar danos ao DNA e estresse oxidativo (VAN CAMPEN et al 2002) que podem, por sua vez, alterar a fisiologia coclear e levar a danos auditivos, o presente estudo teve como principal objetivo investigar a relação do tabagismo com a função coclear e se tal influência estaria associada com a genotoxicidade causada pelo tabaco.

4.4 Material e Método

Esta pesquisa é parte do Projeto de Pesquisa “Nutrigenética e Tabagismo: Estudos *In Vivo* e *Ex Vivo* da Dieta e Atividade Física na Modulação dos Efeitos Pró-Oxidantes do Fumo”, aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria sob o Número 014.602.430.00-07 (ANEXO I).

O delineamento do estudo foi do tipo caso-controle, prospectivo-clínico, quantitativo, contemporâneo que comparou os achados da amplitude das emissões otoacústicas produto de distorção (EOAEPD) e limiares auditivos entre tabagistas e não tabagistas normo-ouvintes e a possível associação com taxas de danos ao DNA que indicam genotoxicidade do tabaco.

A partir do conjunto de voluntários do referido projeto de pesquisa, composta por 1024 adultos jovens caucasianos (entre 18 e 32 anos), foi selecionado, através do processo de amostragem probabilística, um subgrupo de indivíduos. O tamanho da subamostra investigada foi estimado considerando um erro amostral de 5%, e um nível de confiança de 95% estando este entre 56 a 69 sujeitos. Por esse motivo, foram incluídos 60 voluntários no estudo. No caso, 30 indivíduos tabagistas (denominado Grupo T) foram incluídos. Para critérios de comparação e sistematização do grupo estudado, foi adicionalmente selecionado um grupo controle de 30 indivíduos não tabagistas (denominado Grupo NT).

Os grupos foram corrigidos para gênero, idade (± 2 anos), perfil sócio-econômico e cultural e estilo de vida (ANEXO II). Os participantes receberam convite para participar do estudo via telefone e/ou e-mail.

Os critérios de inclusão foram:

- apresentar limiares auditivos normais (LLOYD & KAPLAN, 1978);
- ter fumado mais de 100 cigarros nos últimos 90 dias para serem considerados tabagistas.

Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE I), todos os participantes foram submetidos a:

a) *Anamnese* (APÊNDICE II): composta por perguntas fechadas de identificação, relativas aos sintomas auditivos, antecedentes pessoais e familiares, hábito de tabagismo, quantidade diária, marca de cigarro, tempo de exposição ao fumo.

b) *Avaliação Audiológica Básica* (APÊNDICE III) composta da execução de:

- Inspeção visual do meato acústico externo;
- Audiometria Tonal Liminar por via aérea nas frequências de 250, 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 6000 e 8000Hz e por via óssea nas frequências de 500, 1000, 2000, 3000 e 4000Hz, quando necessário, com limiares pesquisados de forma descendente. Para execução da audiometria tonal liminar foi utilizado audiômetro digital de dois canais, marca Fonix, modelo FA-12, tipo I e fones auriculares tipo TDH-39P, marca Telephonics com calibração de acordo com a norma ISO 389-1991. Os indivíduos foram considerados normo-ouvintes quando a média de tons puros dos limiares de via aérea entre 500, 1000 e 2000 Hz, ficaram entre zero e 25dB, de acordo com Lloyd e Kaplan (1978).

- Avaliação do Limiar de Reconhecimento de Fala (LRF), com palavras dissilábicas;

- Verificação do Índice Percentual de Reconhecimento de Fala (IPRF), com palavras monossilábicas. Os resultados do IPRF deveriam estar entre 92 e 100% de acertos, indicando que o indivíduo não apresentou dificuldade para compreender a fala (JERGER, SPEAKS & TRAMMELL, 1968).

- Medidas de Imitância Acústica: timpanometria e pesquisa dos reflexos acústicos contra e ipsilaterais. Para a execução das medidas de imitância acústica foi utilizado um analisador de orelha média INTERACOUSTIC AZ7, com fone TDH-39 e coxim MX-41, com tom-sonda de 220Hz à 70dBNA, e calibração segundo a norma ISO 389-1991. Os reflexos acústicos foram pesquisados nas frequências de 500, 1000,

2000 e 4000Hz. Os indivíduos deveriam apresentar Curva Timpanométrica do Tipo A, indicando mobilidade normal do sistema tímpano-ossicular (JERGER,1970) e reflexos estapedianos presentes (JERGER & JERGER, 1989).

Os resultados foram anotados em protocolo padrão.

d) *EOAEPD* (APÊNDICE IV): foi executado dentro de cabine acusticamente tratada. O aparelho utilizado foi o Otoread Clínico da marca Interacoustics/Audiotest. Todos os testes foram analisados por orelha.

Na mensuração das *EOAEPD* foram utilizados dois tons puros na razão de $F2/F1=1,22$, onde $F1$ é apresentada na intensidade de 65dBNPS e $F2$ em 55dBNPS. Foram testadas as frequências de 1500, 2000, 3000, 4000, 5000 e 6000Hz. Considerou-se presença de *EOAEPD* quando a relação sinal/ruído foi igual ou superior a 6dB.

e) *Coleta de Amostra Sanguínea*: executada por farmacêutica, para posterior aplicação de um dos testes que averiguam danos ao DNA, O Teste Ensaio Cometa.

O Teste Cometa foi realizado de acordo com o método proposto por Singh et al (1988) e modificado por Collins et al (1995). Para cada indivíduo foram confeccionadas lâminas em duplicata. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico binocular da marca Olympus modelo CX40, com magnificação de 400 vezes. Foram contadas, para cada amostra, 100 células (50 por lâmina). As cinco categorias usadas para classificação do Cometa são aquelas propostas por García (2004) e mostradas na Figura 01, a seguir. Com base nos resultados obtidos foi estabelecido o índice de dano ao DNA (ID), que indica genotoxicidade obtido através da divisão do número total de núcleos que apresentaram algum dano pelo número total de núcleos sem danos no DNA. Uma vez que foram feitas duas lâminas para cada indivíduo onde foram contados 50 núcleos por lâmina e que ambas as lâminas foram analisadas por dois observadores independentes, para o índice de dano foi considerado a média dos danos observados pelos dois analisadores para 100 núcleos por indivíduo.

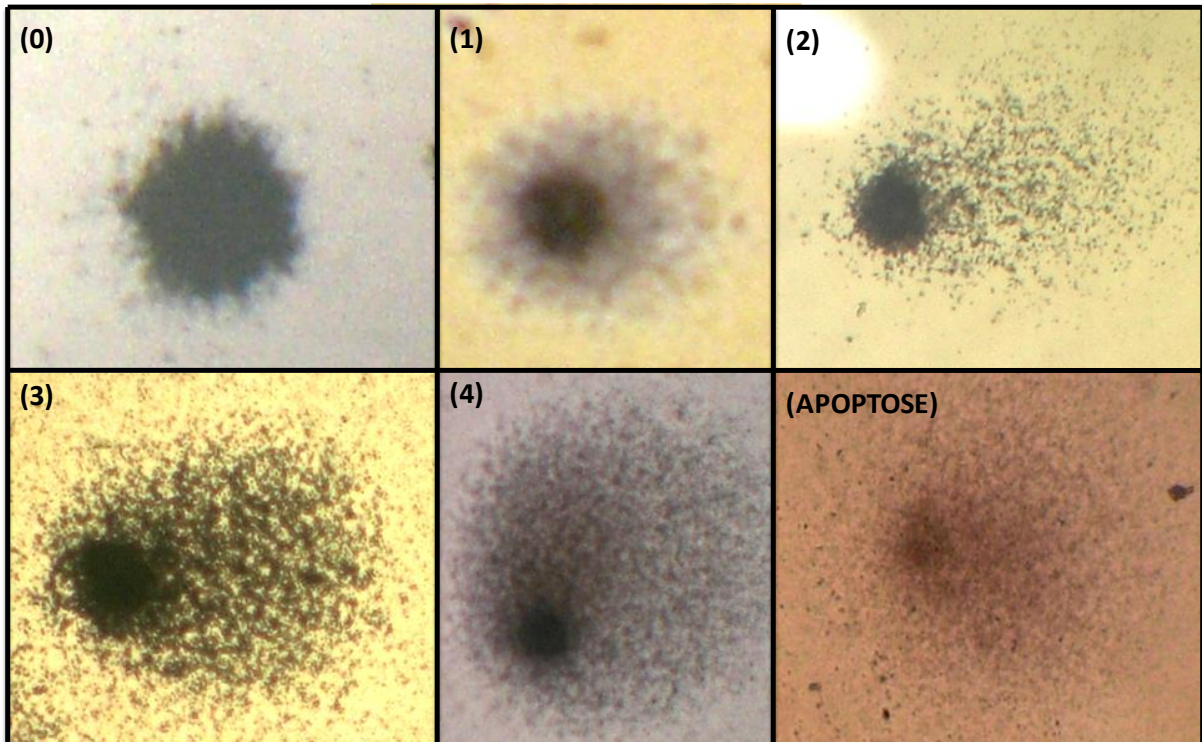


Figura 1 – Classificação do Dano ao DNA dos indivíduos analisados. Quanto maior o nível de dano maior o número a ele atribuído. Classe 0 representa células sem dano e classe 4 o mais alto dano.

Os resultados foram anotados em protocolo padrão (APÊNDICE V).

f) *Obtenção da amostra de células epiteliais descamadas da mucosa oral:* coletadas para posterior realização do teste Análise dos Micronúcleos, teste que avalia danos ao DNA. Para coleta de amostra de células epiteliais, foi solicitado que o sujeito mordiscasse levemente as bochechas para soltura das células e em seguida realizasse raspagem com uma espátula de madeira nas bochechas. A espátula contendo material celular foi colocada pelo sujeito em um tubo de ensaio cônico, contendo de 3 a 5ml de Solução Fisiológica 0,9%NaCl resfriada a 6°C.

Em seguida, os tubos de ensaio foram centrifugados por 10 minutos a 1000RPM. Para lavagem das células, a solução fisiológica foi trocada, cuidando para que não fossem retiradas as células contidas no fundo do tubo de ensaio. A solução foi homogeneizada com as células, utilizando pipeta Pasteur e centrifugada novamente. O procedimento de lavagem das células/centrifugação foi repetido duas vezes. Em seguida, foi acrescentado 1ml de solução fisiológica, homogeneizado e distribuído em

duas lâminas (500µL em cada), pois foram confeccionadas em duplicata para cada indivíduo da amostra. As lâminas secaram em temperatura ambiente. Após, foi realizada a coloração das mesmas, utilizando o Kit Panótico de Coloração da marca Laborclin.

Depois de seco, o material foi observado em microscópio óptico binocular da marca Olympus, modelo CX40, com magnificação de 400x para contagem dos micronúcleos presentes e posterior análise dos dados. Foram contadas 1000 células (500 por lâmina) e os micronúcleos classificados, conforme elucidação na Figura 02.

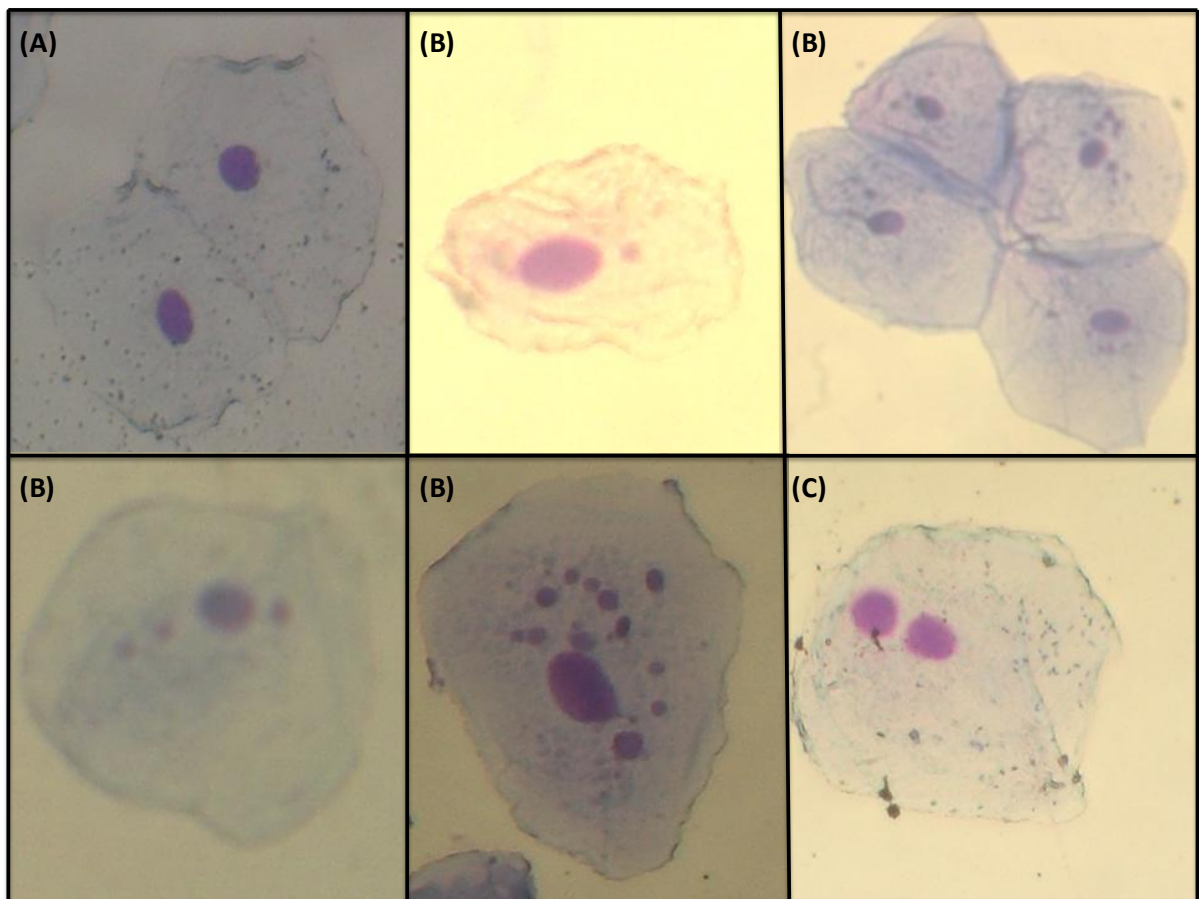


Figura 02 – Teste dos Micronúcleos dos indivíduos analisados: (A) Célula sem micronúcleos; (B) Células com um ou mais micronúcleos; (C) Célula binucleada.

Os resultados foram anotados em protocolo padrão (APÊNDICE VI).

4.4.1 Análise Estatística

Após a coleta dos dados, os resultados obtidos neste estudo foram submetidos à análise estatística. Foi utilizado o programa SPSS versão 13.0. Os dados quantitativos foram analisados por teste paramétrico Student t. A fim de verificar se diferentes níveis de genotoxicidade avaliada por Teste Ensaio Cometa estariam relacionados com tabagismo e audição, foi realizada uma análise de distribuição de percentil dos valores dos índices de dano de DNA. A seguir, o índice de dano do percentil 50 foi utilizado como ponto de corte. Os indivíduos foram então recategorizados segundo maior e menor dano e os indicadores de audição foram comparados nestes dois grupos considerando a influência do tabagismo. Foram consideradas associações significativas aquelas cujo $p \leq 0.05$.

4.5 Resultados

4.5.1 Caracterização da amostra

No estudo foram incluídos 15 indivíduos do gênero masculino e 15 do gênero feminino em cada grupo com uma idade média de $24,96 \pm 3,69$ anos no Grupo T e $24,76 \pm 3,73$ anos no Grupo NT. Como previsto estas diferenças não foram significativas entre os dois grupos ($p=0,83$).

4.5.2 Tempo de tabagismo, quantidade diária e marca de cigarro

Dos 30 indivíduos tabagistas avaliados, as Figuras 03 e 04 apresentam, respectivamente, as porcentagens relativas ao tempo de tabagismo e quantidade diária de cigarros. Como pode ser observado na Figura 03, da amostra de tabagistas, em que 70% relatou ter fumado por um período igual ou superior a seis anos. A análise da distribuição da quantidade diária de cigarros fumados, que é apresentada na Figura 04, indicou que a maioria fuma uma quantidade de 10 a 20 cigarros ao dia. Dez marcas de cigarro foram mencionadas, destas, predominaram o consumo de três, sendo: Marlboro Light (®Phillip Morris Brasil Indústria e Comércio Ltda), Carlton Vermelho (®Souza Cruz S/A) e Free Vermelho (®Souza Cruz S/A). O teor de nicotina das marcas consumidas variou de 0,5 a 1,0mg, com uma média de $0,69 \pm 0,12$ de teor de nicotina por cigarro fumado.

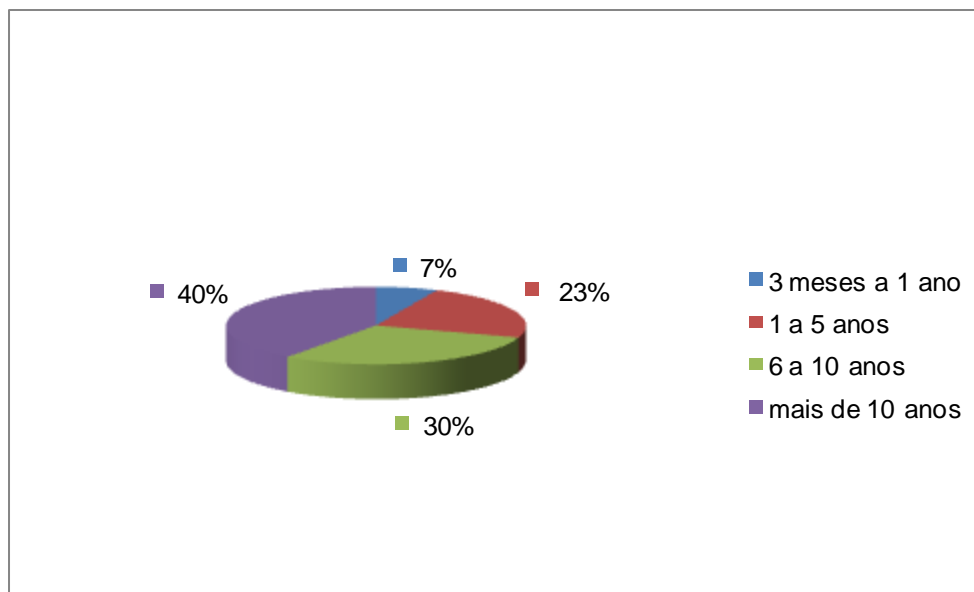


Figura 03 – Distribuição do grupo dos tabagistas quanto ao tempo de adição ao tabaco.

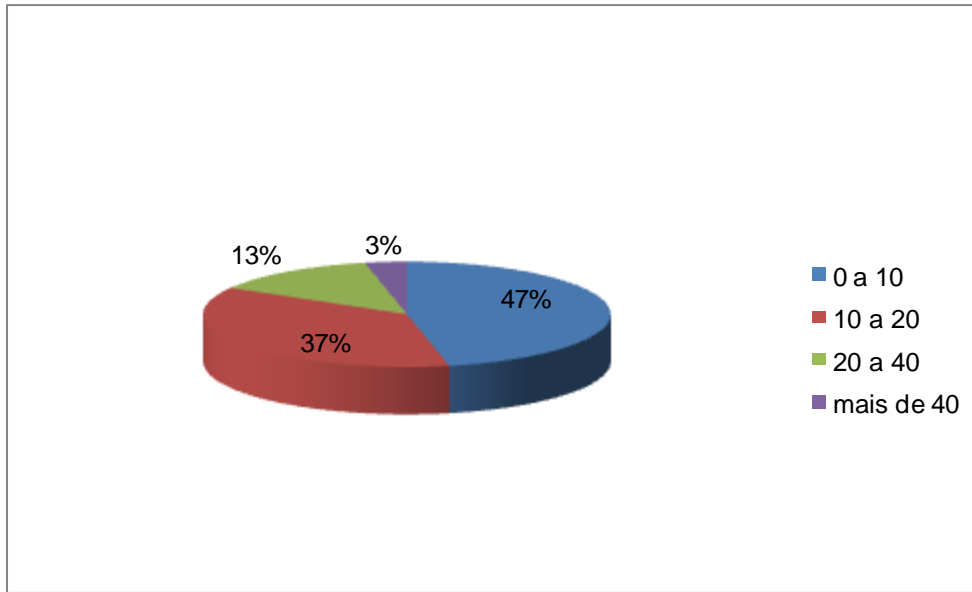


Figura 04 – Distribuição do grupo dos tabagistas quanto à quantidade diária de cigarros.

4.5.3 Limiares auditivos de tabagistas e não tabagistas

A Figura 05 apresenta a análise dos limiares auditivos por lado da orelha nos dois grupos investigados. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas na frequência de 6000Hz da orelha do lado direito, ocorrendo média significativamente maior no grupo T ($12,33 \pm 11,35$ dB) do que no grupo NT ($7,00 \pm 6,64$ dB) ($p=0,030$). As demais frequências investigadas apresentaram médias similares tanto em tabagistas, quanto em não tabagistas.

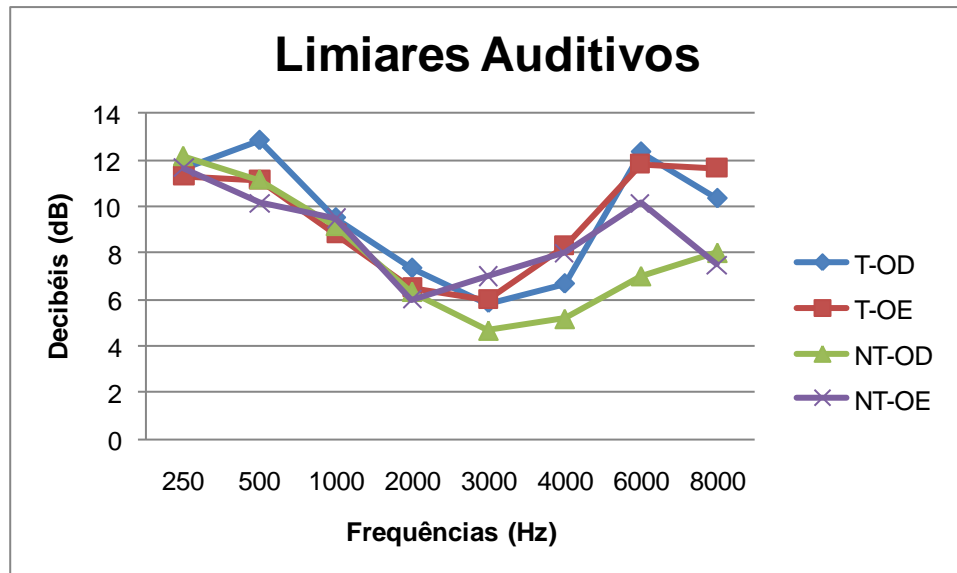


Figura 05 – Limiars auditivos de tabagistas e não tabagistas.

T-OD = média dos limiars auditivos dos tabagistas na orelha do lado direito; T-OE = média dos limiars auditivos dos tabagistas na orelha do lado esquerdo; NT-OD = média dos limiars auditivos dos não tabagistas na orelha do lado direito; NT-OE = média dos limiars auditivos dos não tabagistas na orelha do lado esquerdo; dB = decibéis; Hz = Hertz.

Não foi constatada associação entre o tempo de adição ao fumo e limiars auditivos em nenhuma das frequências testadas tanto na orelha do lado direito, quanto na orelha do lado esquerdo. Análise da correlação entre nicotina inalada por dia (estimada pela quantidade de nicotina por cigarro e a quantidade de cigarros fumados ao dia) e os limiars auditivos, não mostrou associação estatística positiva. Todos estes resultados foram independentes do gênero, ou seja, foram similares entre os indivíduos dos gêneros masculino e feminino.

Já a análise da associação entre a quantidade diária de cigarros consumidos e limiars auditivos mostrou que indivíduos que referiram fumar 20 ou mais cigarros ao dia, apresentaram limiars auditivos maiores na frequência de 2000Hz na orelha do lado direito ($10,00 \pm 7,41$ dB) em relação aos que relataram fumar menos de 20 cigarros ao dia ($4,64 \pm 6,02$ dB) e os não fumantes ($6,33 \pm 5,56$ dB) denotando diferenças estaticamente significativas ($p=0,05$). Nas demais comparações, entre fumantes e não fumantes, nas outras frequências analisadas, não foram observadas diferenças

significativas. Esses resultados foram independentes do gênero, ou seja, foram similares entre os indivíduos dos gêneros masculino e feminino.

4.5.4 Amplitude das emissões otoacústicas evocadas produto de distorção em tabagistas e não tabagistas

Para esta análise foram selecionados os valores de amplitude, de ambas as orelhas, nas frequências de 2000, 4000 e 6000Hz. Foi observada apenas discreta redução da amplitude das EOAEPD dos tabagistas (Tabelas 01 e 02). Entretanto, estas diferenças não foram estatisticamente significativas.

Tabela 01 – Amplitudes das emissões otoacústicas evocadas produto de distorção de tabagistas e não tabagistas segundo a frequência na orelha do lado direito.

Frequência (Hz)	T		NT		<i>p</i> -valor
	Média (dB NPS)	±DP	Média (dB NPS)	±DP	
2000	23,00	7,09	24,00	6,71	0,577
4000	19,96	7,07	21,13	6,03	0,497
6000	21,78	7,49	24,26	7,23	0,205

T = tabagistas; NT = não tabagistas; Hz = Hertz; dB NPS = decibéis nível de pressão sonora; DP = desvio-padrão.

Tabela 02 – Amplitudes das emissões otoacústicas evocadas produto de distorção de tabagistas e não tabagistas segundo a frequência na orelha do lado esquerdo.

Frequência (Hz)	T		NT		<i>p</i> -valor
	Média (dB NPS)	±DP	Média (dB NPS)	±DP	
2000	23,76	6,39	23,83	6,39	0,967
4000	18,93	6,38	20,86	5,33	0,111
6000	22,44	7,57	25,83	5,42	0,052

T = tabagistas; NT = não tabagistas; Hz = Hertz; dB NPS = decibéis nível de pressão sonora; DP = desvio-padrão.

A comparação entre a amplitude de EOAEPD de tabagistas e não tabagistas foi dependente do gênero. Enquanto no gênero feminino, as amplitudes foram similares entre fumantes e não fumantes, nos fumantes do gênero masculino a amplitude apresentou-se significativamente menor que nos não fumantes nas frequências de 4000 e 6000Hz na orelha do lado esquerdo (Figura 06).

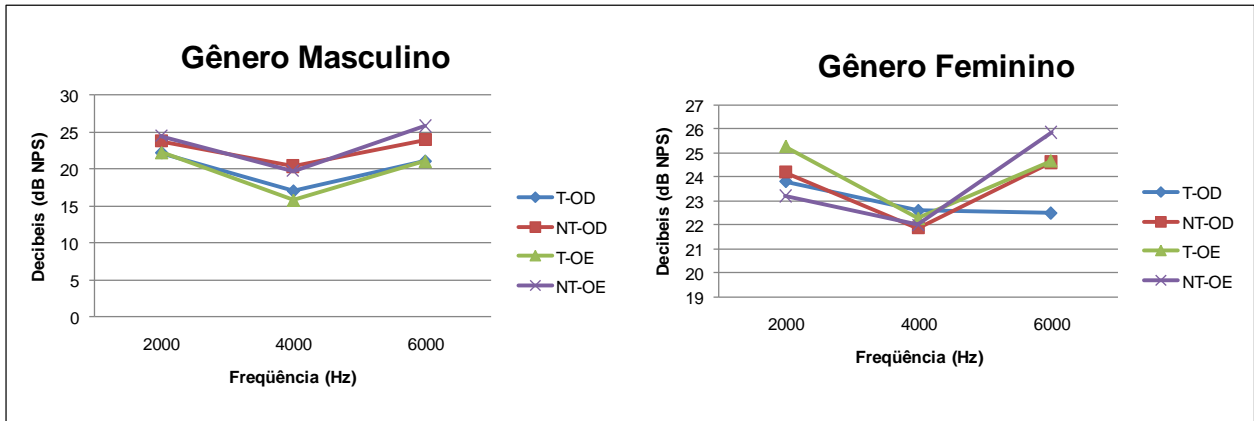


Figura 06 – Amplitude das emissões otoacústicas evocadas produto de distorção de tabagistas e não tabagistas, segundo o gênero, a frequência e o lado da orelha.

T-OD = média da amplitude das EOAEPD dos tabagistas na orelha do lado direito; T-OE = média da amplitude das EOAEPD dos tabagistas na orelha do lado esquerdo; NT-OD = média da amplitude das EOAEPD dos não tabagistas na orelha do lado direito; NT-OE = média da amplitude das EOAEPD dos não tabagistas na orelha do lado esquerdo; dB NPS = decibel (s) nível de pressão sonora; Hz = Hertz.

4.5.5 Testes de avaliação de genotoxicidade em tabagistas e não tabagistas

Diferenças significativas no índice de dano ao DNA dos tabagistas analisados quando comparados aos não tabagistas foram observadas através do Ensaio Cometa, que avalia a genotoxicidade (Figura 07). No caso, os tabagistas apresentaram um número médio de danos ao DNA significativamente maior que os não tabagistas. O Grupo T apresentou um índice de genotoxicidade de $0,14 \pm 0,08$ e o Grupo NT apresentou um índice de genotoxicidade de $0,09 \pm 0,07$ ($p=0,00382$).

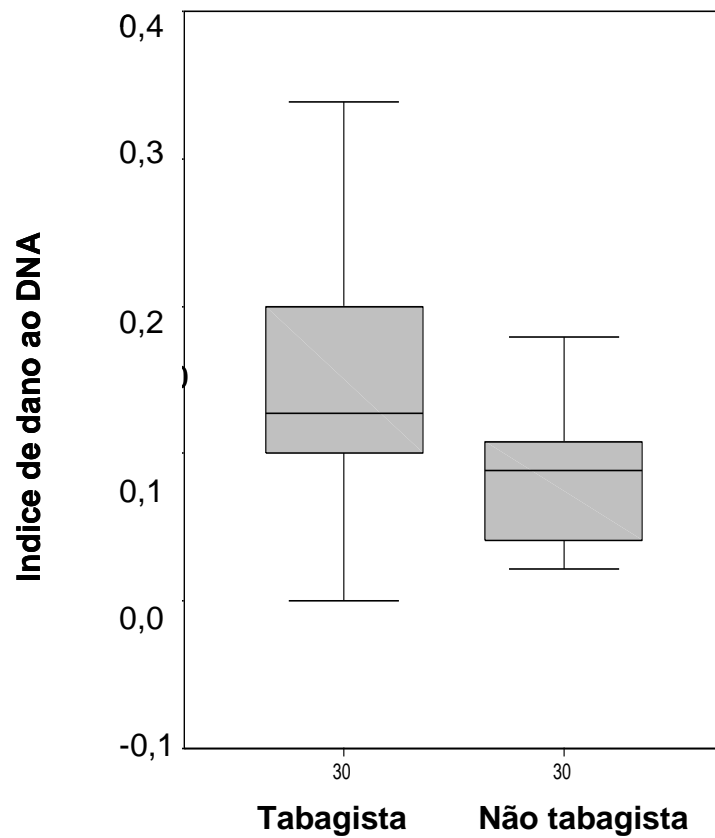


Figura 07 – Índice médio de dano ao DNA por Ensaio Cometa entre tabagistas e não tabagistas.

Entretanto, o teste dos micronúcleos não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos, considerando as frequências de um, dois, três ou mais micronúcleos, bem como na ocorrência de ponte ou células binucleadas. Esses valores são apresentados na Tabela 03.

Tabela 03 – Índices de Danos ao DNA de tabagistas e não tabagistas avaliados pelo Teste dos Micronúcleos.

Teste dos Micronúcleos		T	NT	<i>p</i> -valor
F1(Mn)	Média	25,56	23,53	0,5450
	±DP	14,61	10,99	
F2(Mn)	Média	13,9	12,83	0,6325
	±DP	9,59	7,46	
F3(Mn)	Média	12,20	11,50	0,7554
	±DP	10,15	6,84	
Ponte	Média	0,40	0,13	0,1472
	±DP	0,93	0,34	
Binucleada	Média	2,08	2,28	0,6274
	±DP	1,51	1,63	

T = tabagistas; NT = não tabagistas; F1(Mn) = Frequência de um micronúcleo; F2(Mn) = Frequência de dois micronúcleos; F3(Mn) = Frequência de três ou mais micronúcleos; DP = desvio-padrão.

Uma vez que o índice de dano ao DNA avaliado pelo Ensaio Cometa foi diferente entre tabagistas e não tabagistas foi realizada uma análise de distribuição de percentis entre esses dois grupos. No caso, 25% da amostra dos Grupos T e NT apresentaram um índice de dano ao DNA de 0,09 e 0,04, respectivamente. Valores do percentil 50% foram T=0,13 e NT=0,08. Já, os outros 25% da amostra apresentaram valores nos T=0,20 e nos NT=0,11 (equivalente ao percentil 75).

Com base na distribuição dos percentis obtidos foi feita uma nova classificação da amostra agrupando os sujeitos em duas categorias utilizando como ponto de corte valores do percentil 50 observado nos tabagistas: aqueles que apresentavam índice de dano ao DNA $ID \geq 0,13$ e aqueles que apresentavam $ID < 0,13$. Esta classificação permitiu análise multivariada averiguando a ocorrência de interação entre tabagismo e índices mais elevados de dano ao DNA nos limiares auditivos da amostra.

A análise mostrou a ocorrência de interação entre tabagismo e presença de índices mais elevados de dano ao DNA nos limiares auditivos. No caso, indivíduos tabagistas com $ID \geq 0,13$ apresentaram limiares auditivos piores nas frequências de 8000Hz na orelha do lado direito ($ID \geq 0,13 = 13,46 \pm 5,46$ dB, $ID < 0,13 = 7,94 \pm 3,08$ dB, $p = 0,033$) e 4000Hz na orelha do lado esquerdo ($ID \geq 0,13 = 9,61 \pm 7,11$ dB,

ID<0,13=7,35±4,15dB, $p=0,05$). Já os indivíduos não tabagistas, ainda que, com valores de ID≥0,13, apresentaram limiares auditivos semelhantes.

Já, a diminuição da amplitude das EOAEPD não foi influenciada pela interação entre tabagismo e índices mais elevados de dano ao DNA ($p=0,884$).

4.6 Discussão

No presente estudo foi observado que o tabagismo e a genotoxicidade a ele associada afetam alguns indicadores de função auditiva (dos limiares auditivos e das amplitudes da EOAEPD) de adultos jovens.

Esses resultados são relevantes em nível de saúde pública e para a clínica fonoaudiológica, uma vez que sugerem para indivíduos tabagistas, por si só e, ou com maiores índices de genotoxicidade, seja uma categoria potencialmente suscetível a deterioração da audição. Adicionalmente, a relevância do estudo está no fato de o mesmo ter investigado um grupo populacional, que ainda não envelheceu e que também não possui co-morbidades, que muitas vezes dificultam investigações epidemiológicas relacionadas à saúde auditiva.

Quanto aos limiares auditivos avaliados por meio da audiometria tonal liminar, foi observado que em uma frequência aguda (6000Hz da orelha direita), os tabagistas normo-ouvintes apresentaram piores limiares auditivos, denotando diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos (Figura 05). Os resultados aqui descritos corroboram estudos prévios como aqueles realizados por Sharabi et al (2002), que descreveram que a perda auditiva é maior nos fumantes que nos não fumantes da população em geral. No caso, considerando especificamente o subgrupo de adultos jovens, estes autores observaram que o efeito do tabagismo na função auditiva seria maior. Porém, os autores citados não fizeram diferenciações sobre quais frequências foram mais afetadas nos indivíduos de sua pesquisa, como aqui elucidadas. Ainda, não investigaram o quanto o tabagismo já estaria afetando o metabolismo do indivíduo, como foi feito no presente estudo, quando se incluiu na investigação a avaliação do

dano ao DNA. Outro estudo, realizado por Cruickshanks et al (1998), estimou que fumantes são 1,69 vezes mais suscetíveis a desenvolver perda auditiva comparados a não fumantes. Essa suscetibilidade também foi encontrada no presente estudo.

Do mesmo modo estão de acordo com a análise da relação entre tabagismo e função coclear outros estudos, como Noorhassim & Rampal (1998), Nomura et al (2005), Ferrite & Santana (2005) e Oliveira & Lima (2009), que também afirmaram ser positiva a associação entre tabagismo e perda auditiva. Além disso, Ferrite & Santana (2005) relataram a possibilidade de diversas substâncias ototóxicas estarem presentes na composição do cigarro.

Apesar da influência do tabagismo na função auditiva, não foi observada neste trabalho associação entre tempo de tabagismo e limiares auditivos. Entretanto, esta não associação possivelmente ocorra por ser a amostra composta por indivíduos adultos jovens, e que estão há pouco tempo expostos ao tabaco. Entretanto, uma investigação longitudinal complementar a realizada neste estudo poderia encontrar, futuramente, tal associação. Isso porque outros estudos realizados indicaram que o aumento de anos-maço de cigarros exacerba a perda de audição (CRUICKSHANKS et al 1998).

A maior quantidade de cigarros fumados também mostrou ter interferência negativa nos limiares auditivos de tabagistas. Esse achado reforça os resultados descritos previamente por Sharabi et al (2002), que relataram que a prevalência de perda auditiva foi significativamente maior nos fumantes de mais de 20 cigarros por dia que aqueles que fumavam menos de 20. Portanto, a quantidade diária de cigarros sugere influência sobre os limiares auditivos. Além disso, Noorhassim & Rampal (1998) observaram que o número de carteiras de cigarro diário consumido e a idade estão estatisticamente associados a fatores relacionados com a diminuição da capacidade auditiva.

Agrawal et al (2009) conduziram um estudo para avaliar os fatores de risco para perda auditiva em adultos americanos. Após avaliarem com audiometria tonal liminar, nas frequências de 500 a 8000Hz, 3527 adultos com idade de 20 a 69 anos, concluíram que riscos cardiovasculares, como tabagismo e diabetes, foram associados com perda auditiva tanto de baixas como de altas frequências, possivelmente devido à vulnerabilidade da cóclea à insuficiência microvascular.

Na metodologia do presente estudo, foi critério de exclusão os sujeitos trabalharem expostos a ruído, diferentemente do trabalho de Mizoue, Miyamamoto & Shimizu (2003), que relataram que o tabagismo, quando combinado com o fator da exposição ao ruído, pode ser um fator agravante para as perdas auditivas nas altas frequências e apesar de terem avaliado indivíduos de todas as idades submetidos ao ruído, os adultos jovens já apresentaram discretas alterações nos limiares auditivos quando comparados a adultos de meia-idade e idosos. No presente estudo, a amostra não teve interferência do ruído e ainda assim apresentou indicadores de piora na função auditiva em determinadas frequências.

No presente estudo, não foi possível observar diferença estatisticamente significativa na amplitude das EOAEPD de tabagistas e não tabagistas, apesar da amplitude das EOAEPD dos tabagistas apresentarem discreta redução em todas as frequências analisadas (Tabelas 01 e 02). Entretanto, foi observado que a influência do tabagismo na amplitude das EOAEPD foi dependente do gênero (Figura 06), pois apenas os fumantes do gênero masculino apresentaram uma amplitude significativamente menor do que os não fumantes nas frequências agudas (4000 e 6000Hz) na orelha do lado esquerdo. Estes resultados corroboram achados descritos por Negley et al (2007) que mediram EOAEPD em 24 adultos jovens (12 fumantes e 12 não fumantes) com idades entre 20 e 30 anos e que eram tabagistas há no mínimo cinco anos. Esses autores observaram que os tabagistas apresentaram amplitudes de EOAEPD significativamente reduzidas em todas as frequências avaliadas quando comparados aos não tabagistas. Para esses autores, os resultados sugeriram que fumantes teriam maior risco de dano coclear que os não fumantes, e que as EOAEPD podem identificar precocemente alterações em função coclear de fumantes. Entretanto, um estudo recente conduzido por Torre III et al (2007) realizado em 436 homens adultos jovens, relataram que apenas em fumantes de mais de 40 cigarros por dia ocorreu diminuição na amplitude das EOAEPD.

No presente estudo, a análise do dano ao DNA indica se está ocorrendo genotoxicidade por estresse oxidativo em função do tabagismo, como foi apontado por outros estudos, onde os efeitos do tabagismo sobre a audição foram relacionados à insuficiência vascular do órgão coclear. A nicotina causaria um vasoespasmó induzido,

estreitamento aterosclerótico e/ou oclusão trombótica de vasos sanguíneos, que podem reduzir o suprimento de sangue para a cóclea (ZELMAN, 1973; CUNNINGHAM et al, 1983; CRUICKSHANKS et al, 1998).

Neste estudo foi observado que os tabagistas apresentaram índice de dano ao DNA aumentados quando comparados aos não tabagistas, conforme foi evidenciado pelo teste Ensaio Cometa (Figuras 01 e 07) que avalia genotoxicidade provocada por estresse oxidativo. Pela revisão da literatura consultada até o presente momento, parece que este é o primeiro relato demonstrando associação entre danos ao DNA de leucócitos mononucleares e diminuição da função auditiva em tabagistas adultos jovens. Outros estudos confirmaram maior ocorrência de genotoxicidade em indivíduos tabagistas, porém os objetivos desses trabalhos foram diferentes dos do presente estudo, uma vez que não investigaram os efeitos específicos sobre a audição (ARBOLEDA-MORENO et al, 2004).

No teste dos micronúcleos, porém, não puderam ser observadas diferenças estatísticas entre os grupos (Figura 02 e Tabela 03). Apesar de investigações prévias terem relatado que o teste dos micronúcleos é um teste sensível para detectar danos ao DNA celular provocados pelo tabagismo, tal associação não foi evidenciada no presente estudo, como citado por Wunsch Filho & Gattas (2001), Freita et al (2005) e Meireles et al (2006). Isto sugere que a amostra investigada, por ser de adultos jovens e, portanto expostos aos fatores oxidativos do cigarro há um tempo menor, não evidenciou, ainda, danos nucleares detectáveis nas células da mucosa oral.

Os resultados aqui obtidos também corroboram os estudos realizados em modelos experimentais, que permitem uma avaliação sistêmica de diversos indicadores do estresse oxidativo, tabagismo e função auditiva, como os estudos de Van Campen et al (2002), sugerindo que o estresse oxidativo estaria implicado como um fator importante nos eventos cocleares, como perda auditiva neurossensorial induzida por ruído ou medicamentos ototóxicos. Tal sugestão foi subsidiada pelo estudo realizado por esses autores utilizando ratos como modelo experimental que determinou se uma exposição ao ruído intenso de banda larga por 2 horas, que resultou em mudança permanente no limiar do rato, produziu danos oxidativos mensuráveis para DNA coclear, e, relacionou o tempo de curso de peroxidação de danos de lipídios e o tempo

de comprometimento funcional. Para conseguir isso, tanto danos ao DNA e peroxidação lipídica foram avaliados dentro do mesmo animal nas cócleas e em dois órgãos controle (cérebro e fígado). Cócleas, cérebro, fígado, soro e urina foram analisados após uma, três, oito, 72 e 672 horas (28 dias) após a exposição. Um objetivo secundário foi estudar o processo de reparação após os danos oxidativos e avaliar o soro e urina para derivados bioquímicos de danos e reparação. Com base nos danos oxidativos do DNA presentes na cóclea após intensa exposição ao ruído, os autores concluíram que as oito primeiras horas seguintes a exposição podem ser consideradas um período crítico para o tratamento antioxidante.

Apesar dos resultados aqui descritos indicarem efeito do tabagismo e genotoxicidade na função auditiva, algumas limitações metodológicas têm que ser consideradas: o estudo, por ser do tipo caso-controle, não permite a inferência de riscos associados ao tabagismo e genotoxicidade na função auditiva. Por ser um estudo exploratório, o tamanho amostral também é reduzido. Entretanto, face aos achados aqui descritos, estudos complementares longitudinais e com um maior número de voluntários poderiam ser conduzidos, não só para confirmar os achados, mas para implementar programas preventivos à saúde auditiva.

Outra condição que limita a discussão dos resultados obtidos é a relativa escassez de estudos que avaliam adultos jovens tabagistas. A maior parte das investigações atuais está focada em idosos ou adultos jovens tabagistas expostos ao ruído.

4.7 Conclusões

No presente estudo, foi possível observar que adultos jovens tabagistas apresentam sinais de alteração morfológica e funcional e do sistema auditivo, evidenciados pelos limiares auditivos mais elevados em determinadas frequências e pela redução da amplitude das EOAEPD, respectivamente, e danos ao DNA, evidenciado pelo Ensaio Cometa.

4.8 Referências Bibliográficas

AGRAWAL, Y.; PLATZ, E.A.; NIPARKO, J.K. Prevalence of hearing loss and differences by demographic characteristics in US adults: data from the National Health and Nutrition Examination Survey. **Archives of Internal Medicine**, v.168, p. 1522-1530, 2008.

AGRAWAL, Y.; PLATZ, E.A.; NIPARKO, J.K. Risk factors for hearing loss in US adults: data from the national health and nutrition examination survey, 1999 to 2002. **Otology & Neurotology**, v. 30, p. 139-145, 2009.

ARBOLEDA-MORENO, Y. et al. Genotoxicidad por exposición a cigarrillos en fumadores jóvenes en Colombia. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 15, n. 6, p. 367-372, 2004.

ASHA (American Speech – Language – Hearing Association). Disponível em: <http://www.asha.org/public/hearing/disorders/default.htm>. Acesso em 05 out 2007.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Prevalência de tabagismo no Brasil**. Coordenação de Prevenção e Vigilância/INCA/MS, Rio de Janeiro, maio de 2004.

BROWNING, G.G.; GATEHOUSE, S.; LOWE, G.D. Blood viscosity as a factor in sensorineural hearing impairment. **Lancet**, v. 1, p. 121-123, 1986.

COLLINS, A.R.; MA, A.G.; DUTHIE, S.J. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. **Mutation Research (DNA Repair)**, v. 336, p. 69-77, 1995.

CRUICKSHANKS, K.J. et al. Cigarette smoking and hearing loss: the epidemiology of hearing loss study. **The Journal of the American Medical Association**, v. 279, p. 1715-1719, 1998.

CUNNINGHAM, D.R.; VISE, L.K.; JONES, L.A. Influence of cigarette smoking on extra-high-frequency auditory thresholds. **Ear and Hearing**, v. 4, p.162-165, 1983.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, n. 1-2, p. 81-95, 2000.

FERRITE, S.; SANTANA, V. Joint effects of smoking, noise exposure and age on hearing loss. **Occupational Medicine**, v. 55, p. 48-53, 2005.

FREITA, V.S. et al. Efeitos genotóxicos de fatores considerados de risco para o câncer bucal. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 29, n. 2, p. 189-199, 2005.

GARCIA, O. et al. Sensitivity and variability of visual scoring in the comet assay: Results of an interlaboratory scoring exercise with the use of silver staining. **Mutation Research**, v. 556, p. 25-34, 2004.

JERGER, J. Clinical experience with impedance audiometry. **Arch Otolaryngol**, v. 92, n. 4, p. 311-324, 1970.

JERGER, J.; SPEACKS, C.; TRAMMELL, J. A new approach to speech audiometry. **The Journal of Speech and Hearing Disorders**, v. 33, p. 318, 1968.

JERGER, S.; JERGER, J. **Alterações auditivas: uma manual para avaliação clínica**. Atheneu: São Paulo; 1989. 102 p.

KEMP, D.T. Development in cochlear mechanics and techniques for noninvasive evaluation. **Advanced Audiology**, v. 5, p. 27-45, 1988.

LLOYD, L. L.; KAPLAN, H. **Audiometric interpretation: a manual on basic audiometry**. University Park Press: Baltimore; 1978. p. 16-17, 94.

MAFFEI, G.; MIANI, P. Experimental tobacco poisoning: resultant structural modification of the cochlea and tuba acustica. **Arch Otolaryngol.**, v. 75, p. 386-396, 1962.

MEIRELES, J.R.C. et al. Apoptose em células esfoliadas da mucosa bucal de indivíduos ocupacionalmente expostos a agentes mutagênicos e carcinogênicos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 4, p. 337-343, 2006.

MIZOUE, T.; MIYAMOTO, T.; SHIMIZU, T. Combined effect of smoking and occupational exposure to noise on hearing loss in steel factory workers. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 60, p. 56-59, 2003.

NEGLEY, C. et al. Effects of cigarette smoking on distortion produce otoacoustic emissions. **Journal of the American Academy of Audiology**, v. 18, p. 665-674, 2007.

NOMURA, K.; NAKAO, M.; MORIMOTO, T. Effect of smoking on hearing loss: quality assessment and meta-analysis. **Preventive Medicine**, v. 40, n. 2, p. 138-144, 2005.

NOORHASSIM, I.; RAMPAL, K. G. Multiplicative effect of smoking and age on hearing impairment. **American Journal of Otolaryngology**, v.19, p. 240-243, 1998.

OLIVEIRA, D.C.C.M.; LIMA, M.A.M.T. Da audiometria tonal limiar em baixa e alta frequência: comparação dos limiares auditivos entre tabagistas e não-tabagistas. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 75, n. 5, p. 738-744, 2009.

SHARABI, Y. et al. Cigarette Smoking and Hearing Loss: Lessons from the Young Adult Periodic Examinations in Israel (YAPEIS) Database. **The Israel Medical Association journal: IMAJ**, v. 4, p. 1118-1120, 2002.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003, v. 1, 422 p.

SINGH, N.P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.

TORRE III, P. et al. Risk factors for distortion product otoacoustic emissions in young men with normal hearing. **Journal of the American Academy of Audiology**, v. 18, p. 749-759, 2007.

VAN CAMPEN, L.E. et al. Oxidative DNA damage is associated with intense noise exposure in the rat. **Hearing Research**, v. 164, p. 29-38, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em: <http://www.who.int/en/>. Acesso em: 05 outubro 2007.

WUNSCH FILHO, V.; GATTAS, G.J.F. Biomarcadores moleculares em câncer: implicações para a pesquisa epidemiológica e a saúde pública. **Cadernos de Saúde Pública**, v.17, n. 3, p. 467-480, 2001.

ZELMAN, S. Correlation of smoking history with hearing loss. **The Journal of the American Medical Association**, v. 223, p. 920-920, 1973.

5 ARTIGO DE PESQUISA

ASSOCIAÇÃO ENTRE FUNÇÕES DA VIA AUDITIVA EFERENTE E GENOTOXICIDADE EM ADULTOS JOVENS

*Association between functions efferent auditory
pathways and genotoxicity in young adults*

5.1 Resumo

Introdução: as funções da via auditiva eferente incluem a modulação das células ciliadas externas da cóclea, proteção contra o ruído e melhora na detecção da fonte sonora em ambientes ruidosos. Genotoxicidade são os danos ao DNA provocados por estresse oxidativo. Objetivos: analisar a associação entre funções da via auditiva eferente com marcadores genotóxicos do estresse oxidativo. Adicionalmente, o estudo considerou o tabagismo e o gênero como as principais variáveis intervenientes. Material e método: estudo do tipo prospectivo-clínico, quantitativo, transversal, contemporâneo. Foi realizada uma análise da função da via auditiva eferente através da análise do efeito de supressão das EOAEPD e autorrelato de queixas auditivas de dificuldade auditiva, zumbido, dificuldade de ouvir em ambiente ruidoso, dificuldade de entender a fala em grupo e desconforto a sons intensos (queixas que são relacionadas às funções da via auditiva eferente) em 60 voluntários adultos jovens (entre 18 e 32 anos). Nesses indivíduos também foram aplicados os testes de genotoxicidade “Ensaio Cometa” e “Análise dos Micronúcleos”. Resultados: os participantes do estudo tinham idade média de $24,86 \pm 3,68$ anos; 30 do gênero masculino e 30 do gênero feminino, destes, 15 de cada gênero possuíam hábito de tabagismo e 15 eram não tabagistas; indivíduos do gênero masculino tabagistas apresentaram maior ocorrência de efeito de supressão das EOAEPD nas frequências de 2000 e 6000Hz na orelha do lado esquerdo; mulheres tabagistas apresentaram maior prevalência de queixa de dificuldade de ouvir em ambiente ruidoso quando comparadas a mulheres não tabagistas; indivíduos tabagistas, independente do gênero, e as mulheres, independente de serem tabagistas, apresentaram média de dano ao DNA observada pelo Ensaio Cometa significativamente maior do que indivíduos não tabagistas; indivíduos com queixas de dificuldade auditiva e zumbido apresentaram maiores índices de genotoxicidade. Conclusões: Em adultos jovens normo-ouvintes que referem queixas relacionadas às funções da via auditiva eferente, como zumbido e dificuldade auditiva, já é possível

observar associação com estresse oxidativo, mais especificamente com genotoxicidade considerando interações entre gênero e tabagismo.

Descritores: audição; genotoxicidade; tabagismo; vias eferentes.

5.2 Abstract

Introduction: the role of efferent auditory pathways include the modulation of outer hair cells of cochlea, noise protection and improvement in the detection of the sound source in noisy environments. Genotoxicity is damage to DNA caused by oxidative stress. **Objectives:** To analyze the association between functions of the efferent auditory pathways with genotoxic markers of oxidative stress. Additionally, the study considered smoking and gender as the main variables involved. **Methods:** prospective-clinical, quantitative, cross-contemporary study. We analyzed the function of the efferent auditory pathways through of DPOEA suppression analysis and self-reported complaints of difficulty hearing, tinnitus, difficulty hearing in noisy surroundings, difficulty understanding speech in a group and discomfort to loud sounds (complaints that are related to the functions of the auditory efferent) in 60 healthy young (between 18 and 32 years). These individuals were also tested on the genotoxicity "Comet Assay" and "Analysis of Micronuclei. **Results:** The study participants' average age was 24.86 ± 3.68 years, 30 males and 30 females, of which, 15 of each gender had a habit of smoking and 15 were non-smokers; male smokers had increased incidence of DPOEA suppression effect in the frequencies of 2000 and 6000Hz in the left ear; female smokers had a higher prevalence of complaints of difficulty hearing in noisy environments when compared to female non-smokers; smokers, regardless of gender, and women, whether they are smokers, a mean of DNA damage observed by the Comet Assay significantly higher than non-smokers; individuals with complaints of hearing loss and tinnitus had higher genotoxicity. **Conclusions:** In young adults with normal hearing that relate complaints to functions of the efferent auditory pathways, such as tinnitus and hearing impairment, it is possible to observe association with oxidative stress, specifically with genotoxicity considering interactions between gender and smoking.

Key words: hearing; genotoxicity; smoking; efferent pathways.

5.3 Introdução

O sistema auditivo é constituído por vias auditivas aferentes e eferentes que atuam integradamente. Conforme Guinan (2006), a via auditiva eferente é constituída pelos feixes olivococleares medial e lateral, os quais possuem diferenças anatômicas e fisiológicas que coordenam a função independente das duas orelhas.

As funções das vias auditivas eferentes incluem a modulação das células ciliadas externas da cóclea, diminuição do potencial de ação do nervo coclear, proteção contra o ruído, localização da fonte sonora, melhora na detecção da fonte sonora em ambientes ruidosos (BREUEL et al, 2001; GUINAN, 2006). Fávero et al (2003), relataram que a via auditiva eferente é menos eficiente nos pacientes com queixa de zumbido.

Sahley et al (1997) destacaram que o sistema eferente, por meio do trato olivococlear medial, é o responsável pela modulação dos movimentos das células ciliadas externas pela liberação de acetilcolina na fenda sináptica.

A via auditiva eferente pode ser avaliada a partir da aplicação de um estímulo acústico contralateral concomitantemente com a captação das emissões otoacústicas (EOAs). O efeito de supressão das EOAs por ruído contralateral vem sendo cada vez mais utilizado, tanto na clínica quanto na pesquisa, por avaliar a via auditiva eferente e ser um procedimento rápido e não invasivo.

Todas as células vivas do corpo humano dependem de um fornecimento adequado de oxigênio e nutrientes para manterem sua função, sendo que tal fornecimento, em última instância, depende da integridade funcional e estrutural do coração e dos vasos sanguíneos.

O fornecimento adequado de nutrientes e oxigênio têm como consequência a produção de energia para que o organismo execute suas atividades metabólicas. Esta produção ocorre via cadeia respiratória mitocondrial. Entretanto, cerca de 5% do oxigênio que é inspirado, ao invés de ser ocupado na produção de energia (adenosina tri-fosfato - ATP) gera espécies ativas de oxigênio (radicais livres). Essas moléculas são altamente reativas com outras moléculas celulares e se não forem controladas podem causar diversos danos fisiológicos e doenças (CSISZAR et al, 2009).

Por tal motivo, os radicais livres são controlados pelo organismo através de um sistema antioxidante enzimático. Este sistema transforma radicais livres como o

superóxido e o peróxido de hidrogênio (água oxigenada) em moléculas de água. Além deste sistema endógeno, moléculas antioxidantes provenientes de frutas e verduras atuam na defesa do nosso organismo contra os radicais livres. Entretanto, quando a produção de radicais livres é maior que o seu controle pelos sistemas antioxidantes exógenos e endógenos, ocorre um fenômeno denominado estresse oxidativo. O estresse oxidativo causa dano a moléculas importantes do organismo como as membranas celulares (peroxidação lipídica) e mutações no Ácido Desoxirribonucléico (convencionalmente chamado de DNA, Deoxyribose Nucleic Acid – DNA). Essas alterações em geral são conhecidas como genotoxicidade. Assim, a avaliação da ocorrência de maior genotoxicidade, por exemplo, indica que o indivíduo possui um maior nível de estresse oxidativo.

Investigações têm sugerido que o estresse oxidativo causado por diversos fatores de risco, como o fumo, podem alterar a audição (AGNEZ-LIMA et al, 2001; BJELLAND & SEEBERG, 2003; ARBOLEDA-MORENO et al, 2004). Essa alteração ocorreria via aumento do nível de dióxido de carbono e nicotina, que aumentaria por sua vez a quantidade de radicais livres. Um grande conjunto de evidências sugere que um descontrole na produção destas moléculas causa disfunção endotelial. Essa alteração fisiológica pode levar ao aumento na vasoconstrição dos vasos sanguíneos, aumentando o risco de ocorrência de oclusões trombóticas na vasculatura que irriga os órgãos da audição (ZELMAN, 1973; VAN CAMPEN et al, 2002).

Deste modo, investigar a possível associação entre funções da via auditiva eferente e genotoxicidade, que é um marcador de estresse oxidativo, em indivíduos normo-ouvintes é relevante. Adicionalmente, considerar fatores intervenientes como o tabagismo e o gênero na análise desta associação é importante, uma vez que o tabagismo tende a aumentar o estresse oxidativo do indivíduo e que o gênero pode interferir via diferenças metabólicas (hormonais) e comportamentais.

Com base nessas considerações, o estudo aqui apresentado teve como objetivos principais analisar a associação entre funções da via auditiva eferente, avaliada através do efeito de supressão das emissões otoacústicas evocadas produto de distorção (EOAEPD) e autorrelato de queixas auditivas, com marcadores

genotóxicos do estresse oxidativo. Adicionalmente o estudo considerou o tabagismo e o gênero como as principais variáveis intervenientes.

5.4 Material e Método

O delineamento do presente estudo foi do tipo prospectivo-clínico, quantitativo, transversal, contemporâneo. Para tanto, foi feita uma análise da função da via auditiva eferente através da análise do efeito de supressão das EOAEPD e autorrelato de queixas auditivas de dificuldade auditiva, zumbido, dificuldade de ouvir em ambiente ruidoso, dificuldade de entender a fala em grupo e desconforto a sons intensos (queixas que são relacionadas às funções da via auditiva eferente) em 60 voluntários adultos jovens (entre 18 e 32 anos). Esses voluntários foram probabilisticamente selecionados a partir de uma amostra de 1024 indivíduos previamente incluídos no Projeto de Pesquisa “Nutrigenética e Tabagismo: Estudos *In Vivo* e *Ex Vivo* da Dieta e Atividade Física na Modulação dos Efeitos Pró-Oxidantes do Fumo”. O referido projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria sob o Número 0146.0.243.000-07 (ANEXO I). Nesses indivíduos também foram avaliados indicadores de genotoxicidade.

Os critérios de inclusão no estudo foram a ocorrência de limiares auditivos normais (LLOYD & KAPLAN, 1978), presença de EOAEPD (KEMP, 1978) e, para ser considerado tabagista, ter fumado mais de 100 cigarros nos últimos 90 dias.

Todos os participantes, após assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE I), foram submetidos a:

- b) *Anamnese* (APÊNDICE II): composta por perguntas fechadas de identificação, antecedentes pessoais e familiares, hábito de tabagismo, quantidade diária, marca de cigarro, tempo de exposição ao fumo, queixas de dificuldade auditiva (pergunta genérica, não se refere à perda auditiva), zumbido, dificuldade de ouvir em ambiente ruidoso, dificuldade de entender a fala em grupo e desconforto a sons intensos.

c) *Avaliação Audiológica Básica* (APÊNDICE III) composta de:

- Inspeção visual do meato acústico externo;

- Audiometria Tonal Liminar por via aérea nas frequências de 250, 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 6000 e 8000Hz e por via óssea nas frequências de 500, 1000, 2000, 3000 e 4000Hz, quando necessário, com limiares pesquisados de forma descendente. Para execução da audiometria tonal liminar foi utilizado audiômetro digital de dois canais, marca Fonix, modelo FA-12, tipo I e fones auriculares tipo TDH-39P, marca Telephonics com calibração de acordo com a norma ISO 389-1991. Os indivíduos foram considerados normo-ouvintes quando a média de tons puros dos limiares de via aérea entre 500, 1000 e 2000 Hz, ficaram entre zero e 25dB, de acordo com Lloyd & Kaplan (1978).

- Avaliação do Limiar de Reconhecimento de Fala (LRF), com palavras dissilábicas;

- Verificação do Índice Percentual de Reconhecimento de Fala (IPRF), com palavras monossilábicas. Os resultados do IPRF deveriam estar entre 92 e 100% de acertos, indicando que o indivíduo não apresentou dificuldade para compreender a fala (JERGER, SPEAKS & TRAMMELL, 1968).

- Medidas de Imatância Acústica: timpanometria e pesquisa dos reflexos acústicos contra e ipsilaterais. Para a execução das medidas de imatância acústica foi utilizado um analisador de orelha média INTERACOUSTIC AZ7, com fone TDH-39 e coxim MX-41, com tom-sonda de 220Hz à 70dBNA, e calibração segundo a norma ISO 389-1991. Os reflexos acústicos foram pesquisados nas frequências de 500, 1000, 2000 e 4000Hz. Os indivíduos deveriam apresentar curva timpanométrica do tipo A, indicando mobilidade adequada do sistema tímpano-ossicular (JERGER, 1970) e reflexos estapedianos presentes (JERGER & JERGER, 1989).

Os resultados foram anotados em protocolo padrão.

d) *Mensuração das EOAEPD e verificação da ocorrência do efeito de supressão das EOAEPD* (APÊNDICE IV): o registro das EOAEPD foi executado dentro de cabine acusticamente tratada. O aparelho utilizado foi o Otoread Clínico da marca Interacoustics/Audiotest.

Na obtenção das EOAEPD (2F1-F2) foram utilizados dois tons puros na razão de $F2/F1=1,22$, onde F1 é apresentada na intensidade de 65dBNPS e F2 em 55dBNPS. Para medida das EOAEPD foram testadas as frequências de 1500, 2000, 3000, 4000 5000 e 6000Hz. Considerou-se as EOAEPD presentes, quando a relação sinal/ruído foi igual ou superior a 6dB.

A captação das EOAEPD foi realizada primeiro na ausência e, após, na presença do ruído na orelha contralateral.

Foi utilizado como estímulo acústico supressor um ruído branco contralateral gerado por um audiômetro digital de dois canais, marca Fonix, modelo FA-12, tipo I e fones auriculares tipo TDH-39P, marca Telephonics, na intensidade de 60dBNA.

A fim de evitar manipulação da sonda das EOAEPD, o fone foi acoplado na orelha contralateral à captação das EOAEPD antes do início do teste.

O cálculo da supressão contralateral das EOAEPD foi obtido pela subtração do nível de resposta das EOAEPD com estimulação acústica contralateral do nível de resposta das EOAEPD sem estimulação acústica contralateral (DURANTE & CARVALLO, 2006). Valores negativos indicaram presença de supressão das EOAEPD e valores positivos ou zero indicaram ausência de tal fenômeno. Quanto mais negativo o efeito de supressão, maior a atividade do SOCM.

Foram selecionadas as frequências de 2000, 3000, 4000, 5000 e 6000Hz para análise do efeito de supressão. Adicionalmente, foi realizada uma análise por orelha e para tal, considerou-se o efeito de supressão presente quando este se manifestou em pelo menos três das cinco frequências testadas.

e) *Testes de genotoxicidade:* Dentre os testes internacionalmente aceitos para avaliar Danos ao DNA, destacam-se o teste de Genotoxicidade “Ensaio Cometa” e “Análise dos Micronúcleos” (FENECH, 2000; SILVA et al, 2003). Para a execução desses testes, foi realizada coleta de material biológico (sangue periférico e esfregaço da mucosa oral), efetuado por uma farmacêutica capacitada. De posse da amostra biológica, foram realizados os dois testes de genotoxicidade.

Teste de genotoxicidade “Ensaio Cometa”

O Teste Cometa foi realizado de acordo com o método proposto por Singh et al (1988) e modificado por Collins et al (1995). Para cada indivíduo foram confeccionadas lâminas em duplicata. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico binocular da marca Olympus modelo CX40, com magnificação de 400 vezes. Foram contadas, para cada amostra, 100 células (50 por lâmina). As cinco categorias usadas para classificação do Cometa são aquelas propostas por García (2004) e mostradas na Figura 01, a seguir. Com base nos resultados obtidos foi estabelecido o índice de dano ao DNA, que indica genotoxicidade obtido através da divisão do número total de núcleos que apresentaram algum dano pelo número total de núcleos sem danos ao DNA. Uma vez que foram feitas duas lâminas para cada indivíduo onde foram contados 50 núcleos por lâmina e que ambas as lâminas foram analisadas por dois observadores independentes, para o índice de dano foi considerado a média dos danos observados pelos dois analisadores para 100 núcleos por indivíduo.

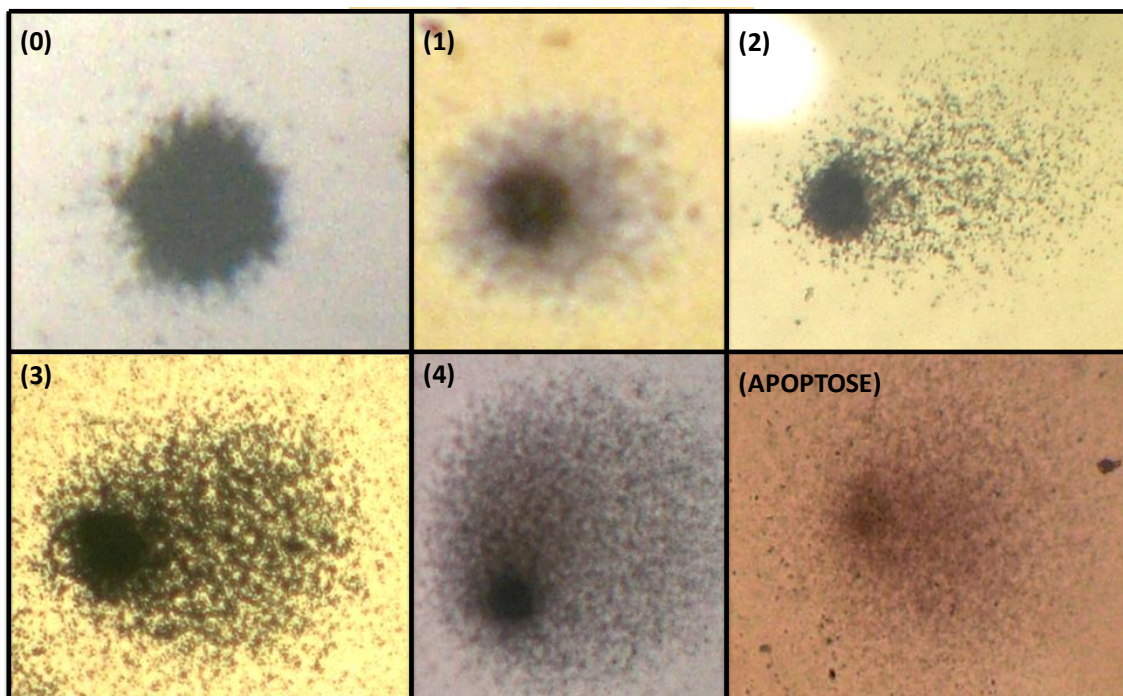


Figura 1 – Classificação do Dano ao DNA dos indivíduos analisados. Quanto maior o nível de dano maior o número a ele atribuído. Classe 0 representa células sem dano e classe 4 o mais alto dano.

Os resultados foram anotados em protocolo padrão (APÊNDICE V).

Teste de genotoxicidade “Análise dos Micronúcleos”

Presença de micronúcleos foi efetuada através da análise de células da mucosa oral. Para a coleta da amostra de células epiteliais, foi solicitado que o sujeito mordiscasse levemente as bochechas para soltura das células e em seguida realizasse raspagem com uma espátula de madeira nas bochechas. A espátula contendo material celular foi colocada pelo sujeito em um tubo de ensaio cônico, contendo de 3 a 5ml de Solução Fisiológica 0,9%NaCl resfriada a 6°C.

Em seguida, os tubos de ensaio foram centrifugados por 10 minutos a 1000RPM. Para lavagem das células, a solução fisiológica foi trocada, cuidando para que não fossem retiradas as células contidas no fundo do tubo de ensaio. A solução foi homogeneizada com as células, utilizando pipeta Pasteur e centrifugada novamente. O procedimento de lavagem das células/centrifugação foi repetido duas vezes. Em seguida, foi acrescentado 1ml de solução fisiológica, homogeneizado e distribuído em duas lâminas (500µL em cada), pois foram confeccionadas em duplicata para cada indivíduo da amostra. As lâminas secaram em temperatura ambiente. Após, foi realizada a coloração das mesmas, utilizando o Kit Panótico de Coloração da marca Laborclin.

Depois de seco, o material foi observado em microscópio óptico binocular da marca Olympus, modelo CX40, com magnificação de 400x para contagem dos micronúcleos presentes e posterior análise dos dados. Foram contadas 1000 células (500 por lâmina) e os micronúcleos classificados, conforme elucidação na Figura 02.

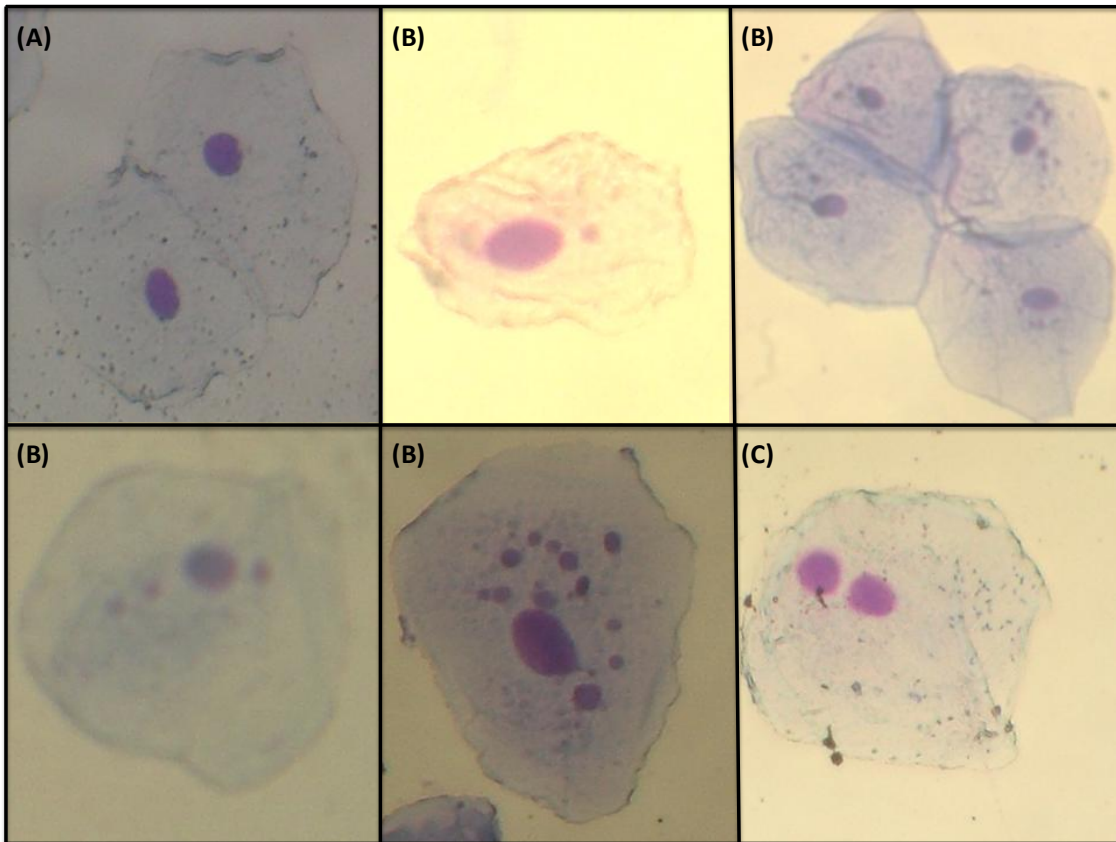


Figura 02 – Teste dos Micronúcleos dos indivíduos analisados: (A) Célula sem micronúcleos; (B) Células com um ou mais micronúcleos; (C) Célula binucleada. Os resultados foram anotados em protocolo padrão (APÊNDICE VI).

5.4.1 Análise Estatística

Após a coleta dos dados, os resultados obtidos neste estudo foram submetidos à análise estatística. Para realização dos testes foi utilizado o programa SPSS, Versão 13.0.

Foi realizada análise paramétrica (análise de variância de uma via ou multivariada) seguida de teste *post hoc* de Bonferroni quando existiam mais que três parâmetros na variável. Teste *Student t* foi utilizado quando existiam somente dois parâmetros. As variáveis categóricas foram analisadas por teste do Qui-quadrado ou Exato de Fisher. Foram consideradas associações significativas aquelas cujo $p \leq 0,05$.

5.5 Resultados

Os voluntários participantes do estudo tinham uma idade média de $24,86 \pm 3,68$ anos sendo que eram 30 do gênero masculino e 30 do gênero feminino (N=60). Destes, 15 de cada gênero possuíam hábito de tabagismo e 15 eram não tabagistas.

5.5.1 Funções da via auditiva eferente

As queixas auditivas relacionadas às funções da via auditiva eferente e a ocorrência de efeito de supressão das EOAEPDs, dos 60 indivíduos analisados no presente estudo, são apresentadas nas Tabelas 01 e 02, respectivamente.

Tabela 01 – Queixas auditivas relacionadas às funções da via auditiva eferente em adultos jovens normo-ouvintes.

Queixas auditivas	Presença N (%)	Ausência N (%)
Dificuldade auditiva	7 (11,7)	53 (88,3)
Zumbido	10 (16,7)	50 (83,3)
Dificuldade de ouvir em ambiente ruidoso	28 (46,7)	32 (53,3)
Dificuldade de entender a fala em grupo	44 (73,3)	16 (26,6)
Desconforto a sons intensos	28 (46,7)	32 (53,3)

Tabela 02 – Ocorrência do efeito de supressão das emissões otoacústicas produto de distorção em adultos jovens normo-ouvintes.

Efeito de supressão das EOAEPDs frequência/orelha	Presente N (%)	Ausente N (%)
2000Hz/orelha do lado direito	27 (45,0)	33 (55,0)
4000Hz/orelha do lado direito	30 (51,7)	28 (48,3)
6000Hz/orelha do lado direito	20 (34,5)	38 (65,5)
2000Hz/orelha do lado esquerdo	26 (43,3)	34 (56,7)
4000Hz/orelha do lado esquerdo	20 (33,3)	40 (66,7)
6000Hz/orelha do lado esquerdo	18 (30,5)	41 (69,5)

EOAEPDs = emissões otoacústicas produto de distorção; Hz = Hertz.

Analisando a ocorrência de efeito de supressão das EOAEPD por orelha (respostas presentes em pelo menos três das cinco frequências testadas), foi observado que na orelha do lado direito, 19 (31,7%) indivíduos apresentaram o efeito de supressão das EOAEPD e 41 (68,3%) não apresentaram o mesmo efeito. Na orelha esquerda, 16 (26,7%) indivíduos apresentaram o efeito de supressão das EOAEPD e 44 (73,3%) não apresentaram o efeito de supressão das EOAEPD.

Foi constatada interação entre gênero e comportamento tabagista na prevalência de algumas alterações nas funções da via auditiva eferente.

Indivíduos do gênero masculino não tabagistas apresentaram menor ocorrência de efeito de supressão das EOAEPD em 2000Hz na orelha do lado esquerdo ($n=05$, 33,3%) quando comparados aos tabagistas ($n=12$, 80%). Tal diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,010$). Em 6000Hz na orelha do lado esquerdo a presença do efeito de supressão das EOAEPD ocorreu em 42,9% ($n=6$) dos indivíduos do gênero masculino tabagistas e somente em 6,7% ($n=1$) dos não tabagistas ($p=0,023$). Nas demais frequências analisadas não ocorreram diferenças significativas entre efeito de supressão nos indivíduos do gênero masculino tabagistas e não tabagistas.

A ocorrência de dificuldade auditiva, zumbido, dificuldade de ouvir em ambiente ruidoso, dificuldade de entender a fala em grupo e desconforto a sons intensos, quando comparadas entre indivíduos do gênero masculino tabagistas e não tabagistas, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

No gênero feminino, com exceção da queixa de dificuldade de ouvir em ambiente ruidoso, todos os demais parâmetros avaliados foram similares entre tabagistas e não tabagistas. Como pode ser visualizado na Figura 03, os indivíduos do gênero feminino tabagistas apresentaram maior prevalência de queixa de dificuldade de ouvir em ambiente ruidoso quando comparados aos indivíduos do gênero feminino não tabagistas.

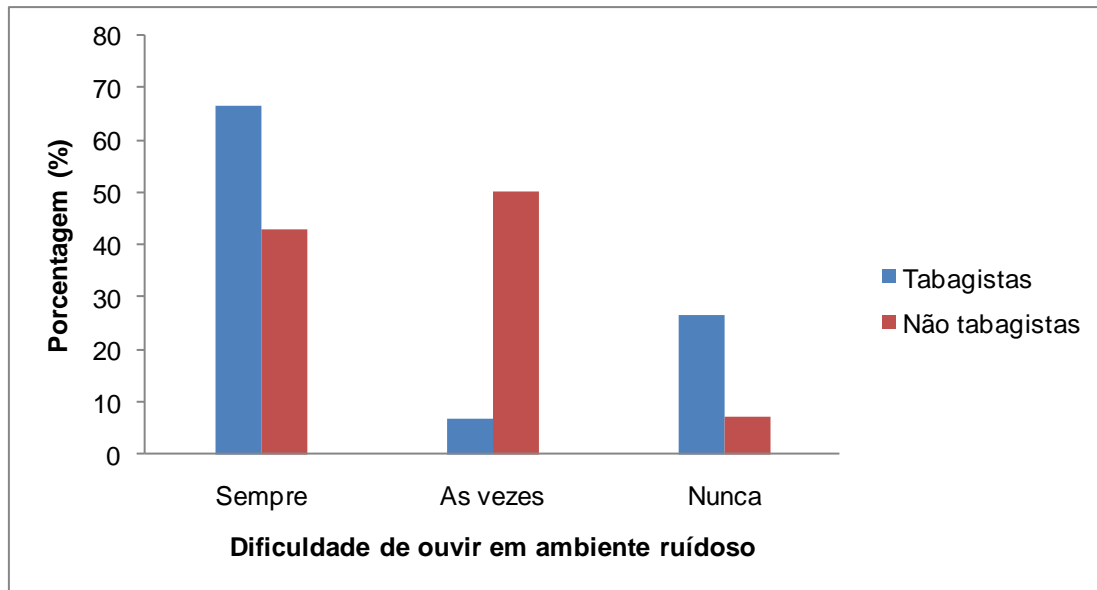


Figura 03 – Queixa de dificuldade de ouvir em ambientes ruidosos em indivíduos do gênero feminino, adultos jovens, normo-ouvintes, tabagistas e não tabagistas ($p=0,03$).

5.5.2 Indicadores de genotoxicidade

Os indicadores de genotoxicidade considerados no estudo foram comparados entre os indivíduos do gênero masculino e feminino com e sem comportamento tabagista através de análise multivariada. Os resultados observados são descritos na Tabela 03, que apresenta os valores gerais dos indicadores de genotoxicidade, que foram: o índice de dano ao DNA estimado pelo teste Ensaio Cometa, presença de células com um micronúcleo, dois micronúcleos, três micronúcleos e presença de células com pelo menos um micronúcleo (somatório de células com micronúcleos). Para efeitos comparativos, foram utilizados somente os resultados de índice de dano ao DNA por teste Cometa e o somatório de células com pelo menos um micronúcleo.

Tabela 03 – Comparação entre os indicadores de genotoxicidade conforme o gênero e hábito de tabagismo.

Genotoxicidade	T/NT	Gênero	Média	±DP
Índice de dano ao DNA - Ensaio Cometa	T	Masculino	43,90	28,25
		Feminino	67,80	36,47
		Total	55,85	34,28
	NT	Masculino	32,00	15,76
		Feminino	44,86	37,66
		Total	38,43	29,11
Número total de micronúcleos	T	Masculino	47,30	32,10
		Feminino	56,03	33,96
		Total	51,66	32,77
	NT	Masculino	39,86	20,88
		Feminino	55,86	24,87
		Total	47,86	23,98
Células com um micronúcleo	T	Masculino	23,03	14,30
		Feminino	28,10	14,97
		Total	25,56	14,61
	NT	Masculino	20,03	10,28
		Feminino	27,03	10,88
		Total	23,53	10,99
Células com dois micronúcleos	T	Masculino	12,80	9,37
		Feminino	15,00	10,00
		Total	13,90	9,59
	NT	Masculino	10,76	6,95
		Feminino	14,90	7,60
		Total	12,83	7,46
Células com três micronúcleos	T	Masculino	11,46	9,93
		Feminino	12,93	10,66
		Total	12,20	10,15
	NT	Masculino	9,06	5,14
		Feminino	13,93	7,61
		Total	11,50	6,84

T = tabagistas; NT = não tabagistas; DP = desvio padrão.

Diferente da prevalência de alterações nas funções da via auditiva eferente, não ocorreu interação entre gênero e tabagismo relacionado à genotoxicidade. Entretanto, foram observados efeitos independentes destas variáveis. No caso, indivíduos

tabagistas apresentaram uma média de dano ao DNA observada pelo Ensaio Cometa significativamente maior do que indivíduos não tabagistas ($p=0,033$). Também foi observado um maior índice de genotoxicidade pelo teste Ensaio Cometa nos indivíduos do gênero feminino ($p=0,025$), independente de ser tabagista.

5.5.3 Associação entre funções da via auditiva eferente e indicadores de genotoxicidade com a influência potencial do gênero e tabagismo

Não foram observadas associações significativas entre a ausência de efeito de supressão das EOAEPD, queixas de dificuldade de ouvir em ambiente ruidoso, dificuldade de entender a fala em grupo e desconforto a sons intensos e genotoxicidade.

Entretanto, indivíduos com queixa de dificuldade auditiva apresentaram um índice de dano ao DNA avaliado por teste Cometa significativamente maior ($64,14\pm 44,8$) do que indivíduos sem queixa de dificuldade auditiva ($45,59\pm 30,51$), ($p=0,049$). Este resultado foi independente do gênero e hábito de tabagismo. O autorrelato de zumbido também foi associado com maior índice de genotoxicidade ($63,15\pm 35,20$) ($p=0,027$). Similar ao observado para a dificuldade auditiva, não foi observada influência do gênero e tabagismo nesta associação.

5.6 Discussão

Os resultados aqui descritos mostraram que alguns indicadores das funções da via auditiva eferente avaliados no estudo são influenciados pela interação entre gênero e tabagismo. Adicionalmente, observou-se que tanto a queixa de dificuldade de audição quanto a ocorrência de zumbido possam estar associadas a maiores índices de genotoxicidade independente do gênero e do tabagismo. A relevância destes resultados

encontra-se no fato da população aqui estudada ainda ser de adultos jovens (18 a 32 anos) e normo-ouvintes.

Uma vez que há poucos estudos relacionados às funções da via auditiva eferente e genotoxicidade em normo-ouvintes adultos jovens, a seguir, serão discutidos em maior detalhe os resultados obtidos, a começar pelas estimativas de prevalência de alterações que foram observadas.

Para o gênero masculino, o efeito de supressão das EOAEPD ocorreu em maior porcentagem nas frequências de 2000Hz da orelha do lado esquerdo e 6000Hz da orelha do lado direito, apenas em homens tabagistas. O fato de os tabagistas apresentarem maior ocorrência de efeito de supressão das EOAEPD pode ser justificado por uma das substâncias encontradas no cigarro ser a nicotina. Associado a isso, a pesquisa de Lustig (2006), que estudou o receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 9$ e $\alpha 10$, relatou que recentemente essas unidades foram identificadas como componentes críticos do sistema auditivo via sistema olivococlear medial e as propriedades farmacológicas deste receptor assemelham-se a resposta colinérgica de células ciliadas externas. Conforme o autor, esse receptor desempenha um papel na mediação da resposta das fibras auditivas eferentes, pois é responsável pela inibição eferente coclear, fato que justifica em partes o achado do presente estudo.

Para as demais queixas auditivas analisadas relacionadas às funções da via auditiva eferente, não ocorreram diferenças significativas entre homens tabagistas e não tabagistas. Esses resultados não puderam ser comparados com outros estudos, pois não foram encontrados relatos similares a esta investigação na literatura científica indexada sobre as funções da via auditiva eferente em indivíduos tabagistas. Entretanto, é importante salientar que o tabagismo interfere na função auditiva. Cruickshanks (1998) relatou que o fumo pode alterar a audição através de seus efeitos sobre os processos antioxidantes ou nos vasos sanguíneos que fornecem os órgãos da audição. Zelman (1973) relatou que fumar produz aumento do nível de dióxido de carbono e nicotina. Este fato pode comprimir veias sanguíneas ou causar contração das veias e oclusões trombóticas. Existe um número consistente de estudos que sugerem fortemente ser o tabagismo um fator de risco associado à perda da audição

(CRUICKSHANKS et al, 1998; NOORHASSIM & RAMPAL, 1998; SHARABI et al, 2002; AGRAWAL et al, 2009; OLIVEIRA & LIMA, 2009).

Tabagistas do gênero feminino apresentaram predomínio de queixa de dificuldade de entender a fala em ambiente ruidoso (Figura 03). Acredita-se que estas queixas estejam relacionadas com o sistema auditivo eferente, pois, de acordo com Breuel (2001), esse sistema é importante na proteção contra o ruído, localização da fonte sonora e melhora na detecção da fonte sonora em ambientes ruidosos, entretanto, não foram encontrados relatos de o tabagismo interferir nesta função.

No presente estudo foi observado que os indivíduos tabagistas, independente do gênero, e as mulheres, independentes de serem tabagistas, apresentaram índices elevados de genotoxicidade, o que foi evidenciado pelas diferenças estatisticamente significativas nos índices de dano ao DNA por teste Cometa, que avalia genotoxicidade provocada por estresse oxidativo (Tabela 03). Outros estudos evidenciam que o tabagismo provoca aumento do estresse oxidativo, causando genotoxicidade (AGNEZ-LIMA et al, 2001; BJELLAND & SEEBERG, 2003; ARBOLEDA-MORENO et al, 2004).

Verificando a ocorrência de interação entre genotoxicidade e funções da via auditiva eferente, foi observado que somente os indivíduos com queixas de dificuldade da audição e zumbido, independente de gênero ou hábito de tabagismo, apresentaram maiores índices de genotoxicidade com diferenças estatisticamente significativas. As demais funções da via auditiva eferente não apresentaram associação positiva com genotoxicidade nos indivíduos analisados no presente estudo. Não foram encontrados na literatura compulsada estudos que avaliem a associação entre aspectos funcionais da via auditiva eferente e genotoxicidade provocada por estresse oxidativo, entretanto, pelo fato do estresse oxidativo ocorrer em qualquer parte do organismo, é sugerido que também poderia estar interferindo nas funções da via auditiva eferente. Um estudo que relaciona o estresse oxidativo à audição é o de Van Campen et al (2002), que sugeriram que o estresse oxidativo estaria implicado como um fator importante nos eventos cocleares, como perda auditiva neurossensorial induzida por ruído ou medicamentos ototóxicos.

O conjunto dos resultados aqui descritos pode ser considerado relevante, ainda que existam limitações metodológicas no estudo. Estas incluem: pequeno tamanho da

amostra e ser a referida pesquisa um estudo transversal. Entretanto, estudos exploratórios iniciais, como é o caso, geralmente baseiam-se em análises com tal delineamento a fim de indicar se investigações complementares com um maior tamanho amostral e com delineamentos longitudinais ou de intervenção são necessárias. Por tal motivo, acredita-se que este trabalho possua relevância na área da saúde auditiva e seus distúrbios.

5.7 Conclusões

O presente estudo sugere que em adultos jovens normo-ouvintes que referem queixas relacionadas às funções da via auditiva eferente, como zumbido e dificuldade auditiva, já é possível observar associação com estresse oxidativo, mais especificamente com genotoxicidade considerando interações entre gênero e tabagismo. Entretanto, investigações complementares que visem analisar a influência de outras variáveis em tal associação são necessárias.

5.8 Referências Bibliográficas

AGNEZ-LIMA, L.F. et al. Base excision repair in sugarcane. **Genetics and Molecular Biology**, v. 24, n. 1-4, p. 123-129, 2001.

AGRAWAL, Y.; PLATZ, E.A.; NIPARKO, J.K. Risk factors for hearing loss in US adults: data from the national health and nutrition examination survey, 1999 to 2002. **Otology & Neurotology**, v. 30, p. 139-145, 2009.

ARBOLEDA-MORENO, Y. et al. Genotoxicidad por exposición a cigarrillos en fumadores jóvenes en Colombia. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 15, n. 6, p. 367-372, 2004.

BJELLAND, S.; SEEBERG, E. Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. **Mutation Research**, v. 29, p. 37-80, 2003.

BREUEL, M.L.F.; SANCHEZ, T.G.; BENTO, R.F. Vias auditivas eferentes e seu papel no sistema auditivo. **Arquivos Internacionais de Otorrinolaringologia**, v. 5, n. 2, p. 62-67, 2001.

COLLINS, A.R.; MA, A.G.; DUTHIE, S.J. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells, **Mutation Research (DNA Repair)**, v. 336, p. 69-77, 1995.

CRUICKSHANKS, K.J. et al. Cigarette smoking and hearing loss: the epidemiology of hearing loss study. **The Journal of the American Medical Association**, v. 279, p. 1715-1719, 1998.

CSISZAR, A. et al. Oxidative stress and accelerated vascular aging: implications for cigarette smoking. **Frontiers in Bioscience: a journal and virtual library**, v. 14, p. 3128-3144, 2009.

DURANTE, A. S.; CARVALLO, R. M. M. Mudanças das emissões otoacústicas por transientes na supressão contralateral em lactentes. **Pró-Fono Revista de Atualização Científica**, v. 18, n. 1, p. 49-56, 2006.

FÁVERO, M.L. et al. A função do trato olivococlear medial em indivíduos com zumbido. **Arquivos Internacionais de Otorrinolaringologia**, v. 7, n. 4, 2003.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, n. 1-2, p. 81-95, 2000.

GARCIA, O. et al. Sensitivity and variability of visual scoring in the comet assay: Results of an interlaboratory scoring exercise with the use of silver staining. **Mutation Research**, v. 556, p. 25-34, 2004.

GUINAN, J.J.J. Olivocochlear efferents: anatomy, physiology, function, and the measurement of efferent effects in humans. **Ear and Hearing**, v. 27, n. 6, p. 589-607, 2006.

JERGER, J. Clinical experience with impedance audiometry. **Arch Otolaryngol**, v. 92, n. 4, p. 311-324, 1970.

JERGER, J; SPEACKS, C.; TRAMMELL, J. A new approach to speech audiometry. **The Journal of Speech and Hearing Disorders**, v. 33, p. 318, 1968.

JERGER, S.; JERGER, J. **Alterações auditivas: uma manual para avaliação clínica**. Atheneu: São Paulo; 1989. 102 p.

KEMP, DT. Stimulated acoustic emissions from within the human auditory system. **Journal of the acoustic society of America**, v.64, p. 1386-1391, 1978.

LLOYD, L. L.; KAPLAN, H. **Audiometric interpretation: a manual o basic audiometry**. University Park Press: Baltimore; 1978. p. 16-17, 94.

LUSTIG, L.R. Nicotinic acetylcholine receptor structure and function in the efferent auditory system. **The Anatomical Record Part A**, v. 288A, p. 424-434, 2006.

NOORHASSIM, I.; RAMPAL, K. G. Multiplicative effect of smoking and age on hearing impairment. **American Journal of Otolaryngology**, v.19, p. 240-243, 1998.

OLIVEIRA, D.C.C.M.; LIMA, M.A.M.T. Da audiometria tonal limiar em baixa e alta frequência: comparação dos limiares auditivos entre tabagistas e não-tabagistas. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 75, n. 5, p. 738-744, 2009.

SAHLEY, T.L.; NODAR, R.H.; MUSIEK, F.E. **Efferent Auditory System: structure and function**. 1ª ed. San Diego: Singular publishing group; 1997, p.1-23.

SHARABI, Y. et al. Cigarette Smoking and Hearing Loss: Lessons from the Young Adult Periodic Examinations in Israel (YAPEIS) Database. **The Israel Medical Association journal: IMAJ**, v. 4, p. 1118-1120, 2002.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003, v. 1, 422 p.

SINGH, N.P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SPINELLI, M.; BREUEL, M.L.F. Vias Auditivas Eferentes. **Distúrbios da Comunicação**, v. 11, n. 1, p. 125-130, 1999.

VAN CAMPEN, L.E. et al. Oxidative DNA damage is associated with intense noise exposure in the rat. **Hearing Research**, v. 164, p. 29-38, 2002.

ZELMAN, S. Correlation of smoking history with hearing loss. **The Journal of the American Medical Association**, v. 223, p. 920-920, 1973.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNEZ-LIMA, L.F. et al. Base excision repair in sugarcane. **Genetics and Molecular Biology**, v. 24, n. 1-4, p. 123-129, 2001.

AGRAWAL, Y.; PLATZ, E.A.; NIPARKO, J.K. Prevalence of hearing loss and differences by demographic characteristics in US adults: data from the National Health and Nutrition Examination Survey. **Archives of Internal Medicine**, v.168, p. 1522-1530, 2008.

AGRAWAL, Y.; PLATZ, E.A.; NIPARKO, J.K. Risk factors for hearing loss in US adults: data from the national health and nutrition examination survey, 1999 to 2002. **Otology & Neurotology**, v. 30, p. 139-145, 2009.

ARBOLEDA-MORENO, Y. et al. Genotoxicidad por exposición a cigarrillos en fumadores jóvenes en Colombia. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 15, n. 6, p. 367-372, 2004.

ASHA (American Speech – Language – Hearing Association). Disponível em: <http://www.asha.org/public/hearing/disorders/default.htm>. Acesso em 05 out 2007.

BJELLAND, S.; SEEBERG, E. Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. **Mutation Research**, v. 29, p. 37-80, 2003.

BOBBIN, R. P.; GONDRA, M. I. Effect of nicotine on cochlear function and noise-induced hair cell loss. **The Annals of Otology, Rhinology and Laryngology**, v. 85, p. 247-254, 1976.

BRANT, L.J. et al. Risk factors related to age-associated hearing loss in the speech frequencies. **Journal of the American Academy of Audiology**, v. 7, p. 152-160, 1996.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Prevalência de tabagismo no Brasil**. Coordenação de Prevenção e Vigilância/INCA/MS, Rio de Janeiro, maio de 2004.

BROWNING, G.G.; GATEHOUSE, S.; LOWE, G.D. Blood viscosity as a factor in sensorineural hearing impairment. **Lancet**, v. 1, p. 121-123, 1986.

BREUEL, M.L.F.; SANCHEZ, T.G.; BENTO, R.F. Vias auditivas eferentes e seu papel no sistema auditivo. **Arquivos de Otorrinolaringologia**, v. 5, n. 2, p. 62-67, 2001.

CALLEJO, F.J.G. et al. Efecto de la supresión del tabaco en la hipoacusia inducida por ruido laboral: estudio preliminary. **Acta Otorrinolaringologica Espanola**, v. 57, p. 432-434, 2006.

CARRARD, V.C. et al. Teste dos Micronúcleos – Um biomarcador de dano genotóxico em células descamadas da mucosa bucal. **Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre**, v. 48, n. 1-3, p. 77-81, 2007.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Youth risk behavior surveillance — United States, 2007. Surveillance summaries. **Morb Mortal Wkly Rep**, v. 57, p. 1-136, 2008.

CLERICI, W.J.; YANG, L. Direct effects of intraperilymphatic reactive oxygen species generation on cochlear function. **Hearing Research**, v. 101, p.14-22, 1996.

COCCHIARELLA, L. A.; SHARP, D. S.; PERSKY, V. W. Hearing threshold shifts, white-cell count and smoking status in working men. **Occupational Medicine**, v.45, p.179-185, 1995.

COLLET, L. et al. Contralateral auditory stimulation and otoacoustic emissions: a review of basic data in humans. **British Journal of Audiology**, v. 28, n. 4, p. 213- 218, 1994.

COLLET, L. et al. Effect of contralateral auditory stimuli on active cochlear micro-mechanical properties in human subjects. **Hearing Research**, v. 43, n. 2 e 3, p. 251-261, 1990.

COLLINS, A.R.; MA, A.G.; DUTHIE, S.J. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells, **Mutation Research (DNA Repair)**, v. 336, p. 69-77, 1995.

CRUICKSHANKS, K.J. et al. Cigarette smoking and hearing loss: the epidemiology of hearing loss study. **The Journal of the American Medical Association**, v. 279, p. 1715-1719, 1998.

CSISZAR, A. et al. Oxidative stress and accelerated vascular aging: implications for cigarette smoking. **Frontiers in Bioscience: a journal and virtual library**, v. 14, p. 3128-3144, 2009.

CUNNINGHAM, D.R.; VISE, L.K.; JONES, L.A. Influence of cigarette smoking on extra-high-frequency auditory thresholds. **Ear and Hearing**, v. 4, p.162-165, 1983.

DURANTE, A. S.; CARVALLO, R. M. M. Mudanças das emissões otoacústicas por transientes na supressão contralateral em lactentes. **Pró-Fono Revista de Atualização Científica**, v. 18, n. 1, p. 49-56, 2006.

FÁVERO, M.L. et al. A função do trato olivococlear medial em indivíduos com zumbido. **Arquivos Internacionais de Otorrinolaringologia**, v. 7, n. 4, 2003.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, n. 1-2, p. 81-95, 2000.

FERRITE, S.; SANTANA, V. Joint effects of smoking, noise exposure and age o hearing loss. **Occupational Medicine**, v. 55, p. 48-53, 2005.

FREITA, V.S. et al. Efeitos genotóxicos de fatores considerados de risco para o câncer bucal. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 29, n. 2, p. 189-199, 2005.

GARCIA, O. et al. Sensitivity and variability of visual scoring in the comet assay: Results of an interlaboratory scoring exercise with the use of silver staining. **Mutation Research**, v. 556, p. 25-34, 2004.

GUINAN, J.J.J. Olivocochlear efferents: anatomy, physiology, function, and the measurement of efferent effects in humans. **Ear and Hearing**. v. 27, n. 6, p. 589-607, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERDGE, J.M.C. The chemistry of free radicals and, related 'reactive species'. In: _____. **Free radicals in biology and medicine**. 3rd, ed. Oxford: Clarenton Press, 1999. p. 36-104.

HANDROCK, M.; MATTHIAS, R. Nikotin, eine ototoxische Substanz? **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 235, n. 2-3, p. 659-662, 1982.

HARKRIDER, A.W.; HEDRICK, M.S. Acute effect of nicotine on auditory gating in smokers and non-smokers. **Hearing Research**, v. 202, p. 114-128, 2005.

JERGER, J. Clinical experience with impedance audiometry. **Arch Otolaryngol**, v. 92, n. 4, p. 311-324, 1970.

JERGER, J; SPEACKS, C.; TRAMMELL, J. A new approach to speech audiometry. **The Journal of Speech and Hearing Disorders**, v. 33, p. 318, 1968.

JERGER, S.; JERGER, J. **Alterações auditivas: uma manual para avaliação clínica**. Atheneu: São Paulo; 1989. 102 p.

JOHN, U. et al. Associations of carotid intima-media thickness, tobacco smoking and overweight with hearing disorder in a general population sample. **Atherosclerosis**, v. 195, p. 144-149, 2007.

KEMP, DT. Stimulated acoustic emissions from within the human auditory system. **Journal of the acoustic society of America**, v.64, p. 1386-1391, 1978.

KEMP, D.T. Development in cochlear mechanics and techniques for noninvasive evaluation. **Advanced Audiology**, v. 5, p. 27-45, 1988.

KIYOSAWA, H. et al. Cigarette Smoking Induces Formation of 8-Hydroxydeoxyguanosine, One of the Oxidative DNA Damages in Human Peripheral Leukocytes. **Free Radical Research**, v. 11, n. 1, p. 23-27, 1990.

LACERDA, A.; LEROUX, T.; MORATA, T. Efeitos ototóxicos da exposição ao monóxido de carbono: uma revisão. **Pró-Fono Revista de Atualização Científica**, v. 17, n. 3, p. 403-412, 2005.

LLOYD, L. L.; KAPLAN, H. **Audiometric interpretation: a manual o basic audiometry**. University Park Press: Baltimore; 1978. p. 16-17, 94.

LUCESOLI, F.; FRAGA, C. Evaluación del estres oxidativo. **Antioxidantes y Calidad de Vida**, v. 1, n. 4, p. 8-13, 1995.

LUSTIG, L.R. Nicotinic acetylcholine receptor structure and function in the efferent auditory system. **The Anatomical Record Part A**, v. 288A, p. 424-434, 2006.

MAFFEI, G.; MIANI, P. Experimental tobacco poisoning: resultant structural modification of the cochlea and tuba acustica. **Arch Otolaryngol.**, v. 75, p. 386-396, 1962.

MC GREGOR, D. Carcinogenicity and genotoxic carcinogens. In: ___ Ballantyne, B.; T. Mars & T. Syversen, eds. **General and Applied Toxicology**. 2nd, Ed London: Macmillan Reference. 2000. p. 1099-1117.

MEIRELES, J.R.C. et al. Apoptose em células esfoliadas da mucosa bucal de indivíduos ocupacionalmente expostos a agentes mutagênicos e carcinogênicos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 4, p. 337-343, 2006.

MIZOUE, T.; MIYAMOTO, T.; SHIMIZU, T. Combined effect of smoking and occupational exposure to noise on hearing loss in steel factory workers. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 60, p. 56-59, 2003.

MORTON, N. E. Genetic epidemiology of hearing loss. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 630, p. 32-37, 1991.

NEGLEY, C. et al. Effects of cigarette smoking on distortion produce otoacoustic emissions. **Journal of the American Academy of Audiology**, v. 18, p. 665-674, 2007.

NOMURA, K.; NAKAO, M.; MORIMOTO, T. Effect of smoking on hearing loss: quality assessment and meta-analysis. **Preventive Medicine**, v. 40, n. 2, p. 138-144, 2005.

NOORHASSIM, I.; RAMPAL, K. G. Multiplicative effect of smoking and age on hearing impairment. **American Journal of Otolaryngology**, v.19, p. 240-243, 1998.

OLIVEIRA, D.C.C.M.; LIMA, M.A.M.T. Da audiometria tonal limiar em baixa e alta frequência: comparação dos limiares auditivos entre tabagistas e não-tabagistas. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 75, n. 5, p. 738-744, 2009.

PALMER, K.T. et al. Cigarette smoking, occupational exposure to noise, and self reported hearing difficulties. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 61, p. 340-344, 2004.

POURYAGHOUB, G.; MEHRDAD, R.; MOHAMMADI, S. Interaction of smoking and occupational noise exposure on hearing loss: a cross-sectional study. **BMC Public Health**, v. 7, p.137, 2007.

RAMIREZ, A.; SALDANHA, P.H. Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. **Genetics and Molecular Research: GMR**, v. 1, n. 3, p. 246-260, 2002.

RANDY, J.K.J. Cytoarchitecture of the human superior olivary complex: Nuclei of the trapezoid body and posterior tier. **Hearing Research**, v. 241, p. 52-63, 2008.

ROBINETTE, M.S.; GLATTKE, T.J. **Ottoacoustic Emissions: Clinical Applications**. New York: Thieme, 1997.

SAHLEY, T.L.; NODAR, R.H.; MUSIEK, F.E. **Efferent Auditory System, structure and function**. 1^a ed. San Diego: Singular publishing group; 1997, p.1-23.

SHARABI, Y. et al. Cigarette Smoking and Hearing Loss: Lessons from the Young Adult Periodic Examinations in Israel (YAPEIS) Database. **The Israel Medical Association journal: IMAJ**, v. 4, p. 1118-1120, 2002.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003, v. 1, 422 p.

SINGH, N.P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SPINELLI, M.; BREUEL, M.L.F. Vias Auditivas Eferentes. **Distúrbios da Comunicação**, v. 11, n. 1, p. 125-130, 1999.

STICH, H.F.; ROSIN, M.P. Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal mucosa cells. **International Journal of Cancer**, v. 31, n. 3, p. 305-308, 1983.

SUHAS, S. et al. Application of the micronucleus test to exfoliated epithelial cells from the oral cavity of beedi smokers, a high-risk group for oral cancer. **Mutation Research**, v. 561, n. 1-2, p. 15-21, 2004.

TOLBERT, P.E.; SHY, C.M.; ALLEN, J.W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. **Mutation Research**, v. 271, n. 1, p. 69-77, 1992.

TORRE III, P. et al. Risk factors for distortion product otoacoustic emissions in young men with normal hearing. **Journal of the American Academy of Audiology**, v. 18, p. 749-759, 2007.

VALKO, M. et al. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 266, p. 37-56, 2004.

VALLEJO, J. C. et al. Detecção precoce de ototoxicidade usando emissões otoacústicas produtivas de distorção. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 67, n. 6, p. 845-51, 2001.

VAN CAMPEN, L.E. et al. Oxidative DNA damage is associated with intense noise exposure in the rat. **Hearing Research**, v. 164, p. 29-38, 2002.

VIROKANNAS, H.; ANTTONEN, H. Dose-response relationship between smoking and impairment of hearing acuity in workers exposed to noise. **Scandinavian Audiology**, v. 24, n. 4, p. 211-216, 1995.

WILD, D.C., BREWSTER, M.J., BANERJEE, A.R. Noise-induced hearing loss is exacerbated by long-term smoking. **Clinical Otolaryngology: official journal of ENT-UK**, v. 30, p. 517-520, 2005.

WILLIAMS, E.A.; BROOKES, G.B.; PRASHER, D. K. Effects of olivocochlear bundle section on otoacoustic emissions in humans: efferent effects in comparison with control subjects. **Acta Oto-Laryngologica**, v. 114, n. 2, p. 121-129, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em: <http://www.who.int/en/>. Acesso em: 05 outubro 2007.



WUNSCH FILHO, V.; GATTAS, G.J.F. Biomarcadores moleculares em câncer: implicações para a pesquisa epidemiológica e a saúde pública. **Cadernos de Saúde Pública**, v.17, n. 3, p. 467-480, 2001.

ZELMAN, S. Correlation of smoking history with hearing loss. **The Journal of the American Medical Association**, v. 223, p. 920-920, 1973.

ZOROWKA, P.G.; SCHMITT, H.J.; GUTJAHR, P. Evoked otoacoustic emissions and pure tone threshold audiometry in patients receiving cisplatinun therapy. **International Journal of Pediatric Otorrinolaryngology**, v. 25, p. 73-80, 1993.

ANEXOS

ANEXO I: Carta de aprovação do comitê de ética em pesquisa da UFSM.

 MINISTÉRIO DA SAÚDE Conselho Nacional de Saúde Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)	 UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa Comitê de Ética em Pesquisa - CEP- UFSM REGISTRO CONEP: 243
--	---

CARTA DE APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa – UFSM, reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – (CONEP/MS) analisou o protocolo de pesquisa:

Título: Estudos in vivo e ex vivo da dieta e atividade física na modulação dos efeitos pró-oxidantes do fumo.

Número do processo: 23081.012293/2007-03

CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética): 0146.0.243.000-07

Pesquisador Responsável: Ivana Beatrice Manica da Cruz


Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes estabelecidas na Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê. O pesquisador deve apresentar ao CEP:

Dezembro/2008	Relatório parcial
Dezembro/2009	Relatório parcial
Dezembro/2010	Relatório parcial
Dezembro/2011	Relatório final

Os membros do CEP-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

DATA DA REUNIÃO DE APROVAÇÃO: 09/10/2007

Santa Maria, 18 de outubro de 2007.


 Prof. Dr. Carlos Ernando da Silva
 - Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa – UFSM
 Registro CONEP N. 243.

Comitê de Ética em Pesquisa - UFSM - Av. Roraima, 1000 – Prédio da Reitoria - 7º andar - Campus Universitário
 97105-900 – Santa Maria – RS - - Tel: 0 xx 55 3220 9362 – email: comiteeticapesquisa@mail.ufsm.br

ANEXO II: Instrumento de avaliação do projeto de pesquisa “Nutrigenética e Tabagismo: Estudos In Vivo e Ex Vivo da Dieta e Atividade Física na Modulação dos Efeitos Pró-Oxidantes do Fumo”.

1. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO VOLUNTÁRIO NA PESQUISA-MODELO

Instruções: O questionário deve ser preenchido individualmente, e deve ser preenchido pelo entrevistador
 Determine o número de registro do voluntário e NÃO ESQUEÇA DE ESCREVER ESTE NÚMERO NO TCLE!
 TAMBÉM ESCREVA o número de registro do voluntário **nos quadros em branco** que está no canto superior direito da página.

Nome do coletador: _____ Número coletador: _____

Assinatura do coletador: _____ Rubrica: _____

Data da coleta: ____/____/2008. Horário do início da aplicação do instrumento: _____

Determinação do Número Final de Identificação do Voluntário:

Sexo (1-homem , 2 –mulher) = ____ (1 dígito)

Grupo: 1-tabagista (fumou no mínimo 100 cigarros nos últimos 90 dias), 2-não-tabagista (nunca experimentou tabaco), 3-ex-tabagista com mais ou igual a 10 anos de abandono-, 4- Já experimentou tabaco **mas** nunca fumou de modo constante, 5- fuma esporadicamente, em festas ou outras ocasiões, sem que este hábito ultrapasse 100 cigarros em um período de 90 dias), 6- abandonou o fumo a menos de dez anos= ____ (1 dígito)

Procedência (1-Servidor/aluno, 2-Comunidade, 3-Hospital, 4-Outro)= ____ (1 dígito)

Número do coletador= _____ (três dígitos)

Número linear dado pelo coletador = _____ (três dígitos)

REGISTRO FINAL (09 DIGITOS): _____ - _____ - _____

2. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO VOLUNTÁRIO E DO PERFIL SÓCIOECONOMICO CULTURAL

Instruções:

Preencha as informações solicitadas.

Para as questões categóricas marque um CÍRCULO no número da informação correta. Em caso de erro, faça um X sobre este círculo, rubrique e marque o CÍRCULO na informação correta.

ATENÇÃO SE ERRAR ALGUMA INFORMAÇÃO NÃO RASURE!. Coloque um traço sobre a informação. Rubrique e escreva a informação correta, novamente (na parte superior ou inferior do local onde a mesma

deveria ser redigida). Utilize o número 99 em caso de informações NÃO APLICÁVEIS. Por exemplo: idade da menarca (homens não têm menarca!)

Nome do voluntário:

Endereço para

contato: _____ **Telefone:** _____

Município de residência: _____

Naturalidade (Município-Estado): _____

Email: _____

Data de Nascimento: ____/____/____. **Sexo:** (0) Masculino (1) Feminino

Estado civil: (0) Casado/União Estável (1) Solteiro (2) Viúvo (3) Divorciado, desquitado (4) Outros

Renda (Salários Mínimos): (0) própria (1) Da família (2) Outra (bolsa, estágio, etc.)

Situação Funcional: (0) Trabalhador/Autônomo (1) Aposentado (2) Estudante (3) Atividades sem renda própria. Ex. do lar

O Sr.(a) ou o seu mantenedor, ou sua família possui: **Moradia:** (0) Própria (1) Alugada (2) Outros

E escolaridade (anos de estudos aprovados):(0) Não estudou (1) < 3 anos (2) < 8 anos (3) 8 a ≤ 12 anos (4) >12

Instrução: Pergunte ao voluntário até que nível ele estudou. Após, estime o número de anos estudados. Considere indivíduos que fizeram supletivo de 1º grau como 8 anos de estudo e de 2º grau como 8 a 12 anos de estudo.

3. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DO VOLUNTÁRIO

Instrução: Informação autorrelatada pelo voluntário.

Peso: ____ (em quilos, ex. 72,5) **Altura:** ____ (em metros, ex. 1,73)

Instruções: (1) solicite que o voluntário fique de pé, com os pés juntos; (2) solicite que o voluntário coloque a mão no umbigo por cima das vestimentas; (3) tomando o umbigo como referência meça a circunferência abdominal com a fita métrica. Anote este número em centímetros.

Medida da circunferência abdominal (em centímetros): _____

3.1 Características Biológicas e Saúde Feminina:

Instrução: No caso dos homens ou de mulheres que não entraram ainda na menopausa preencher os itens não aplicáveis com o número 99.

Menarca (idade): ____ **Número de filhos:** ____ **Menopausa (idade)** _____

Uso de anticoncepcionais hormonais: (0) Usa (1) Nunca usou (2) Já usou

Uso de reposição hormonal: (0) Usa (1) Nunca usou (2) Já usou

Idade que iniciou o uso de reposição hormonal: _____

4. CARACTERÍSTICAS DO ESTILO DE VIDA

4.1 Comportamento dietético

Toma café-da-manhã: (0) Regularmente (1) Às vezes (2) Não toma

Frequência que come algum tipo de fruta (suco, in natura) ou verduras e legumes:

(0) \geq 5 dias na semana (1) 3-4 dias (2) $<$ 3 dias

Frequência que come algum tipo de doce (sobremesa, chocolate, balas), salgadinhos, bolachinhas:

(0) \geq 5 dias na semana (1) 3-4 dias (2) $<$ 3 dias

Frequência que come carne nas refeições (gado, porco, aves, peixes)

(0) \geq 5 dias na semana (1) 3-4 dias (2) $<$ 3 dias

Frequência que toma café preto (além do café da manhã que não deve ser contado)

(0) diária (1) eventual (2) não toma

Se toma diariamente, quantas xícaras de cafezinho por dia _____

Frequência que toma chimarrão ou chá:

(0) diária (1) eventual (2) não toma

4.2 Comportamento de Atividade Física e Perfil Laboral

Qual a sua profissão ou curso? _____

Você trabalha/estuda sentado a maior parte do tempo? (0) Sim (1) Não

Quantas horas diárias permanece sentado nestas atividades? _____

Nos últimos seis meses participou de atividade física regular por pelo menos duas vezes na semana?

(0) Sim (1) Não

Qual?

(0) Caminhada orientada (1) Musculação (2) Atividade aeróbica (3) Musculação+ aeróbica (4) Esportes como natação, futebol, vôlei, etc. (5) Outros.

Quantas vezes na semana? _____ Tempo que gasta? (0) $<$ 1 hora (1) \geq 1 hora

Peça para ele distribuir os seus hábitos cotidianos de segunda a sexta, nos últimos seis meses, conforme as atividades listadas de tal monta que feche 24 horas.

Atividades	Horas
Dormindo	
Sentado (estudando, trabalhando, vendo tv, acessando o computador, fazendo tricô, lendo jornal, deslocando de carro ou outro meio de transporte, etc).	
Demais atividades em pé se deslocando ou permanecendo no mesmo lugar para o trabalho, no trabalho, supermercado, bancos, lavando louça, cozinhando, passando roupa, fazendo a higiene pessoal e outras atividades relacionadas. Realizando atividades que façam o Sr(a) correr, suar, aumentar os batimentos cardíacos como em trabalhos domésticos, ao lavar roupa a mão, ao limpar a casa (varrer, passar aspirador de pó, etc.), no seu trabalho diário, fazendo algum esporte (futebol, fazer academia, etc.).	
Total	24

Instrução: Cuidar para os voluntários não considerarem como atividade sentada somente trabalho e estudo! Em caso de indivíduos que declarem realizar mais de 6 horas se deslocando ou permanecendo de pé no mesmo lugar, peça para que ele revise esta questão e elencando que tipo de atividade ele realiza!

5. PERFIL DE SAÚDE E USO DE FÁRMACOS

5.1 Doenças crônicas não-transmissíveis prévias

Algum médico já lhe disse que o Sr (a) tem alguma destas doenças?

Hipertensão (pressão alta)	(0) Sim (1) Não	Depressão	(0) Sim (1) Não
Diabetes mellitus	(0) Sim (1) Não	Úlcera	(0) Sim (1) Não
Dislipidemia (colesterol alto)	(0) Sim (1) Não	Constipação (prisão de ventre)	(0) Sim (1) Não
Infarto agudo do miocárdio	(0) Sim (1) Não	Alergia	(0) Sim (1) Não.
Angina (dor no peito)	(0) Sim (1) Não	Trombose, Insuficiência cardíaca	(0) Sim (1) Não
Derrame (AVC)	(0) Sim (1) Não	Câncer	(0) Sim (1) Não
Asma, bronquite, enfisema	(0) Sim (1) Não	Qual?	
Artrite, reumatismo	(0) Sim (1) Não	Idade?	

Problemas emocionais	(0) Sim (1) Não		
----------------------	-----------------	--	--

5.2 Doenças infecto-parasitárias prévias DE FORMA ESPORADICA de medicamentos nos últimos SEIS MESES.

O Sr.(a) apresentou alguma doença viral ou infecciosa nestes últimos 6 meses (gripe, diarreia, infecção de garganta, ouvido, etc)? (0) Sim (1) Não

Fez uso de antibióticos? (0) Sim (1) Não Fez uso de anti-inflamatório? (0) Sim (1) Não

Fez uso de medicamentos para a febre, dor ou relaxante muscular? (0) Sim (1) Não

Fez uso de medicamentos para dormir (diazepan ou outros)? (0) Sim (1) Não

Fez uso de medicamentos para permanecer acordado, ou atento, como por exemplo ritalina? (0) Sim (1) Não

5.3 Polifarmácia (MAIS DE SEIS MESES)

Usa medicação diária para alguma doença crônica? (0) Sim (1) Não

Nº de medicações ingeridas diariamente no mínimo há seis meses (exceto anticoncepcional e reposição hormonal)? _____

Usa ou já usou medicação por indicação médica para depressão, ansiedade, estresse ou outro distúrbio psicológico? (0) Sim (1) Não

Indicação do medicamento

(0) Hipertensão (1) Diabetes (2) Colesterol (3) Coração (4) Neoplasia (câncer) (5) Osteoporose (6) Hiperatividade

(7) Anti-inflamatório (8) Outros. Coloque os números marcados em seqüência _____

Obs:* Se o voluntário toma mais que um tipo coloque os números em seqüência. Por exemplo: Medicação para hipertensão, coração, osteoporose – 035

5.4 Indicadores de saúde auditiva e visual

Como você define a sua audição? (0) Excelente (1) Boa (2) Regular (3) Ruim

(Se o voluntário relatar problemas de audição em um dos ouvidos considere este como referência para classificar a audição).

Você tem zumbido? (0) O zumbido aparecem constantemente. (1) Às vezes em determinadas situações. (2) Não tem zumbido.

Instrução: Se o voluntário relatar que tem zumbido apenas em um dos ouvidos considere este como referência para classificar a audição.

Como você define a sua visão (0) Excelente (1) Boa (2) Regular (3) Ruim

6. TABAGISMO

O Sr(a) convive com fumantes no seu dia a dia permanecendo em ambiente com fumaça de cigarro por mais de 04 horas ao dia? (0) Sim (1) Não

(Aplique esta etapa somente para ex-fumantes, fumantes e fumantes esporádicos.)

Idade que começou a fumar? _____

Por quanto tempo (anos) parou de fumar ainda que tenha retornado? _____

Quantas vezes o Sr(a) tentou parar de fumar?

(1) Nunca tentou (2) < 3 vezes (3) Muitas vezes

Qual a marca comercial de cigarro dos últimos seis meses? _____.

Instrução: a partir da marca relatada identifique a quantidade de nicotina e alcatrão e anote aqui estas concentrações:

Nicotina: _____ **Alcatrão:** _____

Valor (reais) da carteira de cigarros: R\$ _____

Se o Sr.(a) é ex-fumante há quantos tempo parou de fumar?

Instrução: Aplique o Teste Fagerstrom para fumantes e fumantes esporádicos

Teste de Fagerstrom	
F1- Quantos cigarros você fuma por dia?	De 1 a 10 = 0 ponto De 11 a 20 = 1 ponto De 21 a 30 = 2 pontos Acima de 31 = 3 pontos
F2- Após acordar, quanto tempo você demora até fumar o primeiro cigarro?	Após 1 hora = 0 ponto Entre meia e uma hora = 1 ponto De 6 a 30 minutos = 2 pontos Até 5 minutos = 3

	pontos
F3- Você acha difícil parar de fumar em lugares proibidos como cinemas e ônibus?	Sim = 1 ponto Não = 0 ponto
F4- Qual cigarro do dia lhe traz mais satisfação?	O primeiro que fuma pela manhã = 1 ponto Outros = 0 ponto
F5- Você fuma mais durante a manhã do que no resto do dia?	Sim = 1 ponto Não = 0 ponto
F6- Você fuma mesmo doente?	Sim = 1 ponto Não = 0 ponto
F7- Já tentou parar de fumar?	Sim = 1 ponto Não = 0 ponto
Inala (traga) o fumo?	(1) Sim (2) Não (3) As Vezes

7. CAGE (Aplique para tabagistas, ex-tabagistas, não-tabagistas).

Você costuma beber algum tipo de bebida alcoólica mais que uma vez mês? (0) Sim (1) Não

Instrução: Caso a resposta seja afirmativa (SIM), pergunte ao voluntário as questões abaixo:

C1-Alguma vez o(a) senhor(a) sentiu que deveria diminuir a quantidade de bebida alcoólica ou de parar de beber?	C2-As pessoas o(a) aborrecem porque criticam o seu modo de tomar bebida alcoólica?	C3-A senhor (a) se chateia consigo mesmo(a) pela maneira como costuma tomar bebida alcoólica?	C4-Costuma tomar bebidas alcoólicas pela manhã para diminuir o nervosismo ou ressaca?
(0) Sim (1) Não	(0) Sim (1) Não	(0) Sim (1) Não	(0) Sim (1) Não

8. HISTÓRIA FAMILIAR LONGEVIDADE, ADIÇÃO E DOENÇAS CRÔNICAS NÃO-TRANSMISSÍVEIS.

	Pai	Mãe	Avô Paterno	Avó Paterna	Avô Materno	Avó Materna
Está vivo?	(0) Sim (1) Não	(0) Sim (1) Não	(0) Sim (1) Não	(0) Sim (1) Não	(0) Sim (1) Não	(0) Sim (1) Não
Idade atual						
Idade do óbito (décadas)						

Instrução: Por exemplo, morreu com 63 ou 67 anos, coloque 60 na década, não coloque o ano exato do óbito. Sempre que não souber a informação coloque NS (não sabe) e digite 3 na tabela do Excel.

Instrução: Para responder as questões abaixo, formule a seguinte pergunta geral: **O Sr(a) conhece alguém na sua família que tem história de _____ Quem? Pai, mãe, avô? _____ Não sabe ou não tem?**

Caso exista mais de um grupo familiar afetado, NO MOMENTO DA TRANSPOSIÇÃO DAS INFORMAÇÕES PARA A PLANILHA ELETRÔNICA, EXCEL, coloque o número de cada grupo em ordem seqüencial, sem vírgulas entre os mesmos. Ex. Pai, irmão e avô afetados por hipertensão: 12.

Condição	História Familiar – Observação: <i>coloque os números em seqüência em caso de existirem mais que um grupo familiar afetado. Ex. Tabagismo: pai e avô: 12</i>
Alcoolismo	(0) Não existe ou desconhece (1) Pai, Mãe ou Irmãos (2) Pelo menos um avô (materno ou paterno)
Tabagismo	(0) Não existe ou desconhece (1) Pai, Mãe ou Irmãos (2) Pelo menos um avô (materno ou paterno)
Jogador compulsivo	(0) Não existe ou desconhece (1) Pai, Mãe ou Irmãos (2) Pelo menos um avô (materno ou paterno)
Obesidade	(0) Não existe ou desconhece (1) Pai, Mãe ou Irmãos (2) Pelo menos um avô (materno ou paterno)
Hipertensão	(0) Não existe ou desconhece (1) Pai, Mãe ou Irmãos (2) Pelo menos um avô (materno ou paterno)

Doença cardiovascular	(0) Não existe ou desconhece (1) Pai, Mãe ou Irmãos (2) Pelo menos um avô (materno ou paterno)
Doença neurodegenerativa	(0) Não existe ou desconhece (1) Pai, Mãe ou Irmãos (2) Pelo menos um avô (materno ou paterno)
Câncer	(0) Não existe ou desconhece (1) Pai, Mãe ou Irmãos (2) Pelo menos um avô (materno ou paterno)

Observação: doença cardiovascular (infarto, angina, insuficiência cardíaca, derrame); doença neurodegenerativa (demência como Alzheimer (perda da memória, não lembra), Parkinson, esclerose, ou outra condição.

9. INDICADORES DE DEPRESSÃO, ANSIEDADE, ESTRESSE E MEDO

9.1 Nestes últimos seis meses você sentiu estressado mais do que três vezes na semana **sem nenhum motivo aparente**?

(0) Sim (1) Não

9.2 Nestes últimos seis meses você sentiu triste ou deprimido mais do que três vezes na semana **sem nenhum motivo aparente**? (0) Sim (1) Não

9.3 Nestes últimos seis meses você sentiu ansioso mais do que três vezes na semana **sem nenhum motivo aparente**?

(0) Sim (1) Não

9.4. Você já fez/faz tratamento psicológico ou psiquiátrico? (0) Sim (1) Não

9.5 Enumere no máximo 3 medos ou situações que você evita:

_____,
_____,
_____.

Não lembro de nenhum medo ()

Instrução: Peça ao entrevistado que preencha a tabela da página seguinte marcando com um "X" e o mais rápido possível. Anote o tempo de preenchimento em segundos no espaço abaixo.

Horário de início: _____

Horário de término: _____

10. Escala de Barrat

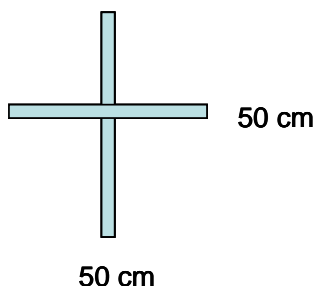
	Raramente , nunca	Às vezes	Freqüente mente	Sempre ou quase sempre
1. Eu planejo minhas atividades com cuidado				
2. Eu faço coisas sem pensar				
3. Eu sou despreocupado, "cuca fresca"				
4. Meus pensamentos são rápidos				
5. Eu planejo minhas saídas ou passeios com antecedência				
6. Eu sou uma pessoa controlada				
7. Eu me concentro com facilidade				
8. Eu tenho facilidade para economizar dinheiro				
9. Eu acho difícil ficar sentado por muito tempo				
10. Eu costumo pensar com cuidado em tudo				

11. Eu quero ter um trabalho fixo para poder pagar minhas despesas				
12. Eu falo as coisas sem pensar				
13. Eu gosto de ficar pensando sobre problemas complicados				
14. Eu troco de trabalho freqüentemente				
15. Eu faço as coisas no impulso				
16. Eu me canso com facilidade tentando resolver problemas mentalmente de cabeça				
17. Eu me cuido pra não ficar doente				
18. Eu faço as coisas no momento em que penso				
19. Eu tento pensar em todas as possibilidades antes de tomar uma decisão				
20. Eu troco de casa com frequência ou não gosto de viver no mesmo lugar por muito tempo				
21. Eu compro coisas impulsivamente sem pensar				
22. Eu termino o que eu começo				
23. Eu caminho e me movimento rápido				
24. Eu resolvo os problemas por tentativa e erro				
25. Eu gasto mais do que ganho ou que posso				
26. Eu falo rápido				
27. Enquanto estou pensando em uma coisa é comum que outras idéias me venham à cabeça ao mesmo tempo				
28. Eu me interesso mais pelo presente do que pelo futuro				
29. Eu me sinto inquieto em aulas e palestras				
30. Eu faço planos para o futuro				

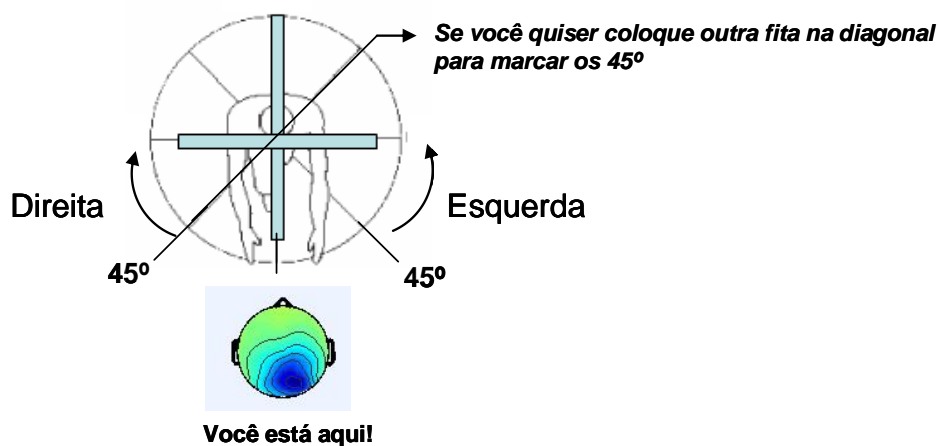
10. INDICADORES DE EQUILÍBRIO

10.1 Teste de Unterberger

- (1) Com uma fita crepe faça uma cruz no chão (~50 cm cada fita)



- (2) Posicione o voluntário bem no meio da cruz e se posicione na frente dele considerando a direita e a esquerda do voluntário.



- (3) Solicite que ele estenda os braços para frente, feche os olhos e marche sem sair do lugar contando 30 passos levantando bem os joelhos. Mostre a ele o que tem que ser feito. O voluntário pode optar em realizar o teste com ou sem calçados. **O voluntário é que conta não o pesquisador!**

- (4) No final dos 30 passos observe se (marque com um X):

- (1) Desviou menos que 45°
 (2) Desviou mais que 45°
 (3) Desviou foi: (1) para direita (2) para a esquerda

Horário do término da aplicação do instrumento: _____

OBSERVAÇÕES

APÊNDICES

APÊNDICE I – Termo de consentimento livre e esclarecido.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Sr. Está sendo convidado a participar de um estudo científico denominado **NUTRIGENÉTICA E TABAGISMO: ESTUDOS IN VIVO E EX VIVO DA DIETA E ATIVIDADE FÍSICA NA MODULAÇÃO DOS EFEITOS PRÓ-OXIDANTES DO FUMO**. O objetivo do estudo quer comparar o estilo de vida e a genética entre indivíduos que fumam, deixaram de fumar e nunca fumaram. Este estudo é muito importante porque o fumo aumenta o risco de doenças como o câncer, o infarto, etc. e muitas vezes, mesmo que a pessoa saiba dos seus malefícios não consegue parar. Estudos anteriores feitos principalmente em outros países têm sugerido que fumar é muito influenciado pela genética (história familiar) do indivíduo. Ou seja, se o indivíduo tem pais, irmãos e avós que fumam ele possui mais chance de ser fumante do que se ele não tiver parentes fumantes. Esta condição faz com que sejam necessários estudos que busquem identificar fatores, que por sua vez podem ajudar a desenvolver tratamentos que possam ser utilizados para auxiliar os tabagistas a deixar o fumo. Sendo assim, a justificativa do estudo aqui proposto é que o mesmo irá incluir muitas pessoas (aproximadamente 2000) e se constituirá em um dos maiores estudos sobre tabagismo do Brasil que tenta verificar o estilo de vida e história familiar e genética associada ao tabagismo.

A sua participação no estudo acontecerá através da coleta de informações feita por um auxiliar da pesquisa que foi capacitado para interagir com o Sr(a). Na pesquisa serão feitas três tipos de coleta de informações: (1) inicialmente o Sr. (a) responderá uma entrevista com perguntas sobre a sua vida e sua saúde; (2) a seguir o auxiliar de pesquisa medirá a circunferência da sua cintura (para tanto pedirá que o Sr. coloque o dedo no umbigo que indica o local onde a medida será feita); (3) tomada a medida da circunferência o auxiliar de pesquisa, com o auxílio de uma lanceta (que é uma pequena agulha) dará uma pequena picada no seu dedo anular e coletará uma gota de sangue em um pequeno tubo de plástico. Para tanto, o auxiliar estará de luva, que será imediatamente descartada após o seu uso, e fará e limpará com álcool a região da picada antes e depois da coleta de sangue. O Sr(a). sentirá uma pequena dor e desconforto por causa da picada e uma pequena ardência quando for limpa a área com álcool. O sangue coletado será utilizado para averiguar um fator genético que está ligado ao combate dos radicais livres no organismo. Os exames feitos serão para ver como está o seu colesterol, glicose e outros marcadores de saúde. Os radicais livres são substâncias que “enferrujam” as nossas células e que precisam ser controlados através de compostos chamados antioxidantes. Existem alguns antioxidantes que o próprio corpo produz como a enzima superóxido dismutase dependente de manganês (SOD2) e existem antioxidantes que nós ingerimos através de dieta rica em frutas e vegetais. Existem estudos que mostram que variação neste gene em pessoas que comem pouca quantidade de frutas e verduras aumenta o risco de doenças. Entretanto, quando elas se alimentam corretamente este risco praticamente não existe. No nosso estudo queremos saber o que acontece quando a pessoa fuma e é portadora destas variações genéticas? Será que a alimentação e uma atividade moderada também diminuem o risco de doenças nos tabagistas que portam estas variações genéticas? É importante salientar que a análise deste gene não significará que o Sr.(a) irá desenvolver qualquer doença. É também importante lhe informar que o seu material genético (DNA) que ficar armazenado no laboratório só será utilizado o estudo de outros genes caso seja feito novo projeto, seja lhe informado e outro Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, semelhante a este seja assinado pelo Sr. O Sr(a). poderá ser convidado, em um segundo momento, para fazer exames adicionais de sangue e da sua condição cardiorrespiratória. No caso dos exames de sangue, será feita coleta através de uma pequena punção no braço o que poderá causar um pequeno desconforto no local. O exame da condição cardiorrespiratória (que avalia a capacidade do seu coração) será feito através de testes que envolvem exercício físico. Neste caso, o Sr.(a) poderá sentir aumento nos batimentos do coração, suar e se sentir um pouco cansado. É importante comentar que os riscos da sua participação no estudo são mínimos ou inexistentes sejam eles físicos ou emocionais. O principal benefício esperado caso o Sr(a). participe do estudo é que o Sr.(a) estará fazendo uma checagem geral da sua saúde e receberá aconselhamento preventivo personalizado. Além disto, saberá que com a sua participação poderá estar ajudando muitas pessoas no futuro que se beneficiarão direta ou indiretamente com os resultados desta pesquisa. Com base nos resultados obtidos, caso seja detectada necessidade de uma consulta médica mais específica, o Sr(a). será orientado a procurar auxílio médico. Durante todo o período do estudo o Sr(a) será acompanhado pelo grupo de pesquisa que ficará a sua disposição para qualquer tipo de esclarecimentos que o Sr.(a) necessite envolvendo informações mais aprofundadas do que está sendo estudado e do modo (metodologia) de como está sendo feito o estudo. O Senhor pode optar em ser ou não informado sobre os resultados de laboratório que forem realizados. Para tanto, após ler este Termo nós iremos lhe questionar sobre este aspecto para anotarmos na sua pasta de dados (formulário). Há qualquer momento o Sr.(a) poderá se recusar a participar da pesquisa ou retirar o seu consentimento de uso das informações coletadas sem que ocorra nenhum tipo de prejuízo ao seu cuidado.

Todas as informações coletadas sejam elas através de entrevista sejam dos resultados laboratoriais serão **confidenciais**. Por este motivo o Sr(a) receberá um número de identificação que impedirá a associação entre as informações e a sua pessoa. **Para participar da pesquisa o Sr.(a) não terá nenhuma despesa financeira.**

Eu, _____, documento de identidade (RG) _____ declaro que concordo em participar do estudo NUTRIGENÉTICA E TABAGISMO: **ESTUDOS IN VIVO E EX VIVO DA DIETA E ATIVIDADE FÍSICA NA MODULAÇÃO DOS EFEITOS PRÓ-OXIDANTES DO FUMO** e que quando fui convidado a participar do mesmo me foi explicado e lido o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do qual me foi fornecida uma cópia. Neste termo me foi explicado que: (1) as informações que forneci serão sigilosas e privadas; (2) que terei alguns desconfortos relacionados com a coleta de sangue e talvez com exames da função do coração; (3) que a qualquer momento poderei questionar ou pedir informações adicionais sobre o estudo; (4) que a qualquer momento poderei me retirar do estudo sem que ocorra nenhum prejuízo de atendimento ou outro a minha pessoa; (5) que não terei nenhuma despesa financeira relacionada com o estudo. (6) que a **pesquisadora responsável, Profa.Dra. Ivana Beatrice Manica da Cruz do Departamento de Morfologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Maria** estará a minha disposição para responder qualquer tipo de questão no endereço: Departamento de Morfologia, Campus Universitário (UFSM). Av. Roraima, 1000 – Prédio 19, Sala 3126, telefone: 55-32208736, email: biogenomica.ufsm@gmail.com

Assinatura do voluntário

Nome por extenso, número de registro e assinatura do Auxiliar da Pesquisa

Assinatura dos Pesquisadores Responsáveis:

- Profa.Dr^a. Ivana Beatrice Manica da Cruz;
- Prof. Dr^a. Maria Izabel Ugalde Marques da Rocha;
- Prof. Dr. Juan Pablo Barrio Lera;
- Prof. Dr. Aron Ferreira da Silveira;

APÊNDICE II – Protocolo de anamnese audiológica.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE MESTRADO EM DISTÚRBIOS DA COMUNICAÇÃO HUMANA

ANAMNESE AUDIOLÓGICA

Nome: _____ Gênero: () M () F
 Data de Nascimento: ___/___/___ Idade: _____ Profissão: _____
 Endereço: _____ Fone : (___) ___ - ___
 Data da Anamnese: ___/___/___ Fone : (___) ___ - ___

Examinadora: Fga. ANDRESSA BOER FRONZA – CRFa 9107-RS

- | | |
|---|---|
| 1. Dificuldade Auditiva?
() SIM () NÃO
() OD () OE | 2. Há quanto tempo?
() Até 6 meses () 6 meses – 1 ano
() 1 ano – 5 anos () 5 anos – 10 anos () Outro |
| 3. Zumbido?
() SIM () NÃO () OD () OE | 4. Plenitude auricular?
() OD () OE |
| 5. Dificuldade para ouvir em ambiente silencioso?
() Não () Às vezes () Sempre | 6. Dificuldade para ouvir em ambiente com ruído?
() Não () Às vezes () Sempre |
| 7. Dificuldade para entender a fala em grupo?
() Não () Às vezes () Sempre | 8. Desconforto a sons intensos?
() Não () Sim |
| 9. Episódios de Otite?
() Não () Sim Quando? _____ | 10. Trauma acústico?
() Não () Sim Quando? _____ |
| 11. Exerce ou exerceu atividade exposto a ruído?
() Não () Sim Qual? _____
() Até 6 meses () 6 meses - 1 ano
() 1 ano - 5 anos () 5 anos - 10 anos () Outro | 12. <i>Walkman</i> ou <i>MP3</i> em alta intensidade?
() Não () Sim Frequência? _____ |
| 14. Antecedentes familiares de perda auditiva?
() Não () Sim | 13. Ambientes com som em alta intensidade?
() Não () Sim Frequência? _____ |
| 16. Há quanto tempo? _____ | 15. É Tabagista?
() Não () Sim |
| 18. Quantidade diária de cigarros:
() zero () 1 a 10 () 10 a 20 () + de 20 | 17. Marca do Cigarro: _____ |
| 20. Está fazendo uso de medicação?
() Não () Sim Qual? _____ | 19. Apresenta algum problema de saúde?
() Não () Sim Qual? _____ |
| | 21. Nível de escolaridade:
() 1º grau inc. () 2º grau inc. () 3º grau inc.
() 1º grau com. () 2º grau com () 3º grau com. |

Observações:

Grupo / indivíduo: _____

ANDRESSA BOER FRONZA
Fonoaudióloga Responsável

Santa Maria, ___ de _____ de 2009.

APÊNDICE III – Protocolo de avaliação audiológica.



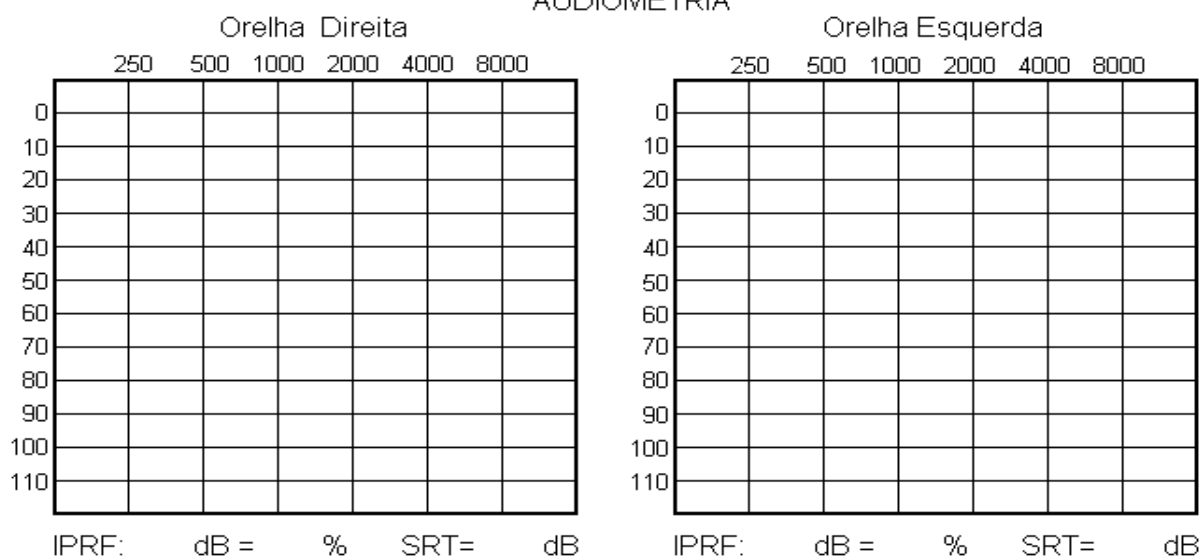
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE MESTRADO EM DISTÚRBIOS DA COMUNICAÇÃO HUMANA**

AVALIAÇÃO AUDIOLÓGICA

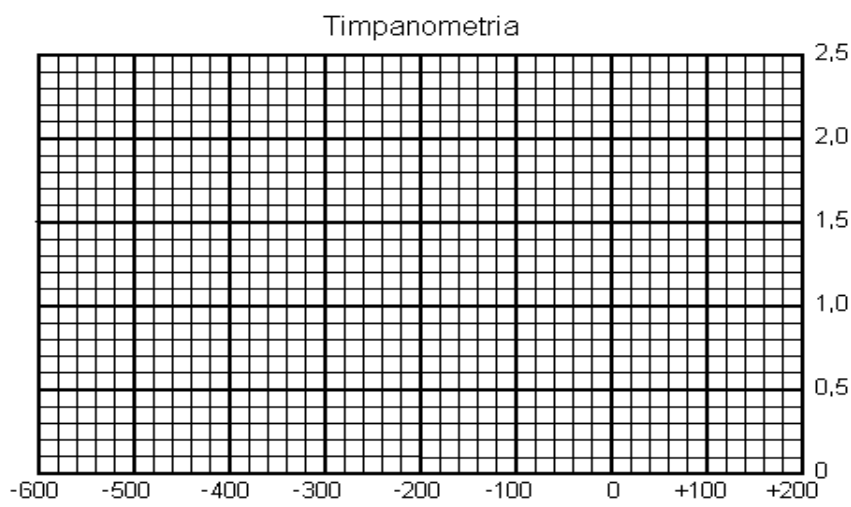
Nome: _____ Gênero: ()M ()F
 Data de Nascimento: ___/___/___ Idade: ___ Profissão: _____
 Endereço: _____ Fone : (___)___-___
 Data da Avaliação: ___/___/___ Fone : (___)___-___

Examinadora: Fga. ANDRESSA BOER FRONZA – CRFa 9107 – RS

AUDIOMETRIA



MEDIDAS DE IMITÂNCIA ACÚSTICA



ACUMETRIA

Freq	Rinne	Weber
500		
1000		

FUNÇÃO TUBÁRIA

Deglutições	Pressão
Início	
1ª deglutição	
2ª deglutição	
3ª deglutição	
4ª deglutição	

Freq	Orelha Direita					Orelha Esquerda				
	Limiar	Contra	Difer	Ipsi	Decay	Limiar	Contra	Difer	Ipsi	Decay
500										
1000										
2000										
3000										
4000										
	(sonda OE)					(sonda OD)				

APÊNDICE IV – Protocolo de avaliação das EOAEPD e supressão das EOAEPD.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE MESTRADO EM DISTÚRBIOS DA COMUNICAÇÃO HUMANA

PROTÓCOLO DE AVALIAÇÃO DAS EOAEPD E DA SUPRESSÃO DAS EOAEPD

Nome: _____ Gênero: () M () F
 Data de Nascimento: ___/___/____ Idade: _____ Profissão: _____
 Endereço: _____ Fone : (____) _____ - _____
 Data da Avaliação: ___/___/____ Fone : (____) _____ - _____

Examinadora: Fga. ANDRESSA BOER FRONZA – CRFa 9107 – RS/P

Emissões Otoacústicas Evocadas Produtos de Distorção (EOAEPD): 73dBNPS; 64s.

OD	Relação S/R - OD	OE	Relação S/R - OE
1500 Hz		1500 Hz	
2000 Hz		2000 Hz	
3000 Hz		3000 Hz	
4000 Hz		4000 Hz	
5000 Hz		5000 Hz	
6000 Hz		6000 Hz	

Efeito supressor das EOAEPD: 73dBNPS; 64s; 60dBNA de ruído contralateral.

OD	Relação S/R - OD	OE	Relação S/R - OE
1500 Hz --		1500 Hz --	
2000 Hz --		2000 Hz --	
3000 Hz --		3000 Hz --	
4000 Hz --		4000 Hz --	
5000 Hz --		5000 Hz --	
6000 Hz --		6000 Hz --	

APÊNDICE V – Protocolo de análise do teste Ensaio Cometa.
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE MESTRADO EM DISTÚRBIOS DA COMUNICAÇÃO HUMANA
ANÁLISE DO TESTE COMETA

Paciente: _____ Identificação: _____
 Data da Avaliação: ____/____/____ Fone : (____)____-_____

Lâmina 1 / Analista 1: _____

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1										
2										
3										
4										
5										

Cálculo do Índice de Dano	
0x	=
1x	=
2x	=
3x	=
4x	=
Somatório	=

Lâmina 1 / Analista 2: _____

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1										
2										
3										
4										
5										

Cálculo do Índice de Dano	
0x	=
1x	=
2x	=
3x	=
4x	=
Somatório	=

Lâmina 2 / Analista 1: _____

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1										
2										
3										
4										
5										

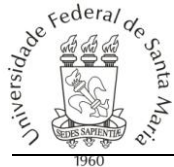
Cálculo do Índice de Dano	
0x	=
1x	=
2x	=
3x	=
4x	=
Somatório	=

Lâmina 2 / Analista 2: _____

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1										
2										
3										
4										
5										

Cálculo do Índice de Dano	
0x	=
1x	=
2x	=
3x	=
4x	=
Somatório	=

APÊNDICE VI – Protocolo de análise do teste dos Micronúcleos.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE MESTRADO EM DISTÚRBIOS DA COMUNICAÇÃO HUMANA
ANÁLISE DO TESTE MICRONÚCLEO

Paciente: _____

Identificação: _____

Data da Avaliação: ____/____/____

Fone : (____)____ - _____

Lâmina 1 / Analista 1: _____

1	
2	
3	
P	

Centos	1	2	3	4	5
	6	7	8	9	10
Resultado	_____				

Lâmina 1 / Analista 2: _____

1	
2	
3	
P	

Centos	1	2	3	4	5
	6	7	8	9	10
Resultado	_____				

Lâmina 2 / Analista 1: _____

1	
2	
3	
P	

Centos	1	2	3	4	5
	6	7	8	9	10
Resultado	_____				

Lâmina 2 / Analista 2: _____

1	
2	
3	
P	

Centos	1	2	3	4	5
	6	7	8	9	10
Resultado	_____				

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)