



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: DIAGNÓSTICO BUCAL

SARAH FREYGANG MENDES PILATI

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE p53, Ki-67, SOX-2, OCT-4 E NANOG
EM LÍNGUA E TRAQUEIA DE CAMUNDONGOS *SWISS*
SUBMETIDOS A FUMAÇA DE NARGUILÉ**

FLORIANÓPOLIS

2021

Sarah Freygang Mendes Pilati

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE p53, Ki-67, SOX-2, OCT-4 e NANOG EM
LÍNGUA E TRAQUEIA DE CAMUNDONGOS *SWISS* SUBMETIDOS A FUMAÇA
DE NARGUILÉ**

Tese submetida ao Programa de Odontologia da
Universidade Federal de Santa Catarina para a
obtenção do título de doutora em Diagnóstico bucal
Orientador: Prof. Dr. Filipe Modolo Siqueira
Co-orientador: Prof. Dr. Filipe Ivan Daniel

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Pilati, Sarah Freygang Mendes

Avaliação da expressão de p53, Ki-67, SOX-2, OCT-4 E
NANOG em língua e traqueia de camundongos swiss submetidos
a fumaça de narguilé / Sarah Freygang Mendes Pilati ;
orientador, Filipe Modolo Siqueira, coorientador, Filipe
Ivan Daniel, 2021.

88 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Odontologia, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Odontologia. 2. Narguilé. 3. Carcinogênese. 4.
Língua. 5. Traqueia. I. Modolo Siqueira, Filipe . II.
Daniel, Filipe Ivan . III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV.
Título.

Sarah Freygang Mendes Pilati

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE p53, Ki-67, SOX-2, OCT-4 e NANOG EM
LÍNGUA E TRAQUEIA DE CAMUNDONGOS SWISS SUBMETIDOS A FUMAÇA
DE NARGUILÉ**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Aline Cristina Batista Rodrigues Johann, Dr(a).
Pontifícia Universidade Católica- PR

Prof.(a) Fabiano Rodrigues Palma, Dr.
Universidade do Vale do Itajaí-SC

Prof. Juliano Andreoli Miyake, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Odontologia.

Prof. Dr.(a) Mariane Cardoso
Coordenador(a) do Programa

Prof. Dr. Filipe Modolo Siqueira
Orientador

Florianópolis, 28 de maio de 2021.

Este trabalho é dedicado aos amores da minha vida: Paulo e Anne

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos queridos alunos Guilherme e Carolina por me instigar a pesquisar sobre narguilé, toparem um projeto-piloto que ninguém acreditou e conseguirem resultados surpreendentes. Graças a vocês me despertaram a vontade de aprofundar no tema e criar essa linha de pesquisa na Univali. A Carol, agradeço em especial, pois além de aluna, virou amiga e colega nessa jornada da pós-graduação.

Aos alunos Morgana, Carina, Laura e Fernando agradeço por darem continuidade ao trabalho, acreditarem nos seus TCCs e investirem 90 dias contínuos e sem folga para cuidar de seus animais.

Agradeço ao Prof David Tames e as técnicas Maria e Claudia, sem a presença desses, esse trabalho não seria possível. Agradeço por todo o ensinamento, técnicas e conhecimento compartilhados.

Agradeço aos alunos bolsistas do LPB e a Gilmara por terem sempre ajudado e socorrido no dia a dia do laboratório bem como nas etapas da pesquisa.

Gostaria de agradecer em especial a duas amigas que a pós-graduação me trouxe: A Profa Alessandra Camargo e a Andressa Paza. Por todas as risadas e desabafos que me ajudaram a lidar com as dificuldades inerentes de um doutorado. A Andressa gostaria de agradecer em especial por ter ficado ao meu lado e pela paciência com as imunos e minhas dúvidas.

Agradeço a todos os professores da pós-graduação que contribuíram para meu crescimento profissional e como docente, também que agregaram conhecimento durante esse doutorado.

Agradeço ao Prof Juliano Miyake pela oportunidade de realizar o estágio de docência na Histologia Bucal-dental ao me fazer lembrar e aprender não apenas conteúdos, mas melhorar a qualidade de aula ao ver seu exemplo.

Agradeço a querida Prof Liliane Grando que me acolheu no HU e me ensinou. Deu exemplo ao atender pacientes e lidar com alunos e profissionais da saúde dentro de um hospital. Também agradeço a essa por toda sua paciência, amizade e companheirismo.

Agradeço ao meu co-orientador Filipe Ivan Daniel que me auxiliou no decorrer do primeiro ano de doutorado e agiu como um grande orientador nesse momento que tanto precisei.

Agradeço especialmente ao meu orientador Prof Filipe Modolo que me aceitou de volta após 6 anos e que concordou em pesquisar o tema de Narguilé e células-tronco neoplásicas. Me ajudou e orientou nessa jornada, desde a melhora na escrita bem como a lidar com as dificuldades inerentes de uma pesquisa laboratorial.

Agradeço a toda a minha família, mas em especial ao Paulo e a Anne. Estes lidaram com minha ausência física no dia a dia, com minhas tristezas e preocupações e o fato de muitas vezes estar em casa e trazer trabalho para as horas de folga. Obrigada por toda a paciência e amor para que eu pudesse alcançar esse objetivo.

A todos, agradeço de coração!

“Não basta ensinar ao homem uma especialidade, porque ele se tornará assim uma máquina utilizável e não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, um senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto.” (Albert Einstein)

RESUMO

O consumo do tabaco por meio do narguilé tem aumentado significativamente, sendo a falta de conhecimento sobre os eventuais efeitos prejudiciais da fumaça produzida por esse dispositivo um dos fatores que contribui para o uso indiscriminado. No entanto, é sabido que as toxinas presentes na fumaça do narguilé são similares às encontradas na fumaça do cigarro. Existe um gap de conhecimento sobre os efeitos, nas vias respiratórias, da exposição às toxinas que compõem a essência utilizada no narguilé, dessa forma o objetivo desse trabalho foi avaliar as alterações histológicas e imunoistoquímicas em língua e traqueia de camundongos *Swiss* expostos a fumaça de narguilé por meio de um estudo observacional. Sessenta animais foram divididos em 6 grupos: controle (sem exposição), 7, 15, 30, 60, 90 dias de exposição diária a fumaça de narguilé através de sistema de corpo-todo. Estes foram posteriormente eutanasiados e os epitélios de língua e traqueia avaliados através de coloração em H&E e imunoistoquímica para avaliação da expressão das proteínas Nanog, OCT-4, Sox-2, Ki-67 e p53. Foram utilizados Testes de normalidade de Shapiro-Wilks, Teste de Kruskal- Wallis, Teste pos-hoc de Bonferroni e considerou-se significantes valores de $p < 0,05$. Em língua, observou-se discretas alterações citológicas e arquiteturais sugestivas de alterações displásicas enquanto em traqueia pôde ser observado perda de epitélio, hiperplasia epitelial e discreta ceratinização que indicam início de metaplasia. Estas alterações aumentaram progressivamente conforme o aumento do tempo de exposição à fumaça do narguilé. Em língua, quando comparado com o controle, NANOG, SOX-2 e p53 revelaram maior expressão após 30 dias do uso de narguilé, Ki-6 e p53 após 90 dias e OCT-4 não revelou diferenças. Em traqueia, quando comparado com o controle, houve menor expressão de NANOG e OCT-4 após 7 dias, maior expressão de Ki-67 após 30 dias, e OCT-4 com menor expressão e p53 com maior expressão após 60 dias. As expressões alteradas das proteínas NANOG, SOX-2, p53 e Ki-67 em língua e NANOG, OCT-4, p53 e Ki-67 em traqueia sugerem um potencial carcinogênico do narguilé em língua e metaplásico em traqueia nos tempos estudados.

Palavras-chave: Narguilé. Carcinogênese. Língua. Traqueia.

ABSTRACT

Tobacco consumption through narghile use has increased and one of the reasons is the lack of knowledge about the harmful effects of the smoke produced by this device. However, it is known toxins present in narghile smoke are similar to those found in cigarette smoke. There is no deep knowledge about the effects of narghile's toxins exposure in the up airways, so we aimed to evaluate the histological and immunohistochemical effects in tongue and trachea of Swiss mice exposed to hookah smoke. Sixty animals were divided into 6 groups: 0 (control), 7, 15, 30, 60, 90 days with daily exposure to hookah smoke. They were subsequently euthanized and evaluated by H&E staining and immunohistochemistry to analyze expression of Nanog, OCT-4, Sox-2, Ki-67, and p53 in epithelial cells from tongue and trachea. The Shapiro-Wilks normality tests, the Kruskal-Wallis test, the Bom-Ferroni post-hoc test were used, and p values <0.05 were considered significant. In tongue, slight cytological and architectural changes suggestive of dysplastic changes were observed. In trachea, onset of metaplasia (loss of epithelium cilia, epithelial hyperplasia and keratinization) could be observed. These changes increased progressively as the time of exposure to narghile smoke increased. In tongue, when compared to the control, NANOG, SOX-2, and p53 showed higher expression after 30 days of hookah use, Ki-6 and p53 showed higher expression after 90 days whereas OCT-4 showed no difference. In trachea, when compared to the control, NANOG and OCT-4 showed lower expression after 7 days, Ki-67 showed higher expression after 30 days, and OCT-4 showed lower expression and p53 higher expression after 60 days. The altered expressions of proteins NANOG, SOX-2, p53 and Ki-67 in tongue and NANOG, OCT-4, p53 and Ki-67 in trachea suggest a narghile's carcinogenic potential in tongue and metaplastic in trachea in the groups studied.

Keywords: Narghile. Carcinogenesis. Tongue. Trachea

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Aparelho de narguilé.....	17
Figura 2- Esquema dos tempos de exposição.....	32
Figura 3- Fotos de língua coradas em HE nos 6 grupos de exposição.....	37
Figura 4- Fotos de língua com expressão de Nanog nos 6 grupos de exposição.....	39
Figura 5- Fotos de língua com expressão de Oct-4 nos 6 grupos de exposição.....	41
Figura 6- Fotos de língua com expressão de SOX-2 nos 6 grupos de exposição.....	43
Figura 7- Fotos de língua com expressão de Ki-67 nos 6 grupos de exposição.....	45
Figura 8- Fotos de língua com expressão de p53 nos 6 grupos de exposição.....	47
Figura 9- Fotos de traqueia coradas em HE nos 6 grupos de exposição.....	49
Figura 10- Fotos de traqueia com expressão de Nanog nos 6 grupos de exposição.....	52
Figura 11- Fotos de traqueia com expressão de Oct-4 nos 6 grupos de exposição.....	54
Figura 12- Fotos de traqueia com expressão de SOX-2 nos 6 grupos de exposição.....	56
Figura 13- Fotos de traqueia com expressão de Ki-67 nos 6 grupos de exposição.....	58
Figura 14- Fotos de traqueia com expressão de p53 nos 6 grupos de exposição.....	60

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Anticorpos	33
-----------------------------	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Diferença em língua entre as medianas de cada grupo de exposição de acordo com a expressão dos anticorpos.....	38
Tabela 2- Diferença em traqueia entre as medianas de cada grupo de exposição de acordo com a expressão dos anticorpos.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HE Hematoxilina e Eosina

CEO Carcinoma epidermóide oral

CEP Carcinoma epidermóide de pulmão

CTN Células-tronco neoplásica

CEUA Comissão de ética na Utilização de animais

mL mililitros

mm milímetros

μL microlitros

EUA Estados Unidos da América

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	OBJETIVOS	16
1.1.1	Objetivo Geral	16
1.1.2	Objetivos Específicos	16
2	REVISÃO	17
2.1	CÉLULAS TRONCO-NEOPLÁSICAS	21
2.1.1	SOX-2	26
2.1.2	OCT-4	24
2.1.3	NANOG	23
2.2	MARCADORES P53 E KI-67.....	27
2.2.1	p53	28
2.2.2	Ki-67	27
3	MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1	ASPECTOS ÉTICOS LEGAIS	30
3.2	LOCAL DA REALIZAÇÃO DO ESTUDO	30
3.3	PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS	30
3.3.1	Procedimentos com animais	30
3.3.2	Procedimentos com as amostras	32
3.4	AVALIAÇÃO DA IMUNOREATIVIDADE	34
3.5	CALIBRAÇÃO DOS EXAMINADORES.....	35
3.6	ANÁLISE DOS DADOS.....	35
4	RESULTADOS	35
4.1	RESULTADOS EM LÍNGUA DE ACORDO COM TEMPO DE EXPOSIÇÃO....	35
4.1.1	Nanog	38
4.1.2	OCT-4	40
4.1.3	SOX-2	42

4.1.4	Ki-67	44
4.1.5	p53	46
4.2	RESULTADOS EM TRAQUEIA DE ACORDO COM TEMPO DE EXPOSIÇÃO 48	
4.2.1	Nanog.....	50
4.2.2	OCT-4.....	53
4.2.3	SOX-2	55
4.2.4	Ki-67	57
4.2.5	p53	59
4.3	CORRELAÇÃO ENTRE MARCADORES EM LÍNGUA.....	61
4.4	CORRELAÇÃO ENTRE MARCADORES EM TRAQUEIA	61
4.5	. CORRELAÇÃO ENTRE MARCADORES EM LÍNGUA E TRAQUEIA.....	62
5	DISCUSSÃO	62
5.1	Língua	62
5.2	Traqueia	65
5.3	Correlação de Língua e Traqueia.....	67
6	CONCLUSÃO	68
	REFERÊNCIAS	70
	ANEXO A – Parecer da Comissão de ética de animais	84

1 INTRODUÇÃO

Juntamente com a difusão da cultura árabe para os países ocidentais ocorreu a disseminação de alguns hábitos dessa população, dentre eles o consumo do tabaco por meio do narguilé (também conhecido como *arguilé*, *shisha*, *narguile*, *goza*, *hubble-bubble*, *hookah* e *waterpipe smoke*). Essa forma de consumo aumentou entre os jovens devido à falta de conhecimento sobre os eventuais efeitos prejudiciais da fumaça produzida por esse dispositivo e também devido a uma percepção comum e errônea entre os usuários de que a água presente no narguilé filtraria as substâncias químicas do fumo, tornando-o menos prejudicial à saúde e menos propenso a causar dependência, quando comparado ao cigarro convencional (ALJARRAH; ABABNEH; AL-DELAIMY, 2009; EL-ZAATARI; CHAMI; ZAATARI, 2015; JACKSON; AVEYARD, 2008; KNISHKOWY; AMITAI, 2005; PRIMACK; FERTMAN; RICE *et al.*, 2010). Entretanto, as toxinas presentes na fumaça do narguilé são similares às encontradas na fumaça do cigarro (ALANAZI; LEE; DOS SANTOS *et al.*, 2017).

Não existe ainda um conhecimento profundo sobre os efeitos da exposição às toxinas que compõem a essência utilizada no narguilé nas vias respiratórias (KNISHKOWY; AMITAI, 2005). Tais compostos tóxicos são ativados quando aquecidos e posteriormente aspirados, entrando em contato com as estruturas de revestimento das vias respiratórias e podendo causar alterações patológicas (SHIHADDEH; SALEH, 2005). É importante ressaltar que, no caso do narguilé, diferentemente do cigarro convencional, o fator calor da fumaça não contribui, pois esta é resfriada pela água presente no dispositivo (KATURJI; DAHER; SHEHEITLI *et al.*, 2010; SHIHADDEH; SALEH, 2005).

Uma das possibilidades de avaliação de possíveis efeitos deletérios do consumo do narguilé é a avaliação histológica das vias aéreas após exposição aos agentes tóxicos. Tal avaliação pode se dar por meio da observação da morfologia tecidual em cortes histológicos, corados em hematoxilina e eosina (HE), das vias aéreas superiores (FLAUSINO; HOFFMEISTER, 2017; HAKIM; HELLOU; GOLDBART *et al.*, 2011; MAGNANI; CATANEO; DOMINGUES *et al.*, 2015; MIRSADRAEE; KHAKZAD; AHMADZADEH *et al.*, 2010a). Outra forma de avaliação frequentemente utilizada é a análise imunoistoquímica da expressão de proteínas potencialmente alteradas pelas toxinas, neste caso específico, proteínas já anteriormente determinadas como participantes dos mecanismos de carcinogênese causada pelo cigarro convencional: Nanog, OCT-4, SOX-2, Ki-67 e p53. (AMAYA; BRYAN, 2015;

BAILLIE; TAN; ITINTEANG, 2017; CAI; HE; LI *et al.*, 2016; GISSI; GABUSI; SERVIDIO *et al.*, 2015). Dessa forma, espera-se que a associação da análise dos aspectos histopatológicos com os marcadores imunoistoquímicos possa ajudar a entender os efeitos do narguilé neste modelo animal.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Identificar os efeitos da fumaça proveniente do uso do narguilé nos tecidos de língua e traqueia em camundongos.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Identificar e descrever as alterações histológicas causadas pela exposição à fumaça do narguilé durante 7, 15, 30, 60 e 90 dias em tecidos da língua e traqueia;
- Comparar o tecido epitelial não exposto (controle) com tecido epitelial exposto à fumaça durante 7, 15, 30, 60 e 90 dias;
- Avaliar o padrão da expressão imunoistoquímica de p53, SOX-2, OCT-4 e Nanog em todos os períodos de exposição, evidenciando a média de células positivas em epitélio de língua e traqueia;
- Analisar o índice proliferativo das células epiteliais de língua e traqueia em todos os períodos de exposição, por meio da marcação imunoistoquímica do antígeno de proliferação celular Ki-67;
- Comparar a expressão de cada uma das proteínas entre os grupos experimentais;
- Estabelecer possíveis correlações entre a expressão das proteínas nos grupos expostos ao narguilé.

2 REVISÃO

O Narguilé é um tipo de fumo que utiliza um aparelho comumente encontrado no oriente que aquece uma mistura de tabaco e essência, criando uma fumaça que passa por um armazenamento de água e, posteriormente, aspirada (AKL; GADDAM; GUNUKULA *et al.*, 2010; COBB; WARD; MAZIAK *et al.*, 2010; JAWAD; MCEWEN; MCNEILL *et al.*, 2013) (Figura.1). Os usuários acreditam que a passagem da fumaça através da água, gerando temperaturas menores do que outros tipos de fumo, diminuiria o risco do seu consumo pois esta filtraria as substâncias tóxicas, entretanto as substâncias tóxicas encontradas na sua fumaça são semelhantes àquelas presentes na fumaça do cigarro convencional (AKL; GADDAM; GUNUKULA *et al.*, 2010; ALANAZI; LEE; DOS SANTOS *et al.*, 2017; ASLAM; SALEEM; GERMAN *et al.*, 2014; AZAB; KHABOUR; ALKARAKI *et al.*, 2010; EL-ZAATARI; CHAMI; ZAATARI, 2015; LIPKUS; MAYS, 2018; SMITH-SIMONE; MAZIAK; WARD *et al.*, 2008).

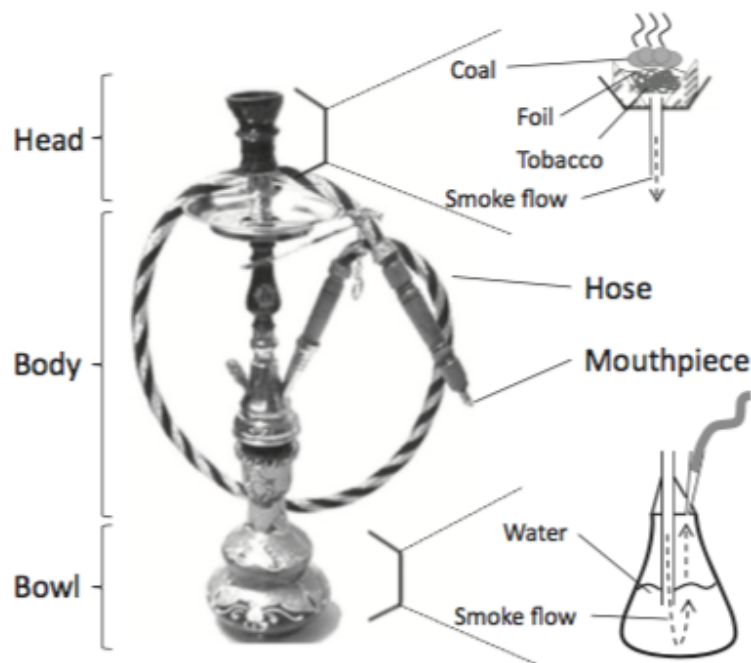


Figura1. Aparelho de narguilé. Fonte: Jawad et al, 2013

Esta forma de consumo de tabaco está se espalhando principalmente entre adolescentes e adultos jovens, com cerca de 2,5 milhões de usuários no Brasil e uma prevalência alta na faixa

etária de 12 a 24 anos de idade (AKL; GADDAM; GUNUKULA *et al.*, 2010; ALANAZI; LEE; DOS SANTOS *et al.*, 2017; ALJARRAH; ABABNEH; AL-DELAIFY, 2009; ASLAM; SALEEM; GERMAN *et al.*, 2014; BERTONI; SZKLO; BONI *et al.*, 2019; COBB; WARD; MAZIAK *et al.*, 2010; JACKSON; AVEYARD, 2008; JAWAD; MCEWEN; MCNEILL *et al.*, 2013; KNISHKOWY; AMITAI, 2005; LIPKUS; MAYS, 2018; MINAKER; SHUH; BURKHALTER *et al.*, 2015; NAKKASH; KHALIL; AFIFI, 2011; PRIMACK; FERTMAN; RICE *et al.*, 2010; PRIMACK; SHENSA; KIM *et al.*, 2013; PRIMACK; WALSH; BRYCE *et al.*, 2009; SMITH-SIMONE; MAZIAK; WARD *et al.*, 2008). Tal perfil de consumidor tem atração por esse tipo de fumo por ser socialmente mais aceito e devido à mistura com sabores variados como frutas, mel e umectantes, mais conhecida como “massel” ou “moassel” (COBB; WARD; MAZIAK *et al.*, 2010; KNISHKOWY; AMITAI, 2005; SMITH-SIMONE; MAZIAK; WARD *et al.*, 2008). Esse tipo de fumo encontra-se em segundo lugar em frequência de uso entre os jovens dos EUA (cerca de 30% dos jovens) (PRIMACK; SHENSA; KIM *et al.*, 2013). Além do “moassel” (mais utilizado), existem outras formas da essência como o “tumbak” ou “ajami” que é composto por uma pasta negra e pura de tabaco e o “jurak” que é originário da Índia e tem um composto com quantidade intermediária de tabaco e frequentemente contém frutas e óleos (KNISHKOWY; AMITAI, 2005).

Atualmente é difícil padronizar estudos envolvendo o consumo do narguilé, pois há muitas variantes no uso, incluindo: quantidade variada de tabaco, tipo de tabaco usado, frequência de sessões, duração de sessões, anos de uso e uso concomitante de outras substâncias. Mesmo estudos realizados com dispositivos automatizados não apresentam uma padronização metodológica evidenciando a necessidade de mais pesquisas acerca do assunto (AKL; GADDAM; GUNUKULA *et al.*, 2010; EISSENBERG; SHIHADDEH, 2009; KATURJI; DAHER; SHEHEITLI *et al.*, 2010). Convém ressaltar que, apesar dessa ausência de padronização, as pesquisas normalmente estão mais associadas ao uso do “moassel” (JAWAD; MCEWEN; MCNEILL *et al.*, 2013).

Estudos anteriores demonstram que o tabaco do narguilé apresenta cerca de 2-4% de nicotina contra 1-3% do cigarro tradicional (SHIHADDEH; SALEH, 2005; VIEGAS, 2008). Além do monóxido de carbono, as seguintes substâncias químicas podem estar presentes na fumaça: alcatrão, metais pesados, arsênio, benzopireno, níquel, cobalto, berílio, cromo, chumbo (SHIHADDEH; SALEH, 2005; VIEGAS, 2008). Em um estudo realizado para dosar a quantidade desses componentes, verificou-se que, uma sessão de narguilé, libera maiores

quantidades de formaldeído, acetaldeído, acroleína, propionaldeído e metacroleína na fumaça principal em comparação com o cigarro convencional (AL RASHIDI; SHIHAEDEH; SALIBA, 2008; SHIHAEDEH; SALEH, 2005). Além disso, apesar da concentração de nicotina ser semelhante ao cigarro, uma sessão de narguilé é longa, durando em média de 45 a 60min e levando à um maior tempo de exposição à essas substâncias (ASLAM; SALEEM; GERMAN; *et al.*, 2014; EISSENERG; SHIHAEDEH, 2009; KNISHKOWY; AMITAI, 2005). Eissenberg e Shihadeh (2009) observaram que uma sessão de narguilé com duração de 45 minutos tem três vezes mais exposição de monóxido de carbono que o uso de um cigarro convencional (medido em máquinas pelo Método Beirute, um método digital programável para determinação da duração da baforada, taxa de fluxo, intervalo entre baforadas e número total de baforadas) e eleva os níveis plasmáticos de nicotina e monóxido de carbono, podendo gerar doenças semelhantes ao uso de um cigarro convencional (EISSENERG; SHIHAEDEH, 2009; SHIHAEDEH; AZAR; ANTONIOS *et al.*, 2004). Finalmente, em estudo realizado com humanos em tempo real com avaliação da fumaça, pôde-se observar duas vezes mais nicotina nas amostras das sessões de narguilé do que no cigarro convencional, totalizando 4mg nas sessões de narguilé, aspiração de 119 litros de fumaça contendo 150mg de monóxido de carbono e 602mg de resíduos da essência (KATURJI; DAHER; SHEHEITLI *et al.*, 2010).

Além disso, o uso de narguilé está associado à iniciação do uso do cigarro convencional (mais conveniente e com maior mobilidade) pelo fato da nicotina levar à dependência química, independentemente da forma de consumo (ALANAZI; LEE; DOS SANTOS *et al.*, 2017; COBB; WARD; MAZIAK; *et al.*, 2010; MAZIAK, 2014; VIEGAS, 2008). Estudos relatam ainda que um terço dos usuários de narguilé apresentam sintomas de dependência e o seu uso diminui os sintomas da abstinência de nicotina (JACKSON; AVEYARD, 2008; NEERGAARD; SINGH; JOB *et al.*, 2007; RASTAM; EISSENERG; IBRAHIM *et al.*, 2011; VIEGAS, 2008).

Diversos estudos demonstraram a presença de agentes tóxicos e carcinogênicos na fumaça do narguilé, associando o seu consumo com a presença de doenças cardiovasculares e pulmonares (câncer, asma, bronquites, entre outras), carcinomas gástricos, esofágicos, de bexiga e de laringe, bem como afetando células epiteliais de traqueia e pulmão (EL-ZAATARI; CHAMI; ZAATARI, 2015; FLAUSINO; HOFFMEISTER, 2017; JAVED; ALHARTHI; BINSHABAIB *et al.*, 2017; MIRSADRAEE; KHAKZAD; AHMADZADEH *et al.*, 2010a;

MOHAMMAD; KAKAH, 2008; STRULOVICI-BAREL; SHAYKHIEV; SALIT *et al.*, 2016; WALTERS; SALIT; JU *et al.*, 2017). Uma revisão sistemática que abordou a associação entre câncer de cabeça e pescoço e uso de narguilé, assim como a associação entre câncer de pulmão e o uso de narguilé, demonstrou alto risco para ambas as neoplasias (MAMTANI; CHEEMA; SHEIKH *et al.*, 2017). Em geral, os tipos de câncer associados ao narguilé são os mesmos associados ao cigarro comum (MAMTANI; CHEEMA; SHEIKH *et al.*, 2017). As alterações respiratórias, p.ex. bronquite, aparecem mais precocemente quando comparado com usuários de cigarro convencional (AL MUTAIRI; SHIHAB-ELDEEN; MOJIMINIYI *et al.*, 2006).

A relação entre o consumo de narguilé e a presença de alterações potencialmente malignizáveis ou malignas nas vias aéreas ainda necessita ser mais bem estudada. O carcinoma epidermoide de pulmão (CEP) tem localização preferencial em áreas periféricas e vias superiores, com destaque para a traqueia (GARTNER; HIATT, 2003). A traqueia, os brônquios do tronco principal e a região mais proximal da via aérea intralobular são revestidos por um epitélio colunar pseudoestratificado ciliado onde todas as células apoiam-se em lâmina basal, mas possuem diferentes tamanhos: células altas colunares e células baixas (que atuam como células basais) (GARTNER; HIATT, 2003). Essas células baixas “basais” servem como células-tronco específicas do tecido para o compartimento traqueobrônquico, e alterações nestas ou em suas “células-filhas” podem estar associadas a hiperplasias, hipoplasias, metaplasia, displasias e também ao CEP (FERONE; SONG; SUTHERLAND *et al.*, 2016; ROCK; RANDELL; HOGAN, 2010). Neste contexto, sabe-se que o fumo desencadeia uma resposta proliferativa no epitélio pulmonar, resultando em alterações epiteliais progressivas variando de metaplasia escamosa a displasia (KIM; VAN DE LAAR; CABANERO *et al.*, 2016).

A traqueia dos roedores é muito semelhante às vias aéreas do humano. A partir disso, os estudos básicos da biologia das células-tronco que são relevantes para o epitélio pseudoestratificado das vias aéreas humanas são melhor realizados em traqueia (ROCK; RANDELL; HOGAN, 2010).

A relação entre o consumo de narguilé e a presença de alterações potencialmente malignizáveis da cavidade oral, como leucoplasias, ainda necessita ser melhor estudada, considerando-se a presença dos agentes tóxicos na fumaça do narguilé e as alterações causadas em outros órgãos e tecidos (AKRAM; AL-KHERAIF; KELLESARIAN *et al.*, 2018; AL RASHIDI; SHIHADDEH; SALIBA, 2008; EL-ZAATARI; CHAMI; ZAATARI, 2015;

FLAUSINO; HOFFMEISTER, 2017; MIRSADRAEE; KHAKZAD; AHMADZADEH *et al.*, 2010b; MOHAMMAD; KAKAH, 2008; STRULOVICI-BAREL; SHAYKHIEV; SALIT *et al.*, 2016; WALTERS; SALIT; JU *et al.*, 2017). Nesse contexto, sabe-se que o narguilé apresenta efeito citotóxico dose-dependente em células da mucosa oral levando à quantidade significativa de picnose, cariorrexe e cariólise, além de alterações do micronúcleo (pequena estrutura intranuclear de DNA) quando comparado com a mucosa não-exposta ao narguilé (EL-SETOUHY; LOFFREDO; RADWAN *et al.*, 2008; NADERI; PASHA, 2017).

2.1 CÉLULAS TRONCO-NEOPLÁSICAS

Tem sido proposto que o desenvolvimento e crescimento de diversas neoplasias, incluindo carcinoma epidermoide oral (CEO) e carcinoma epidermoide de pulmão (CEP), estão associados à uma subpopulação de células neoplásicas denominadas células-tronco neoplásicas (CTN) (HE; XIONG; LI *et al.*, 2018; YU; FEATHERSTON; TAN *et al.*, 2016; ZHOU; HUANG; HU, 2011). Diversos autores afirmam que neoplasias podem ser iniciadas e mantidas por CTNs e que cada neoplasia pode conter uma pequena subpopulação dessas células, que tem a habilidade de se auto renovar e se diferenciar em diferentes linhagens (CURTARELLI; GONÇALVES; DOS SANTOS *et al.*, 2018; GE; LIN; XIAO *et al.*, 2010; HE; XIONG *et al.*, 2018; ISLAM; QIAO; SMITH *et al.*, 2015). As CTNs também estão associadas à resistência tumoral contra os tratamentos de quimioterapia e radioterapia, além de maiores taxas de recorrência e metástase (ISLAM; QIAO; SMITH *et al.*, 2015; VERMEULEN; SOUSA E MELO; DICK *et al.*, 2012; WANG; CHIOU; WU, 2013).

A origem das CTNs ainda não foi bem definida. Na atualidade existem três teorias para a presença das CTNs: 1) malignização de células embrionárias normais; 2) desdiferenciação de células neoplásicas maduras; 3) indução de células neoplásicas pluripotentes (ISLAM; QIAO; SMITH *et al.*, 2015). A primeira teoria propõe que as CTNs são o produto da transformação maligna de células-tronco adultas. Smalley e Ashworth (2003) sugeriram, pela primeira vez, que as CTNs podem derivar de células-tronco normais que adquiriram mutações e perderam sua capacidade de auto-regulação da proliferação celular (ISLAM; QIAO; SMITH *et al.*, 2015; SMALLEY; ASHWORTH, 2003). A segunda teoria defende que células neoplásicas adultas podem se desdiferenciar, já que as CTNs e as células epiteliais neoplásicas muitas vezes

parecem ter um fenótipo mesenquimal semelhante e exibem expressão gênica característica de transição epitélio-mesenquimal (ISLAM; QIAO; SMITH *et al.*, 2015; MOHARIL; DIVE; KHANDEKAR *et al.*, 2017). A última teoria está relacionada ao recente desenvolvimento de células-tronco pluripotentes *in vitro* induzindo a expressão de genes específicos, causando reprogramação direta de células somáticas através da transdução de fatores transcricionais (ISLAM; QIAO; SMITH *et al.*, 2015). Nenhuma dessas teorias é definitiva, no entanto, nas neoplasias diferentes tipos de células podem agir de diferentes formas em seus microambientes específicos (ISLAM; QIAO; SMITH *et al.*, 2015; WANG; CHIOU; WU, 2013). A quantidade das CTNs também é debatida, podendo variar entre pacientes, tipo de neoplasia e estágio da mesma (ISLAM; QIAO; SMITH *et al.*, 2015).

Diversos estudos demonstraram a presença das CTNs através de marcadores de células-tronco embrionárias como SOX-2, Nanog e OCT-4 e a presença das CTNs está associada com pior prognóstico e maior capacidade de crescimento tumoral em neoplasias de mama, bexiga, pulmão e cabeça e pescoço (CURTARELLI; GONÇALVES; DOS SANTOS *et al.*, 2018; GE; LIN; XIAO *et al.*, 2010; LI; WANG; XU *et al.*, 2012; LIU; LIN; ZHAO *et al.*, 2013; YU; FEATHERSTON; TAN *et al.*, 2016). Os marcadores de CTNs tem sido associados ao início da carcinogênese e a resistência tumoral ao tratamento (LU; FUTTNER; ROCK *et al.*, 2010; YU; FEATHERSTON; TAN *et al.*, 2016; ZHOU; HUANG; HU, 2011) e estão mais presentes no frente de invasão tumoral, o que explicaria sua associação com neoplasias mais agressivas e piores prognósticos (CURTARELLI; GONÇALVES; DOS SANTOS *et al.*, 2018).

SOX-2, Nanog e OCT-4 atuam em conjunto, sendo que o OCT4 trabalha sinergicamente com SOX2, entre outros fatores, para regular a transcrição de genes associados a auto-renovação e pluripotência de células-tronco. A SOX-2, bem como a OCT-4 e Nanog, são essenciais para o desenvolvimento, ajudam a regular a transcrição de outros genes essenciais para o desenvolvimento e influenciam sua própria transcrição por meio de ciclos de feedback positivo e negativo (LOH; WU; CHEW *et al.*, 2006; RIZZINO, 2009; 2013).

SOX-2, OCT4 e Nanog são ativadores de genes envolvidos na pluripotência. É sabido que existe a necessidade de regulação positiva do OCT-4 e SOX-2 para a expressão de Nanog, sendo que Nanog e OCT4 trabalham em conjunto para dar suporte à pluripotência celular e auto renovação. SOX2 e OCT4 interagem diretamente para ativar a transcrição do gene alvo e OCT4/SOX2 ligam-se à região promotora proximal de Nanog para induzir a transcrição de diversos genes envolvidos formando uma ampla via de expressão associada a pluripotência e

renovação celular (KAUFHOLD; GARBÁN; BONAVIDA, 2016; LOH; WU; CHEW *et al.*, 2006; RODDA; CHEW; LIM *et al.*, 2005; WANG; CHIOU; WU, 2013).

O epitélio de revestimento da mucosa oral consiste em várias camadas de células epiteliais e possui capacidade de auto-renovação. Existem duas hipóteses para presença de CTNs em lesões da cavidade oral. A primeira afirma que estas poderiam ser originadas de células-tronco adultas derivadas da camada basal local ou progenitoras, que acumulariam alterações genéticas com o tempo. A segunda teoria proposta sugere a origem das CTNs a partir de células não-epiteliais na mucosa oral como: células derivadas da parede do vaso, células-tronco derivadas do sangue, músculos, e tecido adiposo ou devido à fusão celular entre uma célula-tronco hematopoiética e um ceratinócito oral mutado ou também se originar da desdiferenciação de células adultas diferenciadas (MOHARIL; DIVE; KHANDEKAR *et al.*, 2017; REN; ZHANG; JI, 2016).

2.1.1 NANOG

O gene Nanog (nome derivado de Tir nan Óg, mítica terra celta da juventude) está localizado no cromossomo 12p13.31 (GAWLIK-RZEMIENIEWSKA; BEDNAREK, 2016; KAUFHOLD; GARBÁN; BONAVIDA, 2016). Este é um fator de transcrição de domínio *homeobox* que regula a pluripotencialidade das células-tronco e a reprogramação celular (CHANG; PARK; CHOI *et al.*, 2017; YU; FEATHERSTON; TAN *et al.*, 2016). Nanog é crítico para bloquear a diferenciação de células pluripotentes e estabilizar a pluripotência durante o ciclo celular (SAUNDERS; FAIOLA; WANG, 2013). Diversos autores relatam que Nanog pode estar associada a vários aspectos do desenvolvimento das neoplasias, como proliferação celular, auto-renovação, motilidade, transição epitelial-mesenquimal, evasão imunológica e resistência aos medicamentos (CHIOU; WANG; CHOU *et al.*, 2010; CHIOU; YU; HUANG *et al.*, 2008; WANG; CHIOU; WU, 2013).

Em epitélio normal da mucosa oral, a expressão de Nanog ocorre em núcleo e citoplasma do terço médio e inferior, enquanto em displasias epiteliais a expressão aumenta de acordo com a gravidade da doença, sendo considerado um marcador inicial da progressão da carcinogênese (KITAHARA; MICHELS; LUIZ *et al.*, 2021; SCOTTI; MITT; VIEIRA *et al.*, 2018). Também, a presença de Nanog associada ao OCT-4 e SOX-2 foi estudada em

carcinomas epidermoide de lábio e em CEO mostrando que a expressão desses estava associada a marcadores de estádios iniciais e a carcinogênese (FU; HSIEH; CHENG *et al.*, 2016; RAM; BRASCH; DUNNE *et al.*, 2017; SCOTTI; MITT; VIEIRA *et al.*, 2018). Observou-se também que a superexpressão de Nanog estava associada a um pior prognóstico e presença de metástases em linfonodos em CEO (LEE; KANG; LEE *et al.*, 2015; RODRIGUES; XAVIER; ANDRADE *et al.*, 2018). Os níveis da proteína Nanog foram relatados como elevados nos tecidos tumorais de CEO em comparação com os tecidos normais correspondentes (KAUFHOLD; GARBÁN; BONAVIDA, 2016).

Em tecido normal de vias aéreas não ocorre marcação de Nanog, porém em tecidos com metaplasia escamosa e células neoplásicas de pulmão ocorre expressão citoplasmática (DU; MA; WANG *et al.*, 2013; LI; YU; WANG *et al.*, 2013). Além disso, a expressão nuclear de Nanog foi mais observada em neoplasias de pulmão pouco diferenciadas em comparação com outras neoplasias (DU; MA; WANG *et al.*, 2013). No CEO e no adenocarcinoma de pulmão, a superexpressão do Nanog e OCT-4 foi associada a estágio avançado do câncer e pequena taxa de sobrevivência do paciente (CHIOU; WANG; CHOU *et al.*, 2010; CHIOU; YU; HUANG *et al.*, 2008; WANG; CHIOU; WU, 2013). Foi observado por Luo *et al.* 2013, que Nanog, bem como SOX-2 e OCT-4, estavam superexpressos em carcinoma nasofaríngeo quando comparados com tecido epitelial normal (LUO; LI; PENG *et al.*, 2013). A superexpressão de Nanog estava associado a um pior prognóstico, comportamento mais agressivo e frente de invasão no CEP (CHENG; WANG; YUAN *et al.*, 2018; LUO; LI; PENG *et al.*, 2013; ZHAO; LIU; CHEN *et al.*, 2018).

2.1.2 OCT-4

O OCT-4 (do inglês: octamer binding transcription factor 4) é um fator de transcrição associado ao gene POU5F1 que está localizado no cromossomo 6p21.33, fazendo parte da família de transcrição POU, normalmente encontrado em células-tronco embrionárias e adultas e está associado a auto-renovação celular, proliferação e pluripotência celular, trabalhando sinergicamente com a SOX-2 (CHEN; WANG; CAI *et al.*, 2012; KAUFHOLD; GARBÁN; BONAVIDA, 2016; VAN SCHAIJK; DAVIS; WICKREMESEKERA *et al.*, 2018; YU; FEATHERSTON; TAN *et al.*, 2016).

O estudo de Qiao *et al.* (2014) analisou a presença de SOX-2 e OCT-4 em mucosa normal de cavidade oral, lesões pré-malignas, no CEO e tecidos próximos a ele. Nesses, foi observado que em mucosa normal, a SOX-2 e o OCT-4 poderiam ser expressas em núcleo celular da camada basal de epitélio, porém não na mesma região do corte. Já nos grupos de displasia epitelial e CEO, as duas proteínas poderiam estar superexpressas e em mesma região (QIAO; HE; CAI *et al.*, 2014). Cai *et al.* (2016) também demonstraram que a carcinogênese oral pode derivar da expressão sinérgica de SOX-2 e OCT-4. Em animais *knockdown* para OCT-4, as neoplasias não podiam ser iniciadas, enquanto que em animais *knockdown* para SOX-2 as células neoplásicas não conseguiriam realizar auto-renovação para manter o crescimento tumoral (CAI; HE; LI *et al.*, 2016). Em cultura de células demonstrou-se também que a OCT-4 está associada a transição epitélio-mesenquimal e desdiferenciação de células epiteliais aderentes em células individuais migratórias (TSAI; HU; LEE *et al.*, 2014). Demonstrou-se que, no CEO, a superexpressão de OCT-4 estava associada a maior invasão e formação de ilhas tumorais bem como positivamente correlacionada com estadiamento avançado e CEOs moderadamente diferenciados a indiferenciados (CHIOU; YU; HUANG *et al.*, 2008; HABU; IMANISHI; KAMEYAMA *et al.*, 2015; TSAI; HU; LEE *et al.*, 2014).

Estudos relatam que o OCT-4 não foi encontrado em mucosa de esôfago normal, no entanto foi encontrado em carcinoma epidermoide de esôfago (YU; FEATHERSTON; TAN *et al.*, 2016; ZHOU; HUANG; HU, 2011). Ge *et al.* (2010) citam a associação do OCT-4 com metástases em linfonodos de carcinomas epidermoide de hipofaringe (GE; LIN; XIAO *et al.*, 2010). Também foi observado, em um subgrupo desse estudo, que a expressão de OCT-4 e a presença de SOX-2 tinham relação com um pior prognóstico demonstrando assim a necessidade de estudar esses marcadores em conjunto (GE; LIN; XIAO *et al.*, 2010).

Em estudo em pulmão, tecidos normais de vias aéreas e lesões precursoras não expressaram a OCT-4 ou apresentaram expressão somente perivascular ou peribronquial, enquanto em neoplasias a expressão aumentada de OCT-4 foi relacionada à baixa diferenciação tumoral e estadiamento maior, com pior prognóstico (GALIGER; KOSTIN; GOLEC *et al.*, 2014; LI; YU; WANG *et al.*, 2013; LI; WANG; XU *et al.*, 2012). Observou-se que OCT-4 pode manter células neoplásicas em um estado pouco diferenciado através de um mecanismo que depende da promoção da proliferação celular (CHEN; WANG; CAI *et al.*, 2012).

2.1.3 SOX-2

A SOX-2 (do inglês: sex determining region Y-box 2) é um membro da família SOXB1 de fatores de transcrição e seus três domínios primários são um domínio N-terminal, um grupo de alta mobilidade (HMG) e um domínio de transativação (KAUFHOLD; GARBÁN; BONAVIDA, 2016). A SOX-2 está associada às propriedades de auto renovação das células tronco pluripotentes e está localizada no cromossomo 3q26.3- q27 (KAUFHOLD; GARBÁN; BONAVIDA, 2016; KIM; VAN DE LAAR; CABANERO *et al.*, 2016; LIU; LIN; ZHAO *et al.*, 2013; QUE; LUO; SCHWARTZ *et al.*, 2009; YU; FEATHERSTON; TAN *et al.*, 2016).

A expressão de SOX-2 pode ser observada em núcleos da camada basal da mucosa oral e sua expressão média está aumentada em displasias epiteliais tanto de baixo quanto de alto risco (LUIZ; MODOLO; MOZZER *et al.*, 2018; QIAO; HE; CAI *et al.*, 2014). A superexpressão da SOX-2 em neoplasias de cabeça e pescoço está associada à resistência tumoral, recorrência e pior prognóstico (KAUFHOLD; GARBÁN; BONAVIDA, 2016). Em carcinoma epidermoide de língua, quando a SOX-2 está superexpressa, observa-se associação com pior prognóstico e metástase em linfonodos (REN; ZHANG; JI, 2016).

Quando a SOX-2 foi avaliada relacionada à inflamação e cicatrização em vias aéreas, ela foi expressa em traqueia nos dias iniciais (7 dias) e diminuiu conforme a cicatrização ocorreu (14 e 28 dias), estando, portanto, associada à proliferação e diferenciação do epitélio da traqueia adulta, porém sem expressão em tecido normal (GRENDDEL; SOKOLSKÝ; VAŠČÁKOVÁ; *et al.*, 2012; LI; WANG; XU *et al.*, 2012; QUE; LUO; SCHWARTZ *et al.*, 2009). Também se observou que a SOX-2 sozinha pode estar associada ao processo de metaplasia do epitélio respiratório, pois leva à estimulação da expressão de alguns marcadores tumorais epiteliais, porém estímulos oncogênicos adicionais são necessários para conduzir a uma diferenciação escamosa completa (KARACHALIOU; ROSELL; VITERI, 2013; KIM; VAN DE LAAR; CABANERO *et al.*, 2016). No entanto, em estudo *in vitro* com cultura de células, a desregulação da SOX-2 levou ao desenvolvimento de displasias epiteliais em células brônquicas (CORREIA; JOHNSON; MCERLEAN; BAUER *et al.*, 2017).

Acredita-se que a ativação da SOX-2 seja essencial para a manutenção das células epidermoides malignas (KARACHALIOU; ROSELL; VITERI, 2013). Estudos demonstraram a presença desse marcador em células baixas “basais” epiteliais traqueobronquiais e associaram-no à diferenciação celular, hiperplasia epitelial e proliferação, sendo um marcador

importante do CEP (FERONE; SONG; SUTHERLAND *et al.*, 2016; LIU; LIN; ZHAO *et al.*, 2013; QUE; LUO; SCHWARTZ 2009; TOMPKINS; BESNARD; LANGE *et al.*, 2011). Estudos moleculares levaram à tratamentos específicos para outros tipos de tumores de pulmão, no entanto ainda é necessário mais estudos para tratamentos específicos do CEP (FERONE; SONG; SUTHERLAND *et al.*, 2016). Apesar da SOX-2 ser superexpressa no CEP, o mesmo não ocorre no adenocarcinoma de pulmão, o que pode indicar que os dois se desenvolvem por mecanismos e vias diferentes, variando a expressão de SOX-2 e sua correlação com o prognóstico, dependendo do tipo de neoplasia pulmonar (KARACHALIOU; ROSELL; VITERI, 2013; LU; FUTTNER; ROCK *et al.*, 2010; SODJA; RIJAVEC; KOREN *et al.*, 2016; YUAN; KADARA; BEHRENS *et al.*, 2010).

2.2 MARCADORES CLÁSSICOS DA CARCINOGENESE ORAL

Diversas proteínas e marcadores já foram estudados em associação às neoplasias malignas orais, sendo dois dos mais estabelecidos, as proteínas Ki-67 e p53.

2.2.1 Ki-67

O gene Ki-67 codifica duas isoformas de proteínas com pesos moleculares de 345 e 395 kDa localizada no cromossomo 10q25-ter (LI; JIANG; CHEN *et al.*, 2015). O marcador Ki-67 é uma proteína complexa encontrada no núcleo celular e associada à proliferação celular, podendo ser usado como indicador de prognóstico (FOLESCU; LEVAI; GRIGORAŞ *et al.*, 2018; LI; JIANG; CHEN *et al.*, 2015). Este marcador é um antígeno nuclear expresso em todos os estágios do ciclo celular com exceção do estágio G0 (FOLESCU; LEVAI; GRIGORAŞ *et al.*, 2018; LI; JIANG; CHEN *et al.*, 2015).

Na mucosa oral normal, o Ki-67 pode ser encontrado em núcleo de células epiteliais principalmente em camada basal, porém quando existem alterações epiteliais displásicas ou a presença do CEO, este se encontra superexpresso e em camadas epiteliais mais altas (BIANCO; SCOTTI; VIEIRA *et al.*, 2015; EMBALÓ; MIGUEL; KONRATH *et al.*, 2021; EMBALÓ; PARIZE; RIVERO, 2018; VALACH; FOLTÁN; VLK *et al.*, 2017). Estudos demonstraram que o aumento da intensidade de marcação e o padrão da mesma podem mudar conforme a gravidade da classificação histológica e esta marcação pode ser indicativa de risco de

transformação maligna em displasias epiteliais (GISSI; GABUSI; SERVIDIO *et al.*, 2015; SUWASINI; CHATTERJEE; PURKAIT *et al.*, 2019). O número de células em que o Ki-67 está expresso, bem como a sua intensidade de marcação, aumentam conforme a gravidade da lesão, de mucosa normal passando por displasia epitelial até o carcinoma epidermoide (TORRES-RENDON; ROY; CRAIG 2009). A alteração de sua expressão, juntamente com a da p53, pode ser indicativo de risco aumentado de carcinogênese (GISSI; GABUSI; SERVIDIO *et al.*, 2015; SUWASINI; CHATTERJEE; PURKAIT *et al.*, 2019).

Em tecido pulmonar e vias aéreas normais não há marcação nuclear importante de Ki-67, porém uma marcação escassa e dispersa em zona supra-basal pode ser encontrada, sendo que estudos demonstraram que quanto maior a expressão de Ki-67 em lesões precursoras e lesões iniciais de pulmão pior seria a sua classificação (CAVARGA; KOCAN; BOOR *et al.*, 2009; FOLESCU; LEVAI; GRIGORAŞ *et al.*, 2018; KITAMURA; KAMEDA; NAKAMURA *et al.*, 1995). Nos CEPs e outras neoplasias do trato respiratório, a proliferação celular é avaliada para estimar a agressividade da neoplasia maligna e também prognóstico do paciente (CAVARGA; KOCAN; BOOR *et al.*, 2009; FOLESCU; LEVAI; GRIGORAŞ *et al.*, 2018). A porcentagem de células Ki-67 positivas é diferente entre os subtipos histológicos de câncer de pulmão, de acordo com o estágio do tumor e o grau de diferenciação (FOLESCU; LEVAI; GRIGORAŞ *et al.*, 2018). No caso de lesões neoplásicas de pulmão, a alta taxa de proliferação (Ki-67 positivo) pode indicar alta taxa de recorrência e prognóstico ruim para esses tumores, sendo o Ki-67 superexpresso tanto nos tumores malignos primários quanto nas metástases (FOLESCU; LEVAI; GRIGORAŞ *et al.*, 2018; HARPOLE; HERNDON; WOLFE *et al.*, 1995).

2.2.2 p53

A proteína p53 é um produto do gene supressor de tumor TP53, pertence a uma família de proteínas análogas, incluindo p63 e p73, que compartilham sequência e estrutura semelhantes e são fatores de transcrição específicos capazes de mediar a apoptose. Esse gene está localizado na posição 17p13.1 S (GHOSH; STEWART; MATLASHEWSKI, 2004; GISSI; GABUSI; SERVIDIO *et al.*, 2015; SABAPATHY; LANE, 2019; SUWASINI; CHATTERJEE; PURKAIT *et al.*, 2019). Seu nome se deve à sua massa molecular: fração de 53 quilodaltons das proteínas celulares (CHEAH; LOOI, 2001). Esta proteína é considerada um supressor

tumoral por induzir a parada do crescimento ou a apoptose dependendo das circunstâncias fisiológicas e do tipo de célula. Também, está envolvida no ciclo celular regulando negativamente a divisão celular, por controlar um conjunto de genes necessários para este processo. Quando o gene TP53 está mutado, além de não efetuar seu papel como supressor tumoral também pode adquirir um novo papel como proteína oncogênica (GHOSH; STEWART; MATLASHEWSKI, 2004; SABAPATHY; LANE, 2019) A detecção de p53 por imunohistoquímica pode ser causada pela estabilização da proteína devido à presença de mutação ou como resultado de mecanismos de promoção que levam ao aumento de p53 no estado estacionário em um mecanismo de resposta do ponto de verificação do ciclo celular (GIROD; KRÄMER; KNÜFERMANN *et al.*, 1994).

Em epitélio de revestimento normal da cavidade bucal, a presença da p53 pode ocorrer confinada ao núcleo das células da camada basal, mas em casos de displasia epitelial pode ser encontrada na camada suprabasal, dependendo da gravidade do dano (SUWASINI; CHATTERJEE; PURKAIT 2019). Diversos estudos demonstraram que quanto mais grave a displasia, mais estratos do epitélio podem expressar a p53 e mais intensa é a marcação (NIKITAKIS; RASSIDAKIS; TASOULAS *et al.*, 2018; SUWASINI; CHATTERJEE; PURKAIT *et al.*, 2019; YANG; DING; FU *et al.*, 2019). A mutação no gene da TP53 e sua perda de função estão associadas ao carcinoma epidermoide, uma neoplasia maligna originada no epitélio de revestimento da pele e mucosas. Em estudo de Amer *et al* (2019), que comparou mucosa de fumantes de narguilé com mucosa de não-fumantes, observou-se expressão de imunohistoquímica da p53 significativamente maior em fumantes (AMER; WAGUIH; EL-ROUBY, 2019). Diversos estudos demonstraram que a sua superexpressão pode ser um importante marcador de lesões potencialmente malignizáveis ou de carcinomas, incluindo o CEO (GISSI; GABUSI; SERVIDIO *et al.*, 2015; LEE; KANG; LEE *et al.*, 2015; NIKITAKIS; RASSIDAKIS; TASOULAS *et al.*, 2018; YANG; DING; FU *et al.*, 2019). Em estudo realizado em fumantes de narguilé, mesmo em epitélio considerado histologicamente normal, pelo menos 16% dos pacientes apresentaram marcação de p53, sendo que essa expressão aumentou para 83,1% e 41,7% dos pacientes fumantes de narguilé, portadores de CEO e displasias epiteliais, respectivamente (ZAID; AZAR-MAALOUF; BARAKAT *et al.*, 2018).

Na avaliação do epitélio respiratório a expressão de p53 não ocorre em tecido normal ou metaplásico sem atipias (MAGNANI; CATANEO; DOMINGUES *et al.*, 2015;

PONTICIELLO; BARRA; GIANI *et al.*, 2000). Em lesões iniciais de epitélio respiratório e posteriormente em CEP, quanto pior sua classificação mais expressa esta proteína se encontra (FOLESCU; LEVAI; GRIGORAŞ *et al.*, 2018; HARPOLE; HERNDON; WOLFE *et al.*, 1995; KITAMURA; KAMEDA; NAKAMURA *et al.*, 1995). A marcação de p53 em núcleos de células da camada basal e suprabasal foi associada ao câncer de vias respiratórias e pode ter valor aditivo para predizer o comportamento biológico de lesões endobrônquicas pré-neoplásicas na população com risco de neoplasias nesta região (BREUER; SNIJDERS; SUTEDJA *et al.*, 2003). No CEP, sabe-se que mutações na p53 são muito comuns e conhecidas por facilitar comportamento biológico agressivo (SAINI; HAKEEM; MUKHERJEE *et al.*, 2019; TENG; CHEN; YANG *et al.*, 2019). Devido à relação dessa proteína com diversas neoplasias, cada vez mais estudos procuram uma forma de padronizar e categorizar a p53 através de escores que possam ser associados a um maior risco e pior prognóstico (GISSI; GABUSI; SERVIDIO *et al.*, 2015; NESKEY; OSMAN; OW *et al.*, 2015).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo é do tipo experimental descritivo.

3.1 ASPECTOS ÉTICOS LEGAIS

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade do Vale do Itajaí (Univali-CEUA) com parecer 063/17 (Anexo A).

3.2 LOCAL DA REALIZAÇÃO DO ESTUDO

A parte experimental dos animais foi realizada no Biotério da Odontologia da Universidade do Vale do Itajaí e os procedimentos laboratoriais com as amostras no Laboratório de Patologia Bucal da Universidade Federal de Santa Catarina.

3.3 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

3.3.1 Procedimentos com animais

O tipo de estudo realizado na pesquisa foi o de sistema de exposição de corpo inteiro (DE OLIVEIRA SEMENZATI; DE SOUZA SALGADO; ROCHA; MICHELIN *et al.*, 2012;

FLAUSINO; HOFFMEISTER, 2017; KHABOUR; ALZOUBI; BANI-AHMAD *et al.*, 2012; SHRAIDEH; NAJJAR, 2011b).

No estudo, camundongos Swiss (n=60), gênero feminino, com 2 meses de idade e cerca de 25g foram alojados em gaiolas convencionais e mantidos num ciclo de luz-escuro de 12 horas e com um período de troca diário de comida e água, sendo a troca de água, comida e maravalha padronizada para todos os grupos. Os animais foram retirados do Biotério Central uma semana antes da realização do experimento para a ambientação no Biotério do Laboratório experimental. Na sequência, foi realizada a divisão dos animais aleatoriamente em seis grupos de dez animais cada: controle, 7, 15, 30, 60 e 90 dias de exposição, (escolhidos por abranger tempos iniciais com respostas inflamatórias rápidas e tempos mais longos permitindo a ação do carcinógeno por um maior tempo e a duração da sessão foi de 30 minutos/dia (SHIHAEH; AZAR; ANTONIOS *et al.*, 2004). O número de animais para cada grupo foi decidido baseando-se em Garcia-Martins *et al.* (2012), que utilizou grupos com 10 animais para experimentos com fumaça de cigarros e avaliação histopatológica (GARCIA MARTINS; MARQUES MADEIRA *et al.*, 2012). Foi realizado cálculo amostral com n =60 com *effect size* de 0,4.

Os animais do grupo experimental foram submetidos ao estudo com exposição de corpo todo (KHABOUR; ALZOUBI; BANI-AHMAD *et al.*, 2012; MINAKER; SHUH; BURKHALTER *et al.*, 2015; MIRSADRAEE; KHAKZAD; AHMADZADEH *et al.*, 2010b; SHRAIDEH; NAJJAR, 2011b) através de confinamento em uma caixa de vidro translúcido vedada medindo 175x170x270mm e ligada ao aparelho de narguilé comum por um dispositivo que realiza a sucção da fumaça e sopra a mesma dentro dessa caixa (FLAUSINO; HOFFMEISTER; PILATI *et al.*, 2020). Os animais foram expostos à fumaça do narguilé convencional da marca Mizo (Al Nakhla Tobacco Company – Free Zone S.A.E®, Shibin El Kom, Egito) com porcentagem 0,5% de tabaco não lavado e ao carvão de pólvora da marca Bamboo Brasil Carvão de Narguilé (Egitape Importação e Exportação LTDA®, São José, Santa Catarina) com dimensão de 2cm x 2cm. A dose de fumaça aplicada aos animais dos grupos testes expostos foi de 35 mL a cada dois segundos enquanto os outros 58 segundos foram de ar puro (NEMMAR; AL HEMEIRI; AL HAMMADI *et al.*, 2015), sendo distribuído no total 210mL para cada camundongo. A taxa de fluxo da bomba foi ajustada manualmente para manter o volume de 530mL (sopro especificado pelo método Beirute), este regime foi escolhido porque ele se aproxima, em média, do sopro humano durante o uso do aparelho de narguilé

(KHABOUR; ALZOUBI; BANI-AHMAD *et al.*, 2012; SHIHADDEH; AZAR; ANTONIOS *et al.*, 2004).

O tempo de exposição dos animais à fumaça foi selecionado a partir de estudos publicados que avaliaram os efeitos cardiorrespiratórios da fumaça do narguilé em seres humanos (BENTUR; HELLOU; GOLDBART *et al.*, 2014; HAKIM; HELLOU; GOLDBART *et al.*, 2011). As exposições foram feitas a cada 5 camundongos por grupo, devido ao tamanho da caixa e fluxo da bomba. A metodologia aplicada nesse estudo está em conformidade com a publicação de (FLAUSINO; HOFFMEISTER; PILATI *et al.*, 2020). A exposição de língua ocorreu devido à deposição dos componentes da fumaça em pelo do animal e posterior auto-limpeza com a língua. Os animais do grupo controle foram expostos somente ao ar, com as mesmas condições dos grupos experimentais mantidos em biotério controlado e eutanasiados somente ao final do experimento com o grupo de 90 dias (Figura 2). A obtenção das amostras ocorreu através de cirurgia para retirada dos órgãos (língua e traqueia) após a eutanásia. A eutanásia dos animais foi feita através de sobredose anestésica composta por 50 μ L de Xilazina (0,23g/mL) e 210 μ L de Quetamina (0,1g/mL) para 10 gramas de peso do animal com garantia de eutanásia após remoção de traqueia ocorrendo parada respiratória.

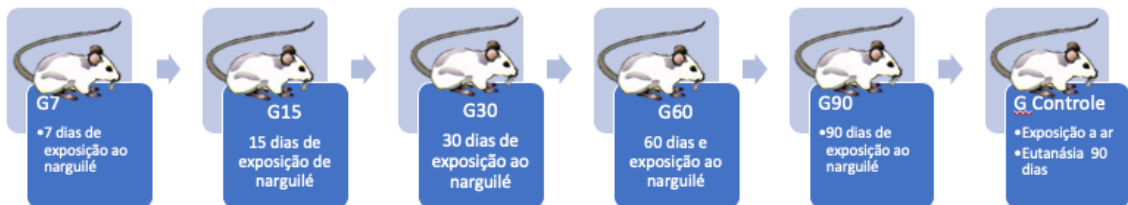


Figura 2. Esquema de exposição dividido por grupos. (Fonte própria)

3.3.2 Procedimentos com as amostras

Os tecidos a serem estudados foram fixados em formaldeído tamponado a 10% e devidamente processados e incluídos em parafina. A confecção das lâminas para estudo ocorreu no Núcleo Integrado de Pesquisa em Odontologia (NIPO) na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os cortes foram corados com HE para posterior análise microscópica para

avaliação da qualidade do material e seleção das áreas bem como avaliação descritiva e morfológica dos cortes.

As amostras foram submetidas à reação de imunistoquímica utilizando o método do polímero conjugado HRP (Horseadish Peroxidase) para avaliação das proteínas associadas as células-tronco SOX-2, Nanog e OCT-4 e verificação de Ki-67 e p53, utilizando-se anticorpos primários específicos para esses antígenos. Foram incluídos controles positivos para todos os anticorpos (Quadro 1). O controle negativo de todas as reações foi realizado pela omissão do anticorpo primário.

Das amostras previamente fixadas em formol e emblocadas em parafina, foram obtidos cortes teciduais de 3 µm de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro tratadas com solução de 3-aminopropyltriethoxylene (Zymed Laboratories, Inc. San Francisco, CA, USA) e levados à estufa a 60°C por 60 minutos.

Em seguida, os cortes sofreram desparafinização em xilol e foram reidratados em uma sequência decrescente de etanol constituída por três passagens de cinco minutos cada, começando pelo etanol absoluto (I, II e III), seguida pelo etanol 95% e etanol 85%. As lâminas foram posteriormente lavadas em água destilada por dez minutos. A peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio a 6% em metanol, por 40 minutos. Segue-se com a lavagem em tampão PBS por cinco minutos e depois a passagem em água destilada por cinco minutos.

Para a recuperação dos sítios antigênicos realizou-se o tratamento dos cortes teciduais com tampão citrato 0,01M pH 6,0 em banho-maria a 96°C por 40 minutos. O bloqueio de ligações inespecíficas ocorreu por meio da incubação com soro fetal bovino (Sigma-USA), à temperatura ambiente, por 40 minutos, seguida de lavagem com água destilada e duas incubações de cinco minutos cada, com PBS.

A seguir os cortes foram incubados com anticorpos primários a 4°C, *overnight*.

Quadro 1 – Anticorpos utilizados, clone, diluição, controle positivo e marca.

Anticorpo	Clone	Diluição	Controle positivo	Marca
Anti-Nanog	Policlonal (TA306915)	1:100	Baço	Origene, EUA
Anti-OCT-4	Policlonal (TA354593)	1:100	Carcinoma epidermóide oral	Origene, EUA
Anti-SOX-2	Policlonal (TA321560)	1:100	Tireoide	Origene, EUA

Anti-Ki-67	Policlonal (SP6)	1:300	Carcinoma epidermóide oral	Biocare Medical, EUA
Anti-p53	Policlonal (SAB4504499)	1:300	Carcinoma epidermóide oral	Sigma, EUA

Após o tempo de incubação do anticorpo primário, os cortes foram submetidos a lavagens em PBS e então incubados com o anticorpo secundário Kit EnVision (DAKO North América Inc., Carpinteria, EUA). A revelação da reação ocorreu com o cromógeno diaminobenzidina (DAB+*Substrate Chromogen System*®, DAKO North América Inc., Carpinteria, EUA). Após lavagem em água corrente por dez minutos, os cortes foram contra corados com Hematoxilina de Harris, pelo tempo de dois minutos e meio e novamente lavados em água corrente para a remoção do excesso do corante. Após desidratação e diafanização, as lâminas foram montadas com Entellan (Merck- Sigma-Aldrich, German).

3.4 AVALIAÇÃO DA IMUNOREATIVIDADE

As lâminas tiveram sua identificação mascarada de forma que a captura das imagens e a análise da imunorreatividade foi realizada por um examinador às cegas quanto ao grupo a que cada lâmina pertence após treinamento prévio com *expertise* na área. Foram capturados campos aleatórios de cada lâmina, em aumento de 400x por meio de microscópio óptico binocular (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Goettingen, Germany) com Platina Motorizada OptiScanTMII XYZ Stage Systems (Prior Scientific Inc., Cambridge, UK) acoplado a um sistema de aquisição de imagem digital (Câmera digital Infinity 1-1 C, Lumenera Scientific, Ottawa, Canada), e a um microcomputador (HP Compaq 6005, São Paulo, Brasil), onde foram armazenadas as imagens e para análise foi utilizado o *Software* ImageJ versão 1.41o (National Institute of Health, Bethesda, EUA) A localização dos campos foi padronizada de maneira que se localizassem de forma equidistante um do outro. Em língua, foi realizada a marcação de 6 pontos equidistantes (dois pontos em dorso, dois pontos em ventre e um ponto em cada bordo de língua) e em traqueia, 4 pontos foram marcados de forma equidistante em torno do lúmen traqueal para posterior fotografia e avaliação histopatológica e imunoistoquímica. A imunopositividade dos anticorpos em cada amostra foi determinada pela presença do cromógeno nos núcleos das células e analisada apenas como porcentagem nuclear positiva de todas as células contadas (BIANCO; SCOTTI; VIEIRA *et al.*, 2015; EMBALÓ; PARIZE; RIVERO, 2018; GE; LIN; XIAO *et al.*, 2010; HABU; IMANISHI; KAMEYAMA *et al.*, 2015; SCOTTI; MITT; VIEIRA *et al.*, 2018). A avaliação da imunorreatividade foi realizada por um examinador previamente

calibrado e os valores foram registrados em uma planilha previamente elaborada no Microsoft Excel® (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, EUA).

Com isso foi determinada a proporção de células positivas/total de células para cada amostra, expressa em porcentagem. Estes valores foram submetidos a uma análise estatística para comparação entre os grupos.

3.5 CALIBRAÇÃO DOS EXAMINADORES

O examinador responsável pela análise imunoistoquímica foi submetido a uma calibração, analisando duas lâminas de cada grupo, totalizando 12 casos, três vezes, com intervalos de uma semana. Os resultados foram comparados para determinação do índice de correlação intra-classe, e observado valor maior que 90% na calibração intraobservador.

3.6 ANÁLISE DOS DADOS

Foi realizado teste de normalidade de Shapiro-Willks para avaliar a distribuição dos dados que, por não apresentarem uma distribuição gaussiana, levou à utilização de Testes não-paramétricos: a comparação da proporção de células positivas foi realizada entre todos os grupos de tempos diferentes por meio dos testes de Kruskal-Wallis e teste *pos-hoc* de BonFerroni. Também foi realizado teste de Correlação de Spearman entre proteínas expressas e entre tecidos diferentes. A apresentação dos dados foi realizada utilizando medianas dos grupos e distância interquartil. Considerou-se significantes valores de $p < 0,05$. Todos os dados coletados foram organizados em planilha eletrônica e posteriormente analisados no *software* SPSS® versão 11 (SPSS Inc., Headquarters, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 RESULTADOS EM LÍNGUA DE ACORDO COM TEMPO DE EXPOSIÇÃO

Na análise das lâminas coradas em HE foi constatado que grupo controle apresentava aspecto de normalidade na superfície dorsal da língua, sendo esta revestida por uma mucosa especializada formada por epitélio pavimentoso estratificado paraqueratinizado apresentando papilas linguais, apoiado sobre uma lâmina própria de tecido conjuntivo denso bem vascularizada que, frequentemente, apresentava discreto infiltrado inflamatório crônico. Abaixo da lâmina própria se encontrava o tecido muscular estriado esquelético com feixes de

fibras dispostos em várias direções. A superfície ventral também se manteve sem alterações, sendo revestida por um epitélio pavimentoso estratificado não-queratinizado de espessura uniforme. Na avaliação histológica dos grupos de 7 e 15 dias de exposição não se observou diferença entre estes e o grupo controle, enquanto no grupo de 30 dias de exposição, houve alteração discreta das características epiteliais, e nos grupos de 60 e 90 dias, houve alterações exuberantes. Foram observadas diversas alterações citológicas e arquiteturais epiteliais como: acantose, hiperchromatismo nuclear em áreas focais, discreta hiperqueratinização, projeções epiteliais em forma de gota direcionadas ao tecido conjuntivo, alteração na polaridade nuclear das células basais e aumento do número de mitoses, além de infiltrado inflamatório crônico na lâmina própria, sugerindo alterações pontuais sugestivas de displasias epiteliais (Fig. 3).

Observou-se que a exposição à fumaça de narguilé resultou em redução de expressão dos marcadores associados a CTNs em geral no grupo de sete dias, aumento gradual no grupo de 15 dias, com pico no grupo de 30 dias de exposição, redução no grupo de sessenta dias e novamente aumento no grupo de 90 dias (Tabela 1).

Tabela 1. Diferença em língua entre os grupos de exposição de acordo com a porcentagem de expressão nuclear positiva dos anticorpos

		CONTROLE	SETE	QUINZE	TRINTA	SESSENTA	NOVENTA	
Língua	Mediana	7,23 ^{ac}	0,78 ^c	31,87 ^{ab}	61,67 ^b	22,04 ^{abc}	41,39 ^{ab}	
	Distância	Nanog	24,42	2,38	44,11	29,27	17,92	
	Interquartil							24,86
	Mediana							13,29 ^{ab}
	Distância	OCT-4	20,17	7,71	18,50	51,08	10,22	22,71
	Interquartil							
	Mediana							
	Distância	SOX-2	2,82	2,59	23,82	26,28	6,31	7,95
	Interquartil							
	Mediana							
	Distância	Ki-67	0,35	0,39	1,28	0,41	0,87	2,51
	Interquartil							
	Mediana							
	Distância	p53	0,47	0,38	2,46	2,10	3,08	2,32
	Interquartil							

Nota: as letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

Testes de Kruskal-Wallis e teste *pos-hoc* de Bom-Ferroni.

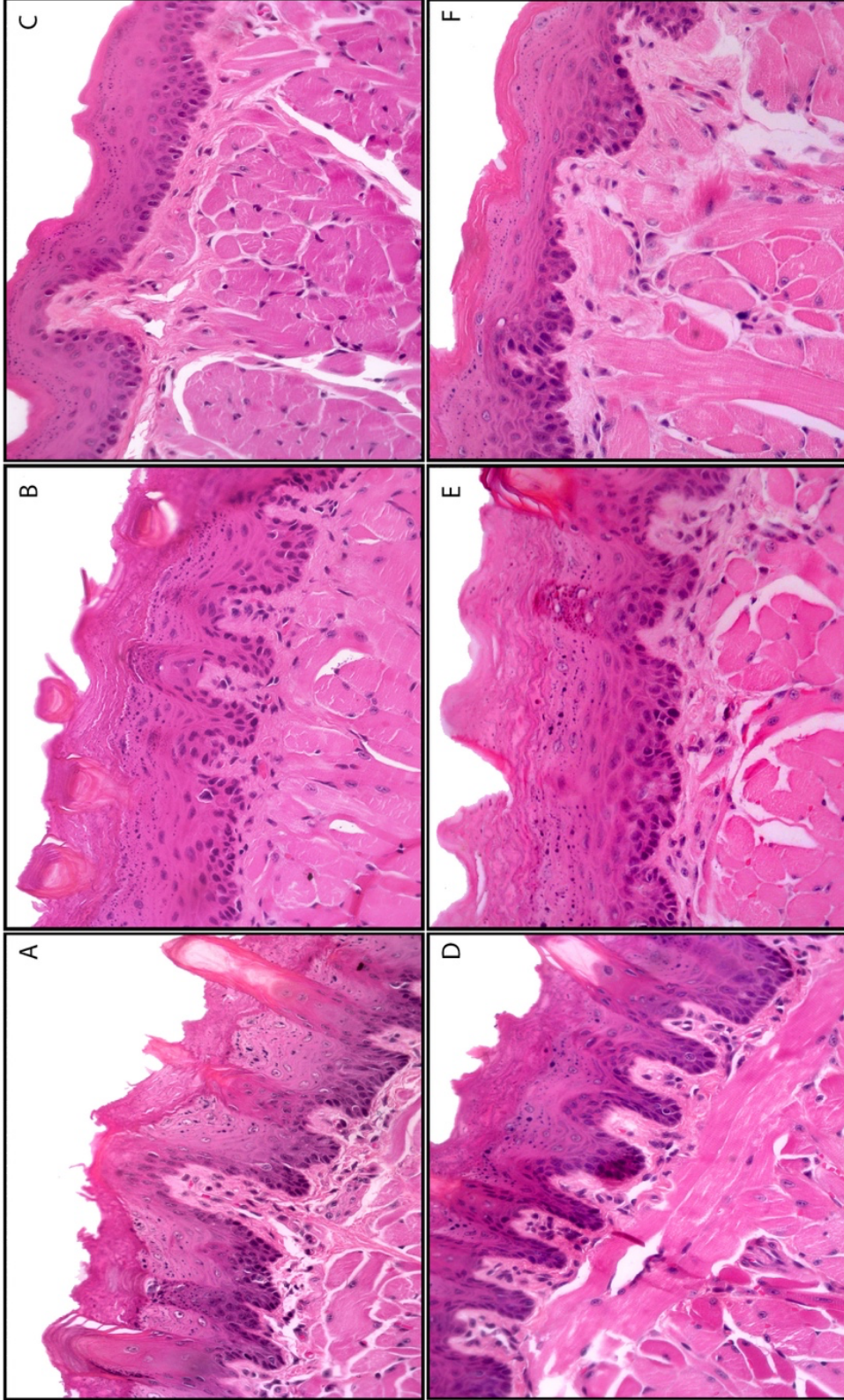


Figura 3. Coloração em HE em língua. A. Grupo controle; B. Grupo de 7 dias de exposição; C. Grupo de 15 dias de exposição; D Grupo de 30 dias de exposição; E. Grupo de 60 dias de exposição; F. Grupo de 90 dias de exposição.

4.1.1 Nanog

Foi observado diferença na distribuição da expressão de Nanog entre os diferentes grupos de tempo exposição ao narguilé. Do grupo controle para o grupo de 7 dias (0,78%) houve um decréscimo da expressão dessa proteína. O grupo de sete dias apresentou diferença estatística quando comparado com o grupo de quinze, trinta e 90 dias ($p=0,003$, $p=0,000$, $p=0,000$ respectivamente) havendo um aumento gradual na expressão a partir dos 15 dias com o pico de expressão ocorrendo aos 30 dias (61,67%). Posteriormente, observou-se uma diminuição da expressão dessa proteína no grupo de 60 dias (22,04%) com posterior aumento no grupo de 90 dias (41,39%) (Tabela 1; Gráfico 1; Figura 3).

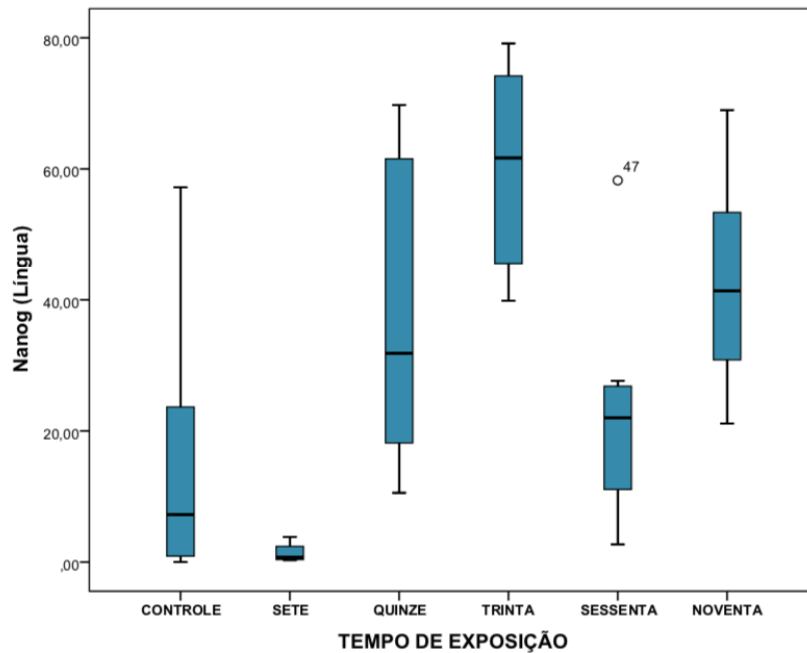


Gráfico 1. Blox-plot de expressão do marcador Nanog de acordo com tempo de exposição.

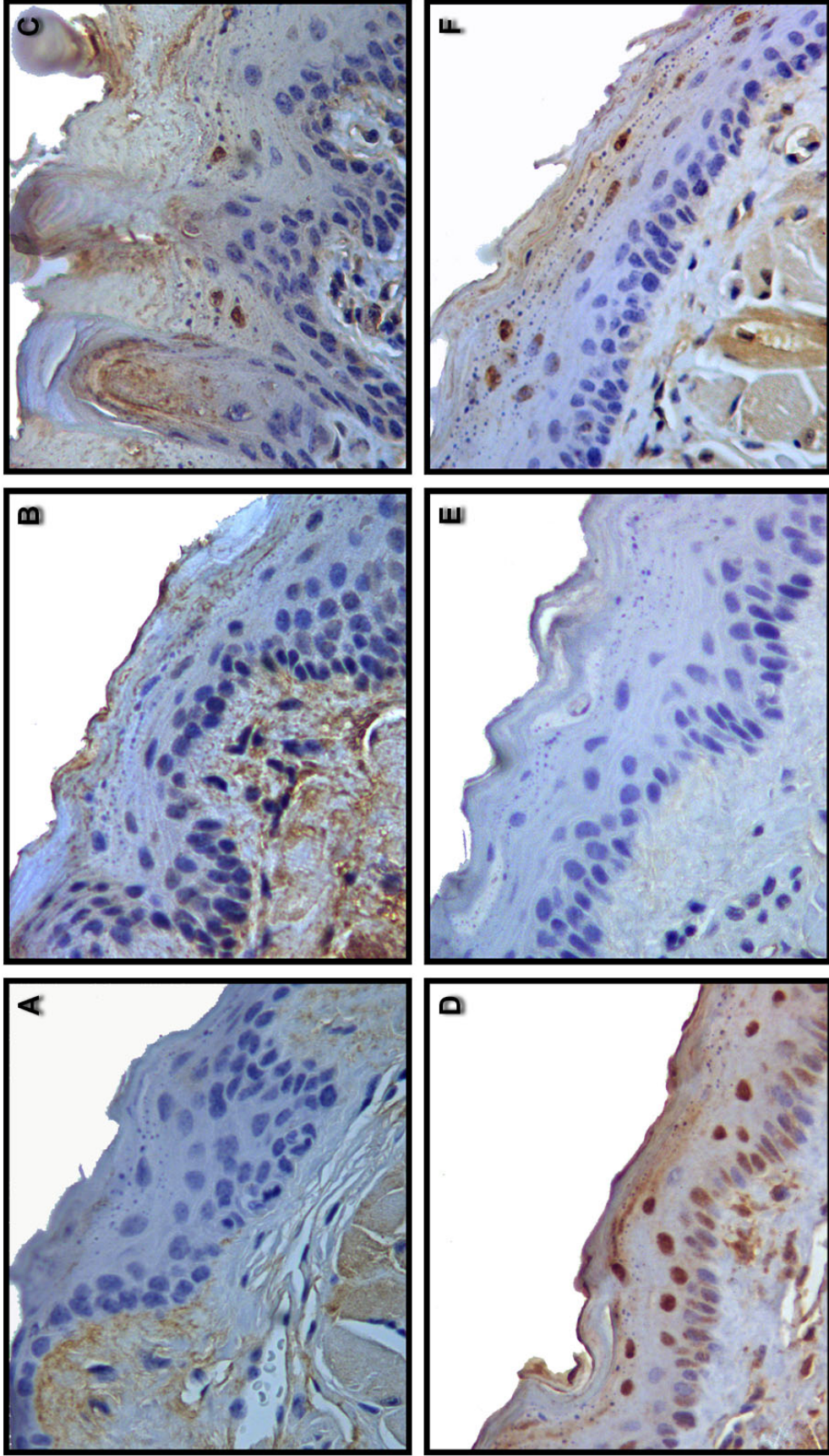


Figura 4. Expressão imunohistoquímica da proteína Nanog em língua exibindo marcação em núcleo. A. Grupo controle; B. Grupo de 7 dias de exposição; C. Grupo de 15 dias de exposição; D. Grupo de 30 dias de exposição; E. Grupo de 60 dias de exposição; F. Grupo de 90 dias de exposição.

4.1.2 OCT-4

A expressão imunohistoquímica de OCT-4 também demonstrou diferença entre grupos. Foi observado um decréscimo da expressão da proteína OCT-4 no grupo de 7 dias (2,43%) e aumento progressivo na expressão nos grupos de 15 e 30 dias (18,59% e 42,19% respectivamente). No grupo de 60 dias (7,14%) houve novamente decréscimo da expressão da proteína com posterior aumento no grupo de 90 dias (40,09%) ocorrendo semelhança com a expressão do Nanog nos diferentes grupos. Pôde ser observada diferença estatística significativa entre grupos de 7 e 30 dias ($p=0,00$) e entre o grupo de 7 e 90 dias ($p=0,002$) não sendo observado diferença estatística entre grupo de 7 e 60 dias. Também foram observada diferença estatística entre os grupos de 30 e 60 dias de exposição ($p=0,006$) e sessenta e noventa dias de exposição ($p=0,002$) (Tabela 1, Gráfico 2, Figura 4).

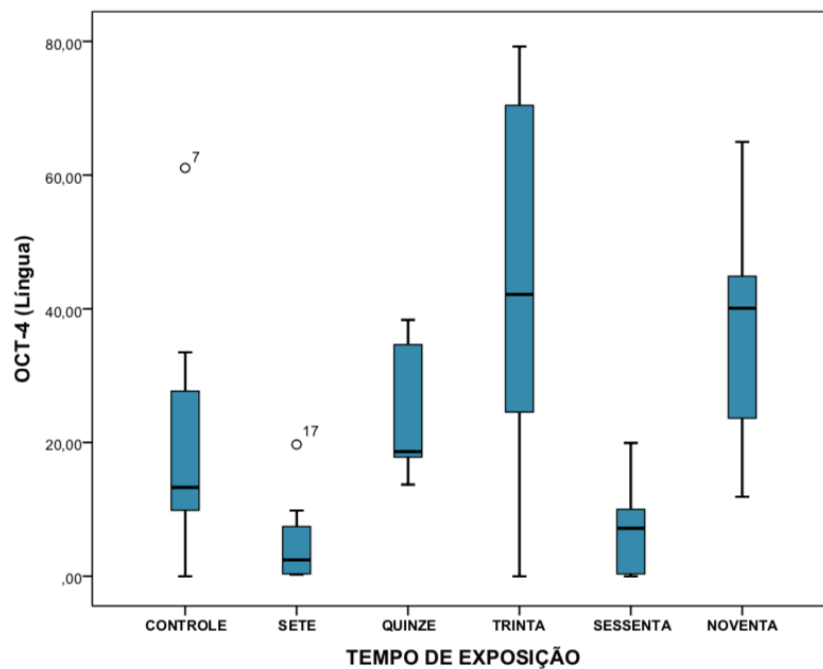


Gráfico 2. Blox-plot de expressão do marcador OCT-4 de acordo com tempo de exposição.

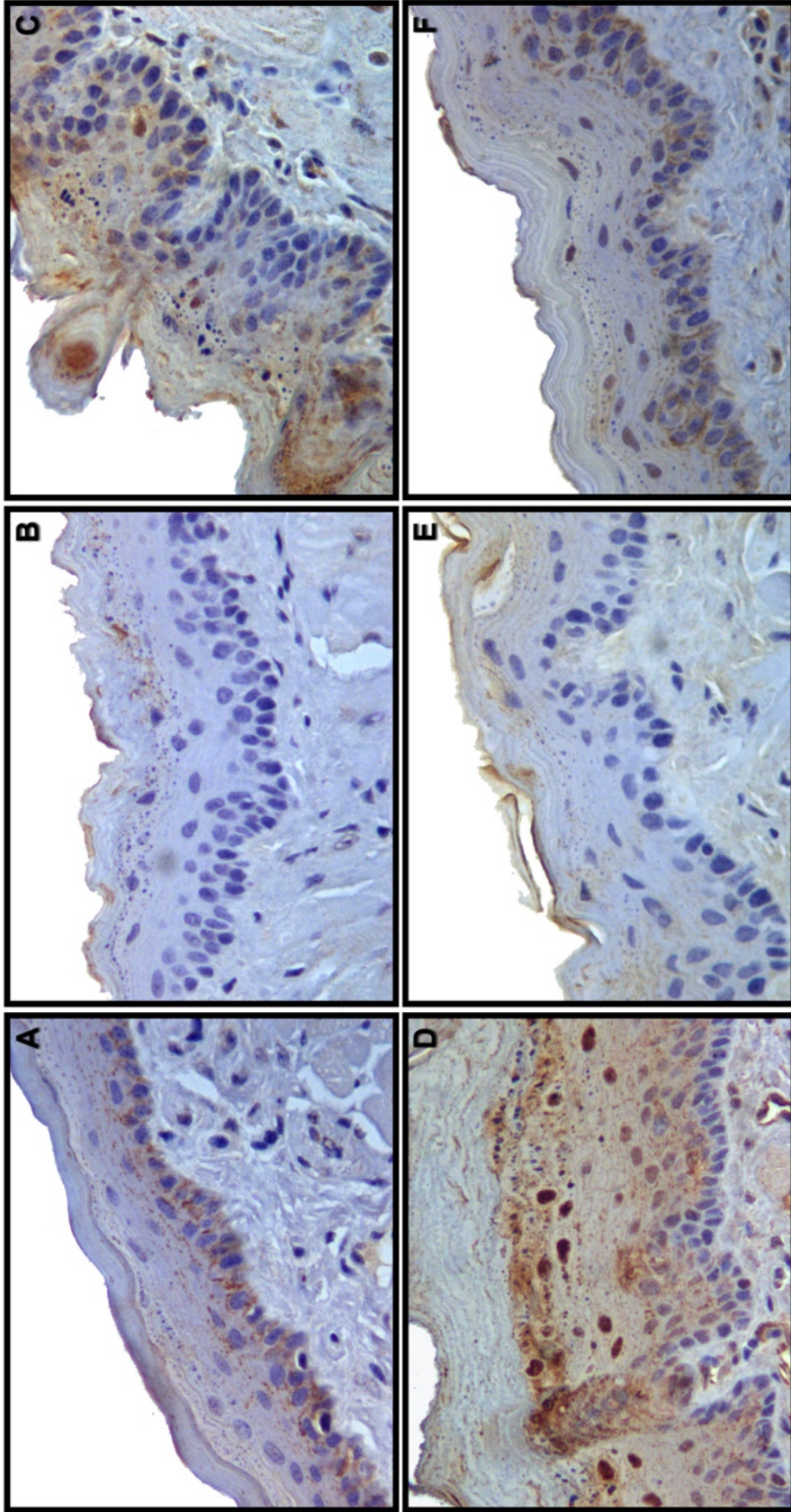


Figura 5. Expressão imunohistoquímica da proteína OCT-4 em língua exibindo marcação predominantemente nuclear. A. Grupo controle; B. Grupo de 7 dias de exposição; C. Grupo de 15 dias de exposição; D. Grupo de 30 dias de exposição; E. Grupo de 60 dias de exposição; F. Grupo de 90 dias de exposição.

4.1.3 SOX-2

A proteína SOX-2 apresentou semelhança entre o grupo controle (2,82%) e o grupo de sete dias (2,59%) e com aumento na sua expressão no grupo de 15 dias (23,82%) atingindo a sua expressão máxima no grupo de 30 dias (26,28%) com posterior decréscimo nos grupos de 60 e 90 dias (6,31% e 7,95% respectivamente). A proteína SOX-2 demonstrou diferença entre os diferentes grupos de tempo de exposição, com diferença significativa apenas entre o grupo de 30 dias quando comparado com grupo controle e grupo de sete dias ($p=0,016$ e $p=0,002$ respectivamente). (Tabela 1, Gráfico 3, Figura 5).

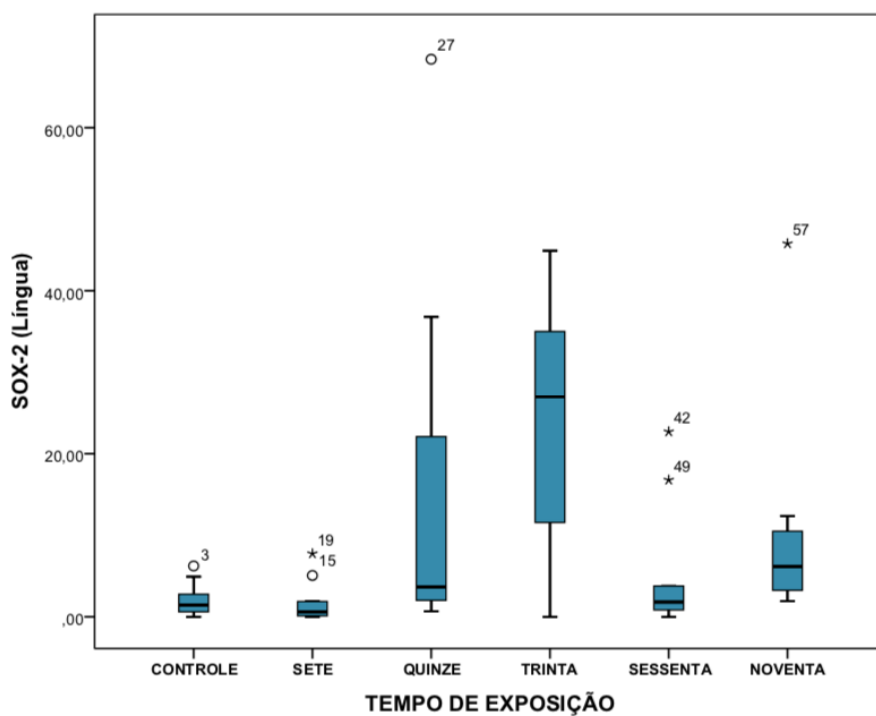


Gráfico 3. Blox-plot de expressão do marcador SOX-2 de acordo com tempo de exposição.

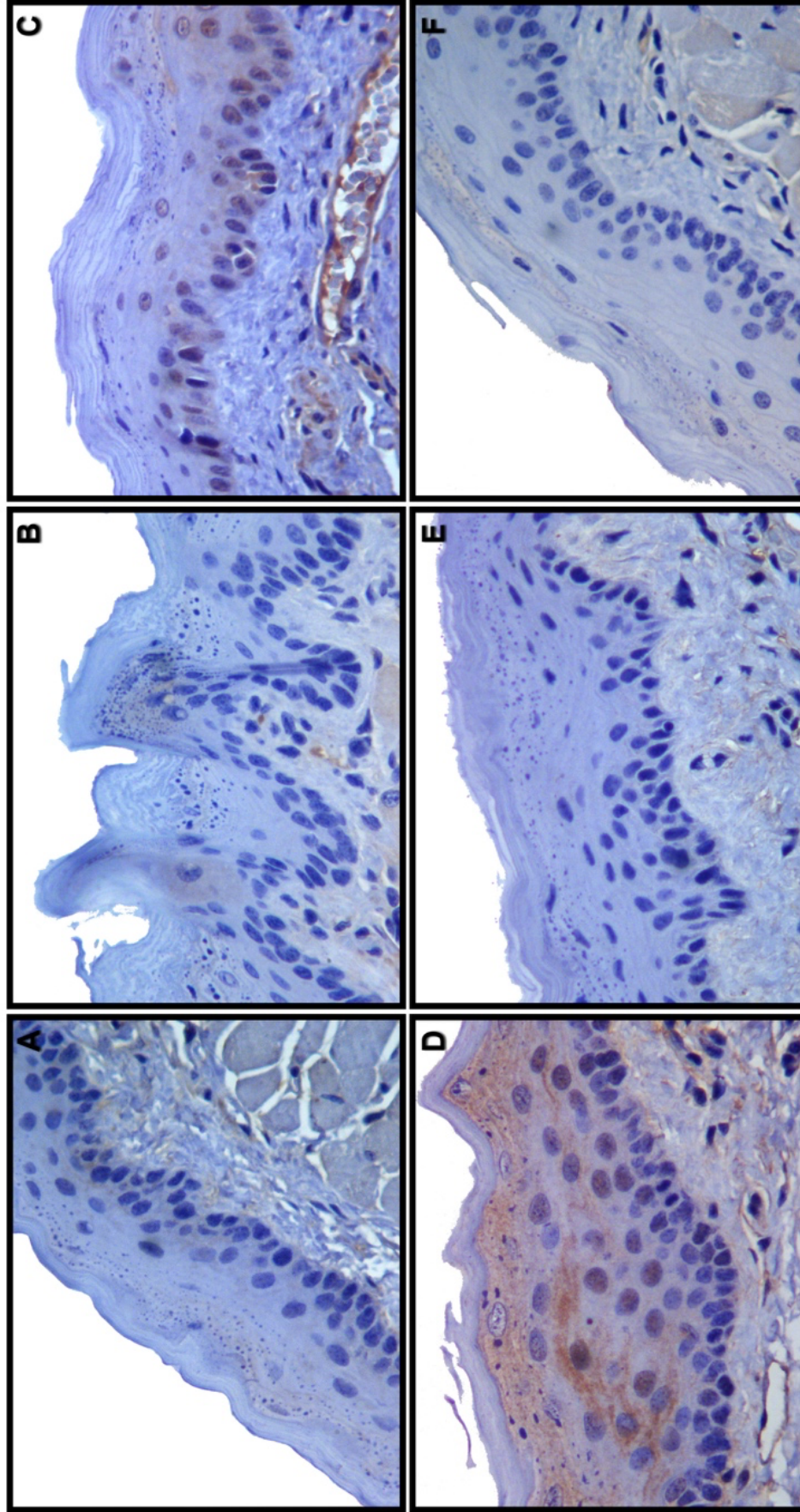


Figura 6. Expressão imunohistoquímica da proteína SOX-2 em língua exibindo predominante marcação nuclear. A. Grupo controle; B. Grupo de 7 dias de exposição; C. Grupo de 15 dias de exposição; D. Grupo de 30 dias de exposição; E. Grupo de 60 dias de exposição; F. Grupo de 90 dias de exposição.

4.1.4 Ki-67

Em relação à expressão de Ki-67 nos diferentes tempos de exposição, foi observado discreto aumento a partir do grupo de 15 dias (0,58%) com maior expressão nos grupos de 60 (0,75%) e 90 dias (1,40%). Observou-se diferença estatística na comparação entre o grupo de 7 dias e o grupo de 60 dias ($p=0,022$) e de 90 dias ($p=0,001$). O grupo controle apresentou diferença estatística apenas com o grupo de 90 dias ($p=0,004$) (Tabela 1, Gráfico 4, Figura 6).

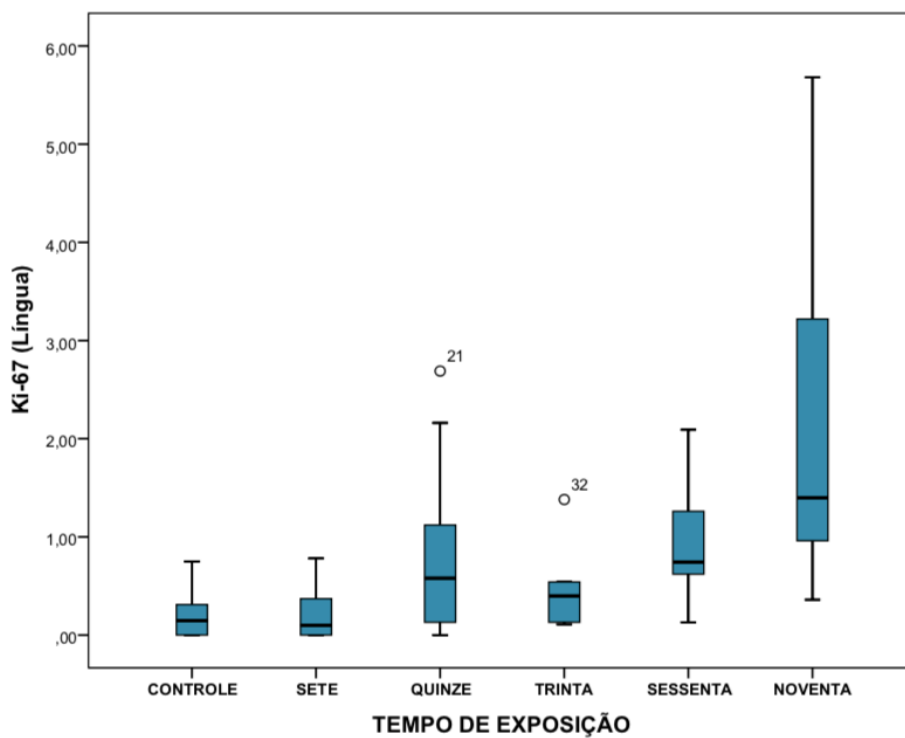


Gráfico 4. Blox-plot de expressão do marcador Ki-67 de acordo com tempo de exposição.

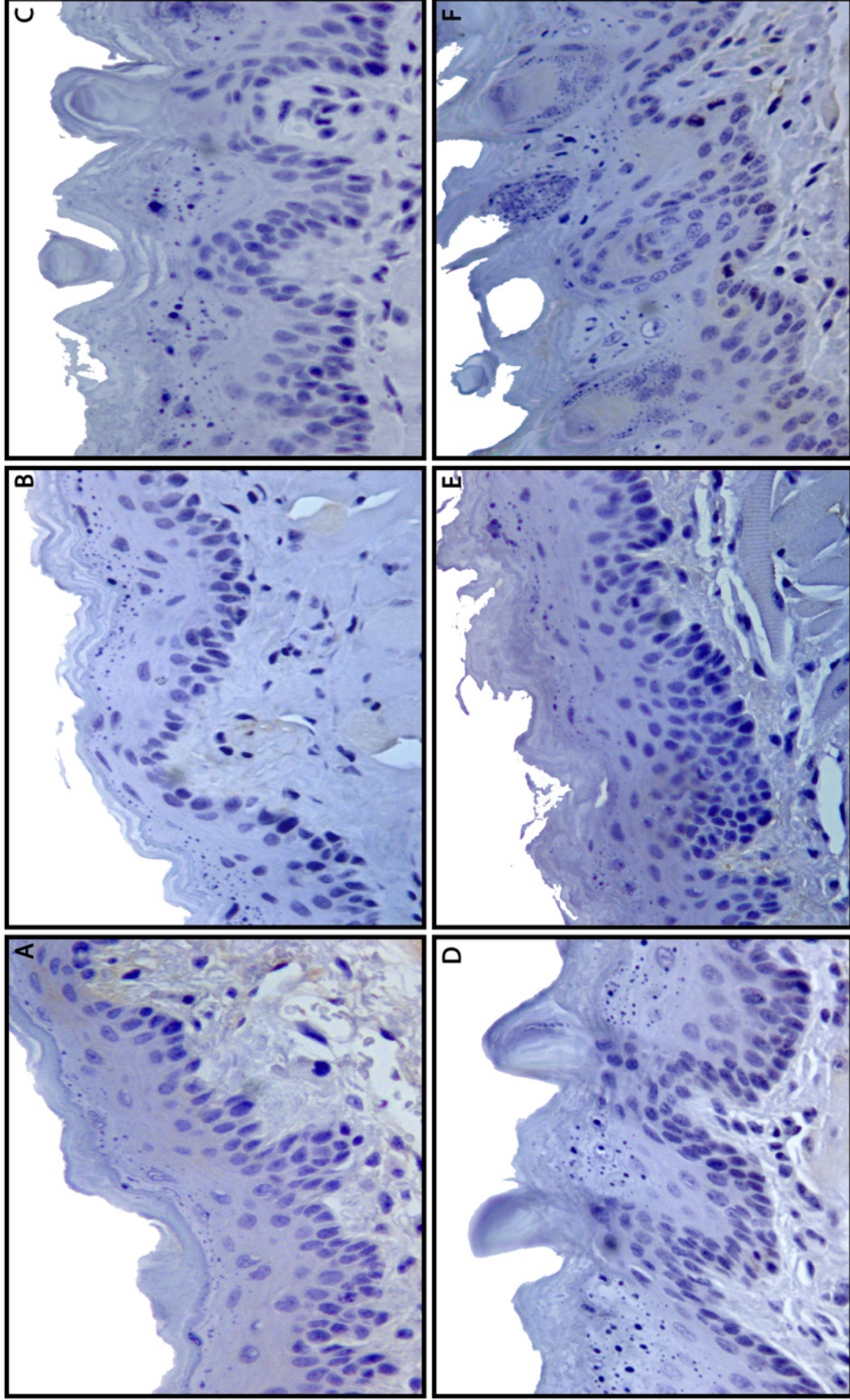


Figura 7. Expressão imunoistoquímica da proteína Ki-67 em língua exibindo marcação em núcleo. A. Grupo controle; B. Grupo de 7 dias de exposição; C. Grupo de 15 dias de exposição; D. Grupo de 30 dias de exposição; E. Grupo de 60 dias de exposição; F. Grupo de 60 dias de exposição.

4.1.5 p53

Em relação à expressão de p53 nos diferentes tempos de exposição, foi observado semelhança entre o grupo controle (0,26%) e grupo de sete dias (0,10%) e houve discreto aumento a partir do grupo de 15 dias (2,14%) com maior expressão nos grupos de 30 e 90 dias (3,12% e 3,10% respectivamente). Observou-se diferença estatística entre o grupo de 7 dias com o grupo de 15 dias ($p=0,020$), com o grupo de 30 dias ($p=0,001$), com o grupo de 60 dias ($p=0,034$) e o de 90 dias ($p=0,004$). O grupo controle apresentou diferença estatística apenas com o grupo de 30 dias ($p=0,003$) e de 90 dias ($p=0,016$) (Tabela 1, Gráfico 5, Figura 7)

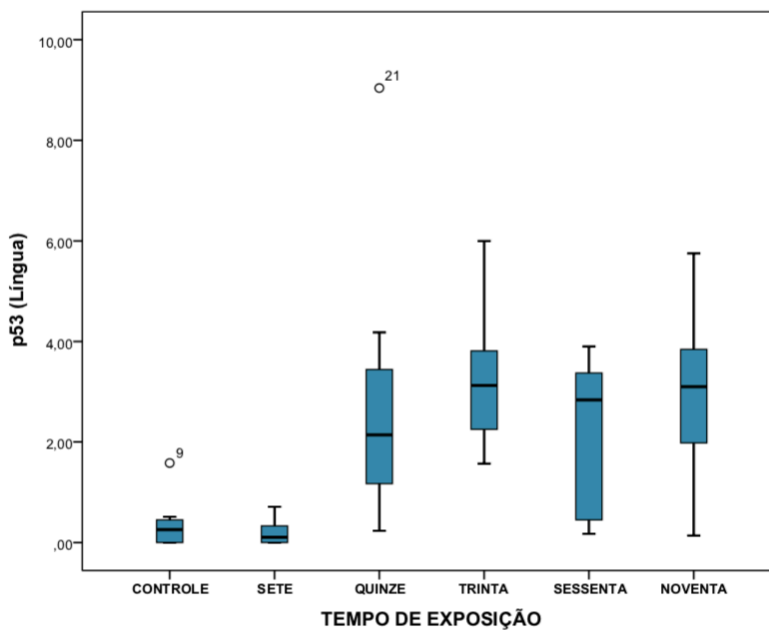


Gráfico 5. Blox-plot de expressão do marcador p53 de acordo com tempo de exposição.

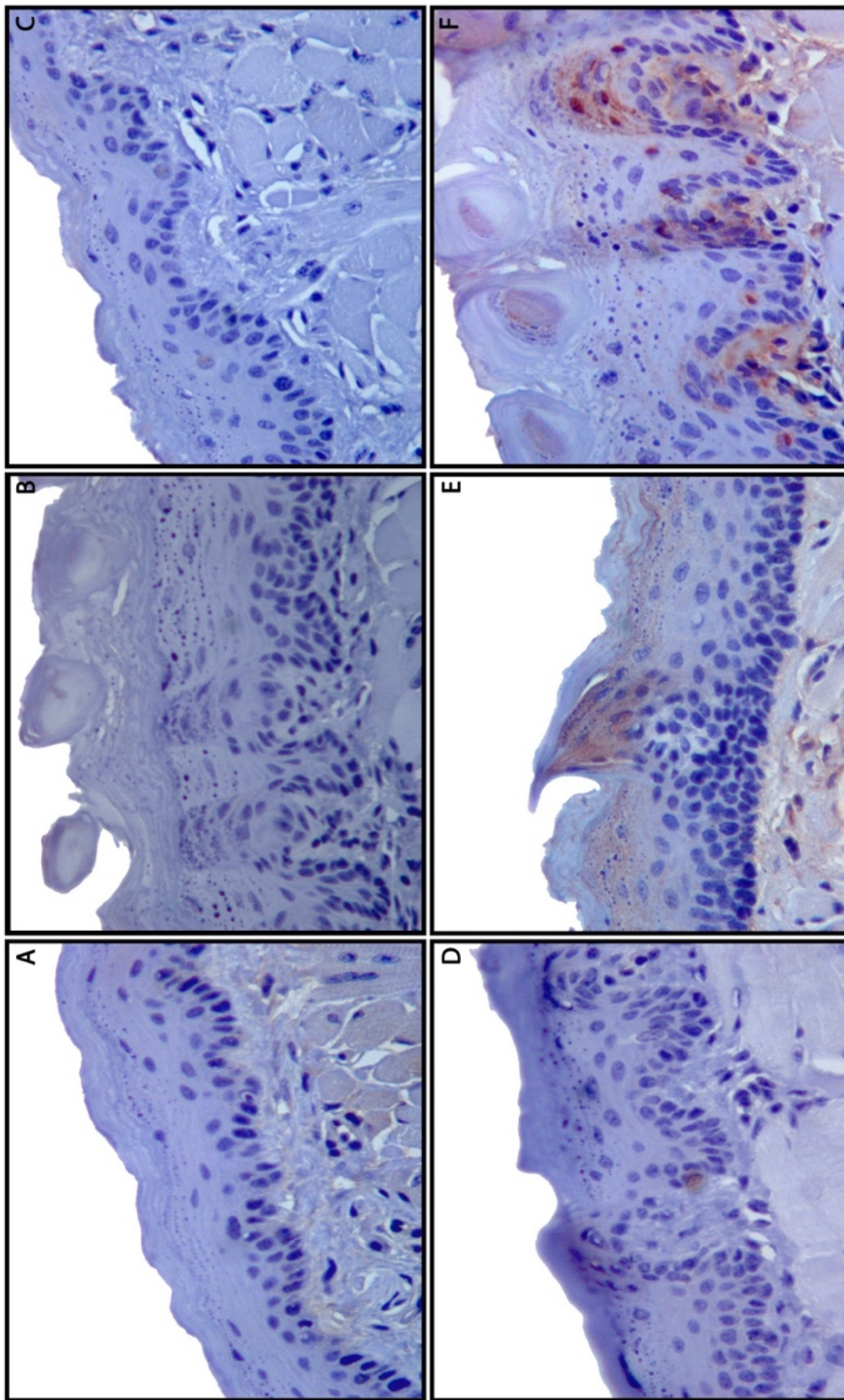


Figura 8. Expressão imunoistoquímica da proteína p53 em língua exibindo marcação em núcleo. A. Grupo controle; B. Grupo de 7 dias de exposição; C. Grupo de 15 dias de exposição; D. Grupo de 30 dias de exposição; E. Grupo de 60 dias de exposição; F. Grupo de 90 dias de exposição.

4.2 RESULTADOS EM TRAQUEIA DE ACORDO COM TEMPO DE EXPOSIÇÃO

No grupo controle foi constatada aparência histológica dentro dos padrões de normalidade da traqueia. Os grupos de 7 e 15 dias de exposição não apresentaram alteração histológica. No grupo de 30 dias observou-se áreas focais com perda de cílios e hiperplasia de células baixas do epitélio pseudoestratificado, ditas como células de reserva. Nos grupos 60 e 90 dias foram observadas diversas alterações do epitélio de revestimento, com extensas áreas de perda de cílios, compatível com início de metaplasia para epitélio pavimentoso estratificado, espessura reduzida de tecido conjuntivo, além de discreta hiperqueratose em áreas focais e infiltrado inflamatório crônico (Fig. 9)

Observou-se que a exposição à fumaça de narguilé resultou em redução de expressão dos marcadores associados a CTNs como Nanog e Sox-2 no grupo de sete dias, aumento gradual no grupo de 15 dias, com pico no grupo de 30 dias de exposição, redução no grupo de sessenta dias e novamente aumento no grupo de 90 dias. Também se observou um aumento da expressão de Ki-67 e p53 com nítido aumento no grupo de 30 dias (Tabela 2).

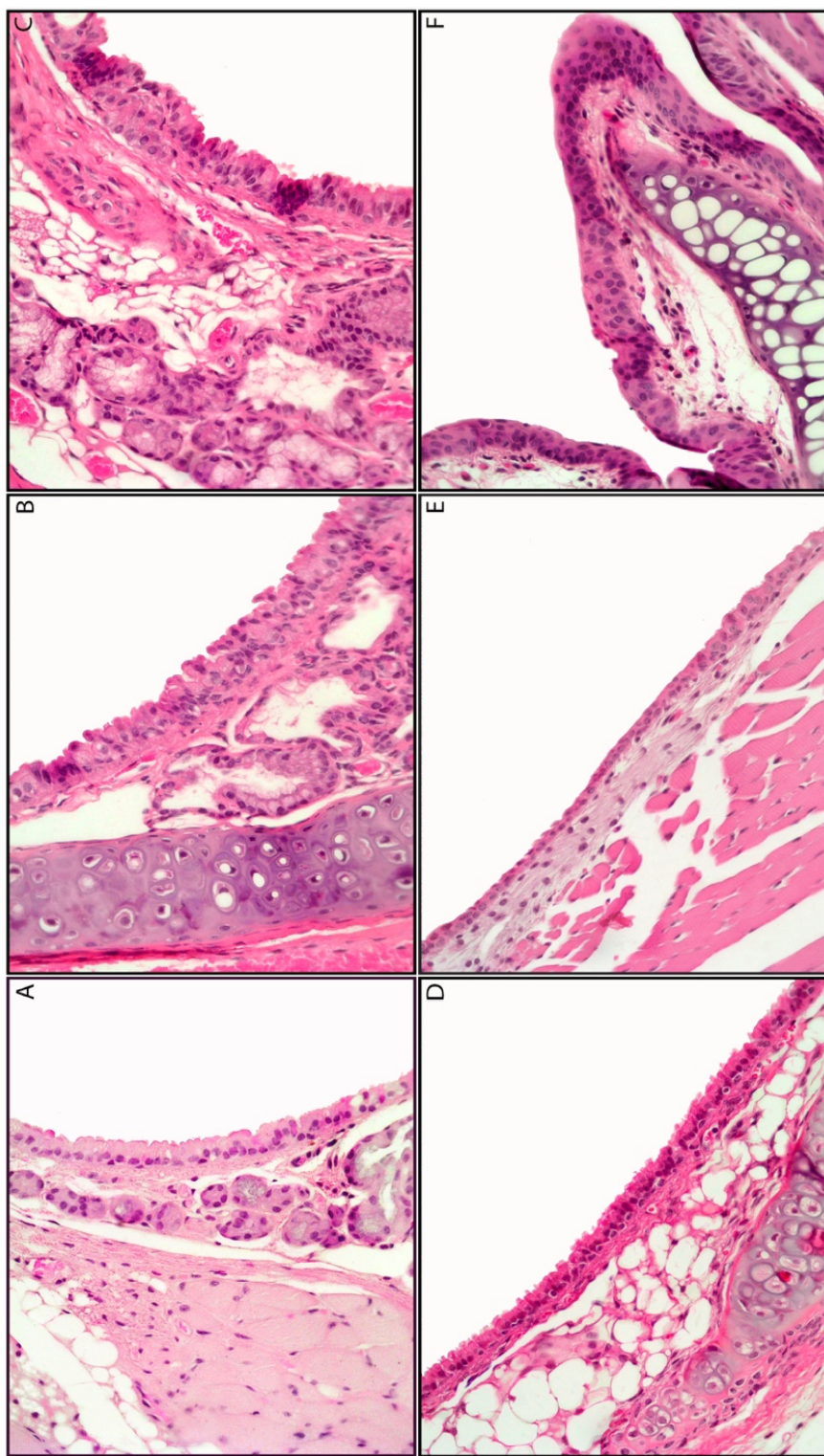


Figura 9. Coloração em HE em traqueia. A. Grupo controle; B. Grupo de 7 dias de exposição; C. Grupo de 15 dias de exposição; D. Grupo de 30 dias de exposição; E. Grupo de 60 dias de exposição apresentando perda de cílios, espessura reduzida de tecido conjuntivo e discreta hiperqueratose; F. Grupo de 90 dias de exposição apresentando perda de cílios, células baixas com aspecto pavimentoso e espessura reduzida de tecido conjuntivo.

Tabela 2. Diferença em traqueia entre as medianas de cada grupo de exposição de acordo com a expressão da porcentagem nuclear positiva dos anticorpos.

		CONTROLE	SETE	QUINZE	TRINTA	SESSENTA	NOVENTA	
Traqueia	Mediana	41,76 ^a	4,64 ^b	25,40 ^{ab}	37,68 ^a	11,16 ^{ab}	42,55 ^a	
	Distância	Nanog	23,93	13,83	10,23	37,23	24,25	33,12
	Interquartil							
	Mediana		49,14 ^a	6,97 ^b	26,68 ^{ab}	26,51 ^{ab}	6,19 ^b	30,79 ^{ab}
	Distância	OCT4	28,31	6,25	21,19	17,59	12,90	19,81
	Interquartil							
	Mediana		2,63 ^a	4,98 ^a	13,19 ^a	2,76 ^a	0,30 ^a	2,76 ^a
	Distância	Sox2	29,66	7,36	29,49	35,54	7,88	23,95
	Interquartil							
	Mediana		0,00 ^a	0,39 ^a	2,67 ^{ab}	5,56 ^b	1,01 ^a	2,46 ^{ab}
	Distância	Ki-67	1,13	0,96	3,38	6,23	2,05	4,77
	Interquartil							
	Mediana		0,78 ^a	1,18 ^{ab}	1,67 ^{ab}	2,29 ^{ab}	2,31 ^b	1,42 ^{ab}
	Distância	p53	1,31	1,33	3,68	1,68	4,72	3,47
	Interquartil							

Nota: as letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$). Testes de Kruskal-Wallis e teste *pos-hoc* de Bom-Ferroni.

4.2.1 Nanog

A expressão da proteína seguiu padrão semelhante ao da língua, reduzindo no grupo de 7 dias de exposição (7,64%), com aumento no grupo de 15 e 30 dias (25,40% e 37,68% respectivamente). Ocorreu novamente um decréscimo da expressão novamente no grupo de 60 dias (11,16%) e novo aumento da expressão no grupo de 90 dias (42,55%). Observou-se diferença estatística entre as expressões de Nanog nos diferentes grupos com significância na comparação entre os grupos controle e grupo de sete dias de exposição ($p=0,005$) e entre o grupo de sete dias e os grupos de 30 e 90 dias de exposição ($p=0,009$ e $p=0,001$ respectivamente). (Tabela 2, Gráfico 6, Figura 9).

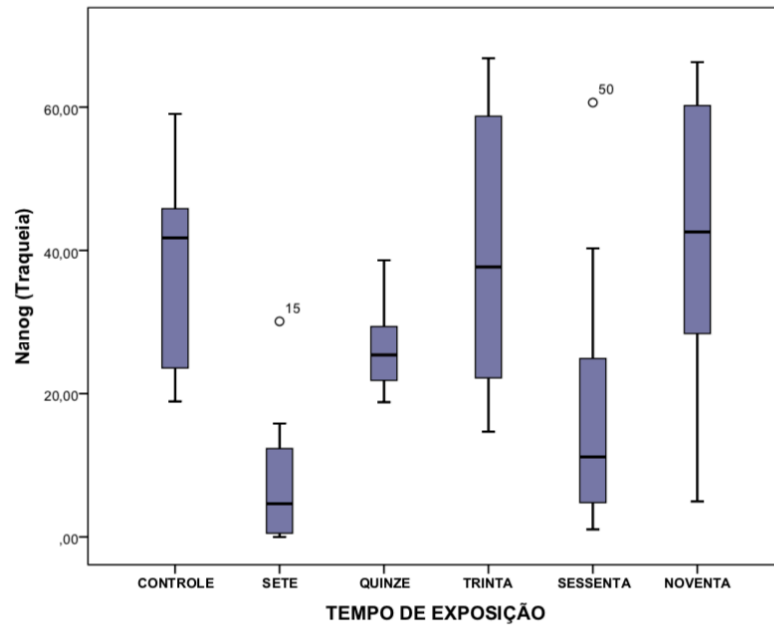


Gráfico 6. Blox-plot de expressão do marcador Nanog de acordo com tempo de exposição.

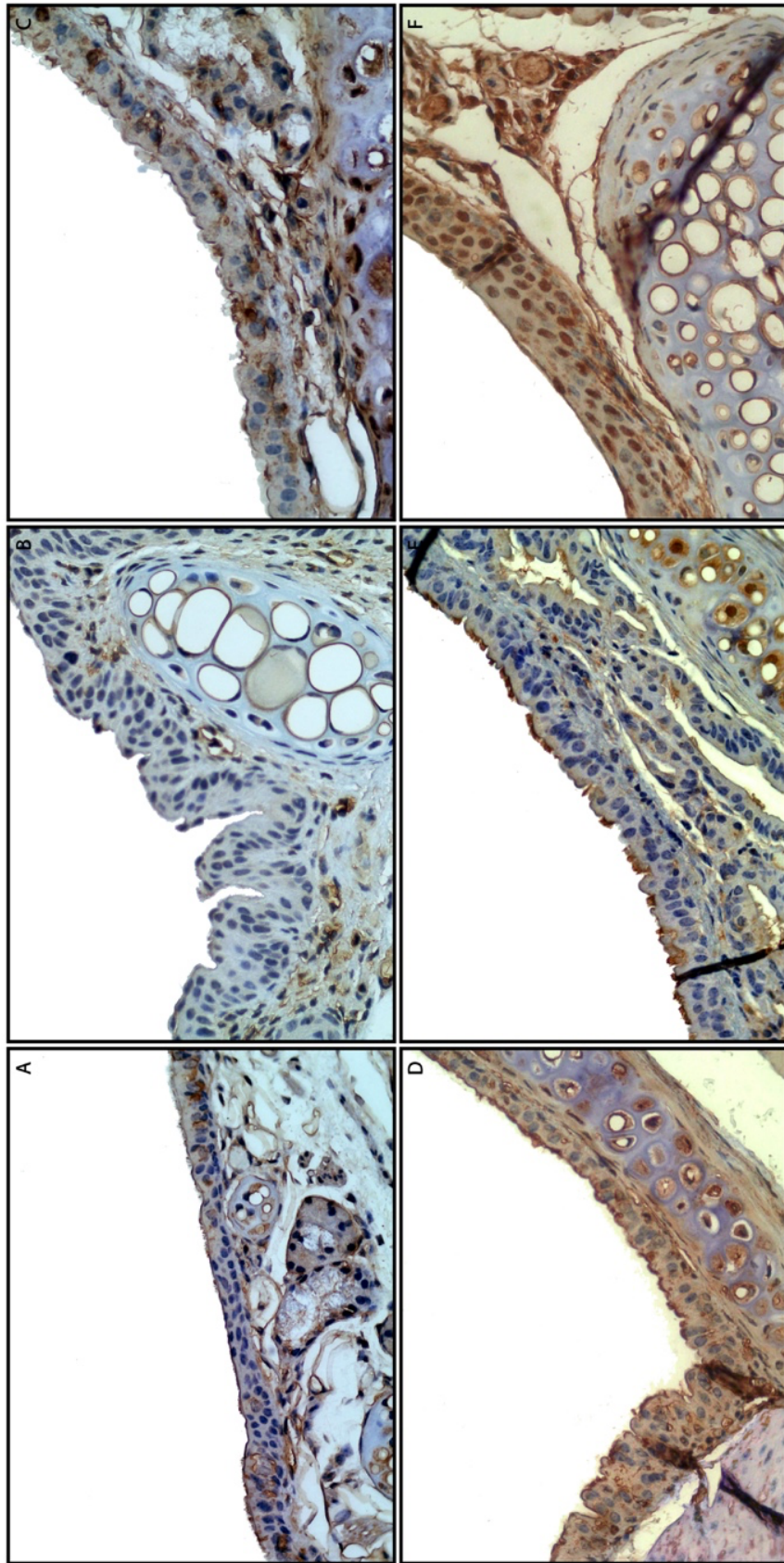


Figura 10. Expressão imunohistoquímica da proteína Nanog em traqueia exibindo marcação em núcleo e citoplasma. A. Grupo controle; B. Grupo de 7 dias de exposição; C. Grupo de 15 dias de exposição; D. Grupo de 30 dias de exposição; E. Grupo de 60 dias de exposição; F. Grupo de 90 dias de exposição.

4.2.2OCT-4

Em traqueia, a expressão de OCT-4 apresentou diminuição no grupo de 7 dias (6,97%), com aumento nos grupos de 15 e 30 dias (26,68% e 26,51%). Ocorreu novamente diminuição na expressão da proteína no grupo de 60 dias (6,19%) com novo aumento da expressão no grupo de 90 dias (30,79%). A expressão de OCT-4 em traqueia demonstrou diferença estatística entre os diferentes grupos, com significância na comparação entre o grupo controle e o grupo de 7 dias ($p=0,000$) e diferença estatística entre o grupo controle e grupo de 60 dias de exposição ($p=0,000$) (Tabela 2, Gráfico 7, Figura 10).

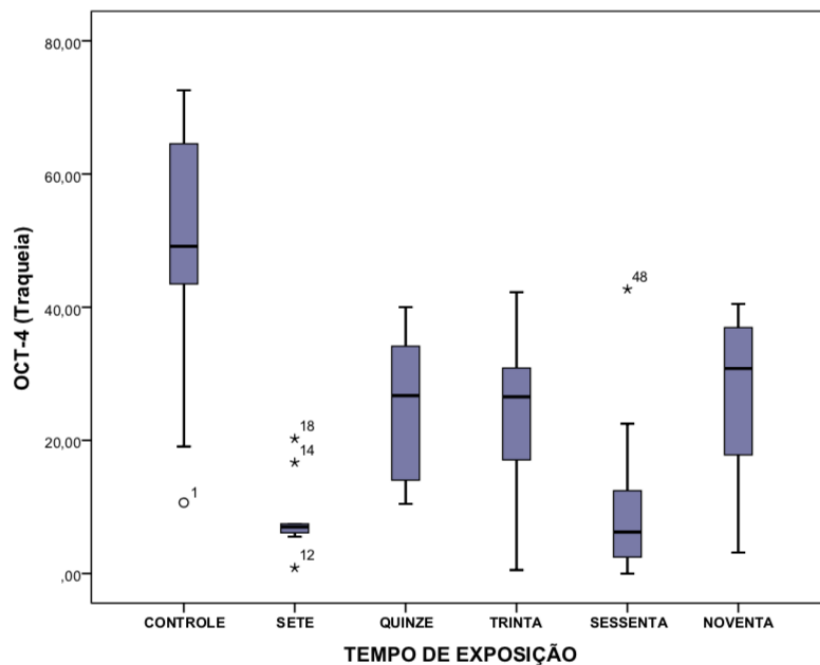


Gráfico 8. Blox-plot de expressão do marcador OCT-4 de acordo com tempo de exposição.

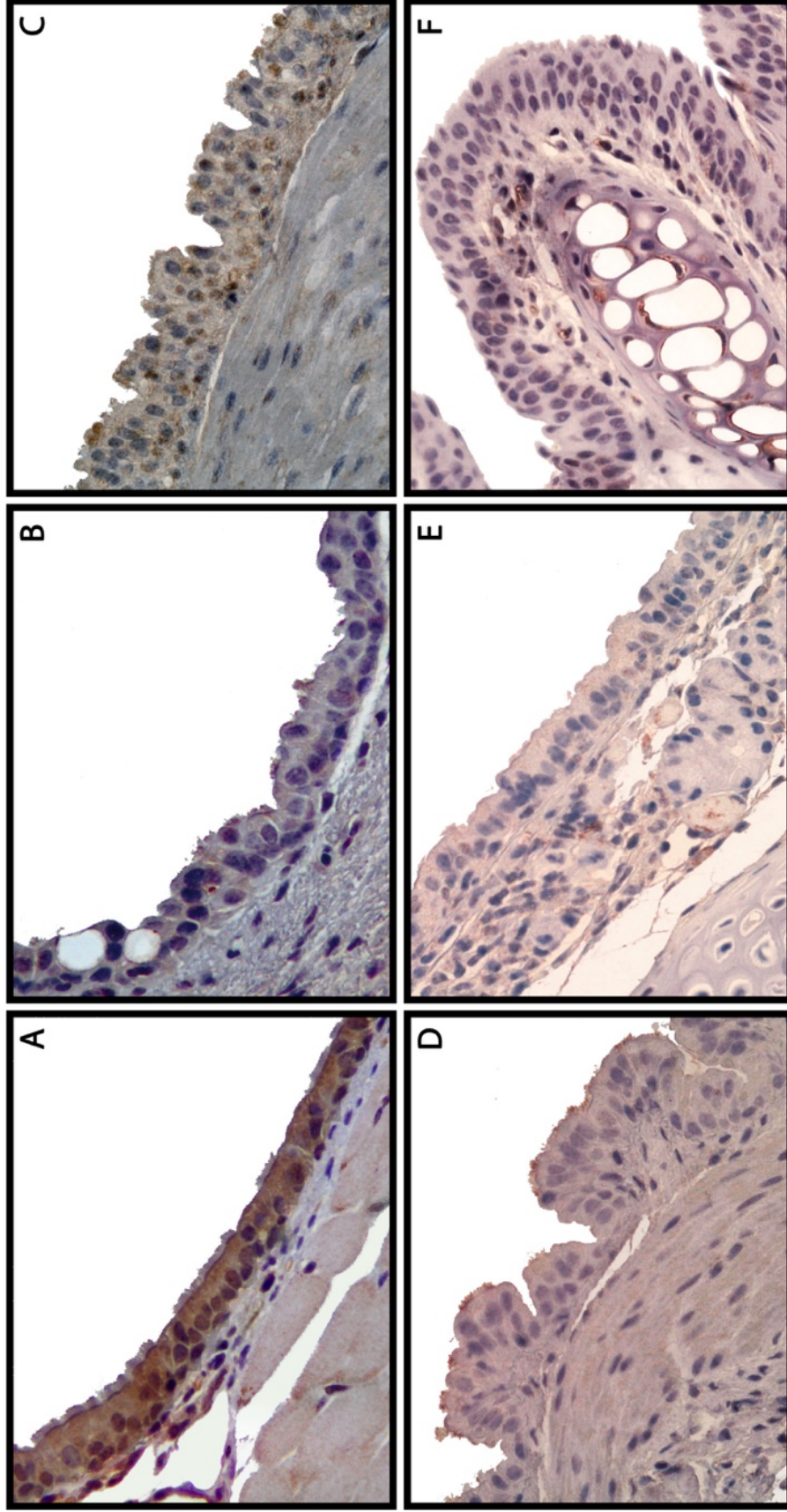


Figura 11. Expressão imunohistoquímica da proteína Oct-4 em traquéia exibindo marcação em núcleo. A. Grupo controle; B. Grupo de 7 dias de exposição; C. Grupo de 15 dias de exposição; D. Grupo de 30 dias de exposição; E. Grupo de 60 dias de exposição; F. Grupo de 90 dias de exposição.

4.2.3 SOX-2

A expressão da proteína SOX-2 permaneceu baixa no grupo controle (2,63%) com aumento em 7 dias de exposição (4,98%) e no grupo de 15 dias (13,19%). Ocorreu um declínio na expressão dessa proteína nos grupos de 30, 60 e 90 dias de exposição (2,76%, 0,30% e 2,76% respectivamente). Na comparação entre grupos não houve diferença estatística na expressão de SOX-2 ($p=0,42$).

A expressão da SOX-2 diferiu das outras proteínas associadas as CTNs (Nanog e OCT-4) não havendo diferença entre os grupos (Tabela 2, Gráfico 8, Figura 10).

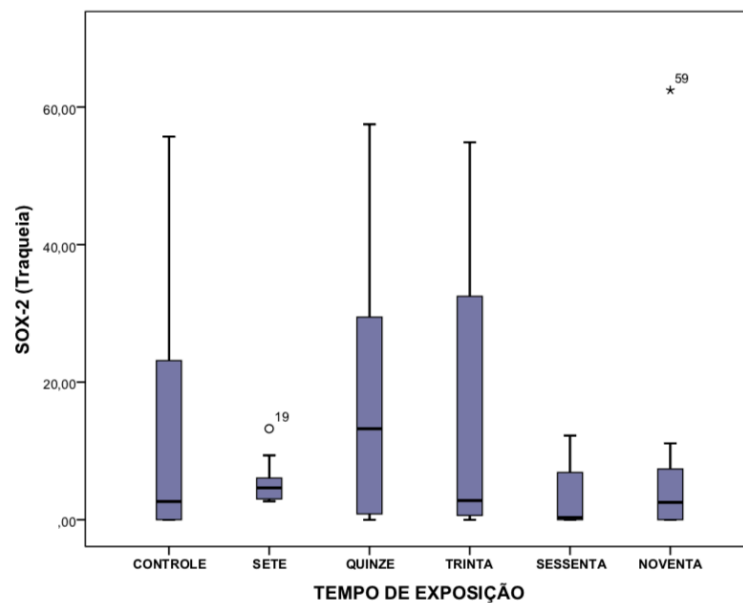


Gráfico 8. Blox-plot de expressão do marcador SOX-2 de acordo com tempo de exposição.

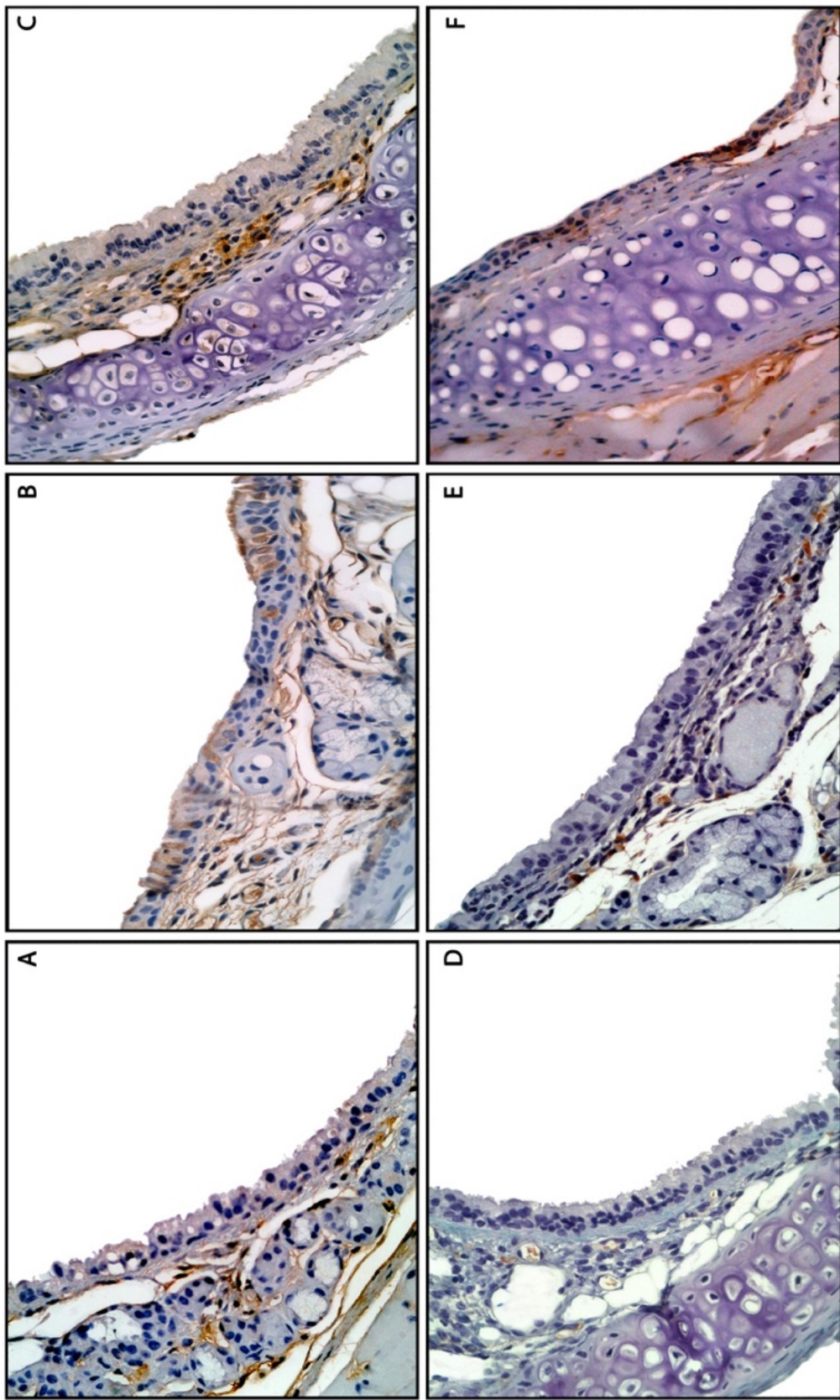


Figura 12. Expressão imunohistoquímica da proteína SOX-2 em traqueia exibindo marcação predominante em núcleo. A. Grupo controle; B. Grupo de 7 dias de exposição; C. Grupo de 15 dias de exposição; D. Grupo de 30 dias de exposição; E. Grupo de 60 dias de exposição; F. Grupo de 90 dias de exposição.

4.2.4Ki-67

Observou-se discreta expressão da proteína Ki-67 nos grupos expostos ao narguilé, com discreto aumento ao longo do tempo e auge no grupo de 30 dias. No grupo de 7 dias (0,39%) observou-se semelhança com o grupo controle (0,39%), aumentando no grupo de 15 dias (2,67%) com a maior expressão no grupo de 30 dias (5,56%). Posteriormente, houve declínio na expressão nos grupos de 60 e 90 dias (1,01% e 2,46% respectivamente). No teste estatístico houve diferença estatística significativa entre os grupos controle e 30 dias ($p=0,000$) e grupo de 7 dias e 30 dias ($p=0,002$). Observou-se decréscimo da expressão no grupo de 60 dias com diferença estatística entre os grupos de 30 e 60 dias ($p=0,026$).

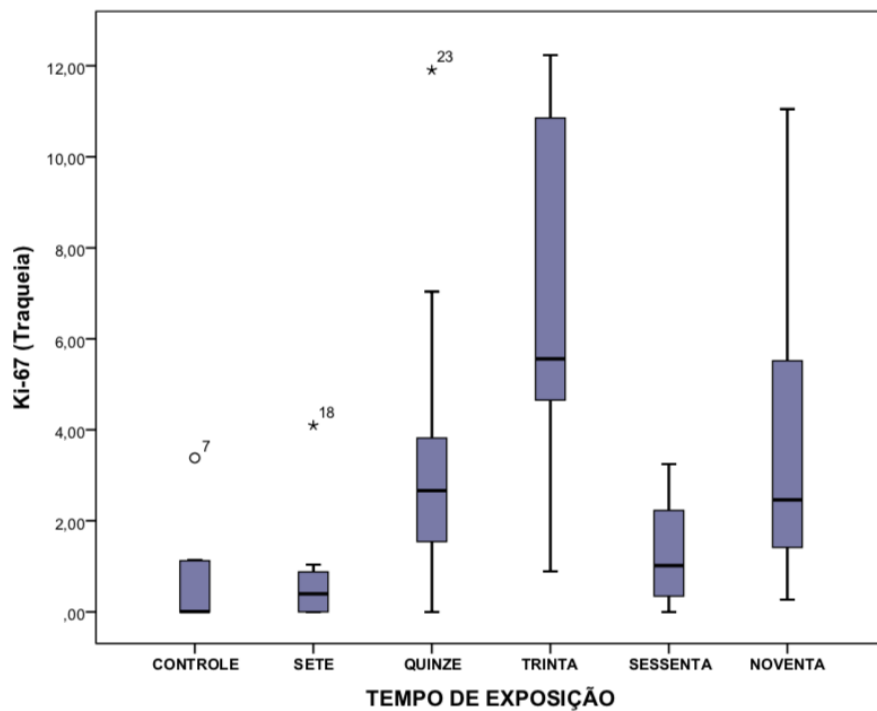


Gráfico 9. Blox-plot de expressão do marcador Ki-67 de acordo com tempo de exposição.

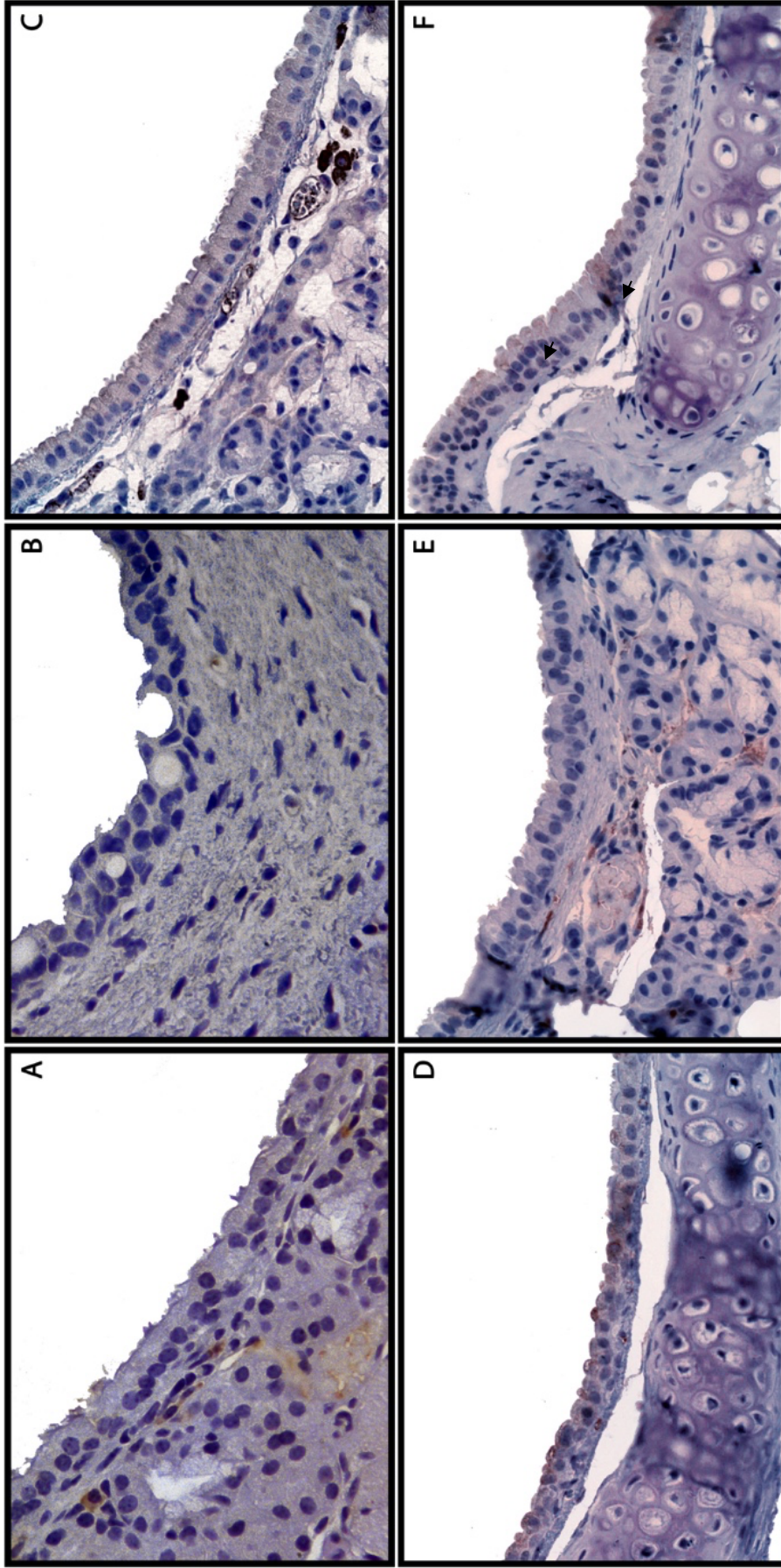


Figura 13. Expressão imunohistoquímica da proteína Ki-67 em traqueia exibindo marcação em núcleo. A. Grupo controle; B. Grupo de 7 dias de exposição; C. Grupo de 15 dias de exposição; D. Grupo de 30 dias de exposição; E. Grupo de 60 dias de exposição; F. Grupo de 90 dias de exposição.

4.2.5 p53

A expressão da proteína p53, semelhante a expressão em língua, começou a ser expressa de forma mais exuberante no grupo de 30 dias de exposição. Na avaliação da proteína p53, foi observado aumento gradual da expressão em relação ao controle (0,78%) a partir do grupo de 7 dias (1,18%) com auge da marcação nos grupos de 30 (2,29%) e 60 dias (2,31%) e redução no grupo de 90 dias (1,425%), entretanto, o aumento foi estatisticamente significativo apenas entre grupo controle e grupo de 60 dias ($p=0.029$).

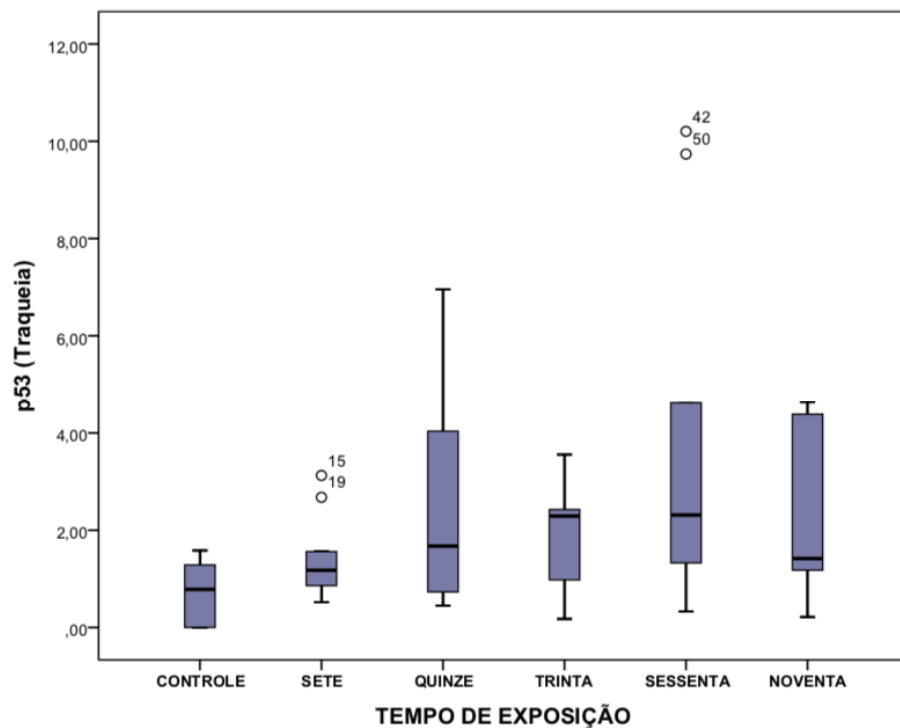


Gráfico 10. Blox-plot de expressão do marcador p53 de acordo com tempo de exposição.

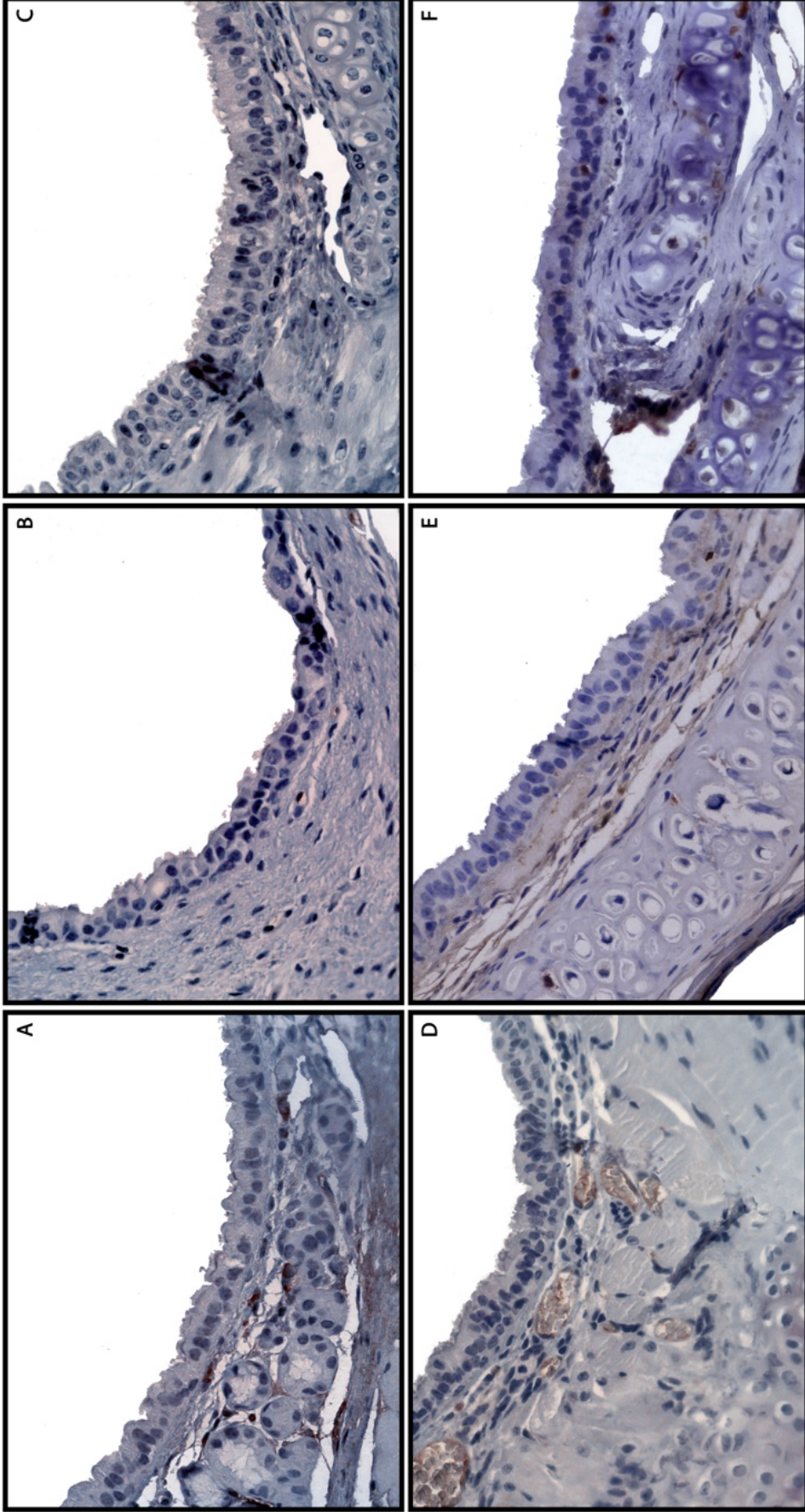


Figura 14. Expressão imunohistoquímica da proteína p53 em traqueia exibindo marcação nuclear. A. Grupo controle; B. Grupo de 7 dias de exposição; C. Grupo de 15 dias de exposição; D. Grupo de 30 dias de exposição; E. Grupo de 60 dias de exposição; F. Grupo de 90 dias de exposição.

4.3 CORRELAÇÃO ENTRE MARCADORES EM LÍNGUA

Realizou-se o Teste de correlação de Spearman entre as expressões de Nanog, OCT-4 e SOX-2 em língua e observou-se que são estatisticamente significantes e com correlação moderada. Observou-se correlação entre Nanog e OCT-4 ($R= 0,565$; $p=0,000$), entre Nanog e SOX-2 ($R=0,596$; $p=0,000$) e entre OCT-4 e SOX-2 ($R=0,512$; $p=0,000$).

Também, foi observado correlação moderada e estatisticamente significativa na expressão da proteína p53 e as proteínas associadas as CTNs: Nanog ($R= 0,500$; $p=0,000$) e SOX-2 ($R=0,459$; $p=0,000$). Entre p53 e OCT-4 ($R=0,373$; $p=0,003$) observou-se correlação estatisticamente significativa, porém baixa, assim como ocorreu entre a expressão da proteína p53 e Ki-67 em língua ($R=0,392$; $p=0,02$).

Não foi observado correlação entre ki67 e proteínas de CTNs.

4.4 CORRELAÇÃO ENTRE MARCADORES EM TRAQUEIA

Foi realizado teste de correlação de Spearman para avaliar as expressões de marcadores associados as CTNs em traqueia. Observou-se correlação estatística e moderada entre OCT-4 e Nanog ($R=0,513$; $p=0,000$) e correlação baixa entre OCT-4 e SOX-2 ($R= 0,313$; $p=0,17$) e não foi observado correlação entre SOX-2 e Nanog ($R=0,174$, $p=0,192$).

Constatou-se correlação estatisticamente significativa, porém baixa entre a expressão de p53 e Ki-67 ($R=0,369$, $p=0,004$).

4.5. CORRELAÇÃO ENTRE MARCADORES EM LÍNGUA E TRAQUEIA

A expressão das proteínas Nanog ($p=0,546$), OCT-4 ($p=0,262$), SOX-2 ($p=0,856$) e p53 ($p=0,401$) foi semelhante em língua e traqueia, não havendo diferença estatística no teste de Mann-Whitney. Esta diferença foi observada apenas na expressão de Ki-67 entre língua (0,42%) e traqueia (1,48%) ($p=0,000$).

Realizou-se Teste de Correlação da expressão de todos os grupos em língua e traqueia e foi constatado a correlação fraca da expressão das proteínas Nanog ($R=0,399$; $p=0,02$), OCT-4 ($R=0,297$; $p=0,024$) e p53 ($R=0,333$; $p=0,011$), que se apresentaram de forma semelhante nos tecidos. Porém não houve correlação da expressão de Ki-67 ($p=0,176$) e SOX-2 ($p=0,338$) nos diferentes tecidos. Ki-67 em traqueia se apresentou em grupo de tempo de exposição anterior ao de língua e com marcação mais exuberante.

5 DISCUSSÃO

É consenso na literatura que o fumo do narguilé gera exposição da cavidade oral e vias respiratórias à produtos químicos semelhantes aos produtos liberados pelo cigarro como: nicotina, alcatrão, metais pesados, arsênio, benzopireno, níquel, cobalto, berílio, cromo, chumbo, que podem causar danos semelhantes ao cigarro convencional e estão associados a diversas doenças (EISSENBERG; SHIHADDEH, 2009; MAMTANI; CHEEMA; SHEIKH *et al.*, 2017; SHIHADDEH; SALEH, 2005; VIEGAS, 2008).

Nesse estudo foram avaliadas as características de proliferação celular e controle de apoptose com marcadores como Ki-67 e p53, assim como os marcadores de CTNs Nanog, SOX-2 e OCT-4. Os marcadores de CTN estão associados à presença de células pluripotentes e estudos sugerem que a expressão aberrante das isoformas e pseudogenes de OCT-4, NANOG e SOX-2 desempenhe um papel vital na carcinogênese e metástase tumoral, mas os mecanismos precisos ainda são mal compreendidos (LIU; YU; LIU, 2013).

5.1 Língua

Os resultados demonstraram um aumento gradual dos marcadores associados às CTNs no epitélio lingual, atingindo o pico da expressão de Nanog, OCT-4 e SOX-2 aos 30 dias de exposição. A expressão dessas proteínas nessa fase inicial pode sugerir que a presença desses marcadores esteja associada à renovação tecidual e também proteção à diferenciação celular,

podendo ser um indicador de reação contra a agressão causada pela fumaça de narguilé a esses tecidos (GRENDDEL; SOKOLSKÝ; VAŠČÁKOVÁ *et al.*, 2012; LIU; YU; LIU, 2013). Liu *et al.* (2013), relatam que esses marcadores não apenas mantêm as propriedades de auto-renovação e pluripotência nas células pluripotentes, mas também evitam que estas se dividam de forma inadequada (LIU; YU; LIU, 2013). Pode-se sugerir dessa forma que a presença desses marcadores no epitélio lingual possa estar associada a um dano tecidual inicial devido aos componentes do narguilé.

Alguns estudos afirmam que o aumento da expressão desses marcadores, como por exemplo, o OCT-4 e SOX-2 esteja associado aos estágios iniciais de malignização. Tal afirmação seria condizente com o aumento progressivo da expressão da proteína até grupo de 30 dias deste trabalho, entretanto, como houve decréscimo nos grupos posteriores, pode-se supor que as células sofreram adaptação frente a exposição crônica aos agentes químicos (BAILLIE; TAN; ITINTEANG, 2017; FU; HSIEH; CHENG *et al.*, 2016). Os marcadores de CTNs também foram expressos no grupo controle, fato que pode ser explicado pois as células epiteliais em dorso lingual, têm altas taxas de renovação tecidual em mamíferos, especialmente em roedores (LI; NIU; ZHU, 2018; TANAKA; KOMAI; TOKUYAMA *et al.*, 2013).

Observou-se correlação entre a expressão dos marcadores de CTNs em língua, fato de suma importância nesse estudo, visto que já está bem documentado que a expressão aumentada dos três marcadores em conjunto está associado à gênese tumoral, crescimento e diferenciação de células neoplásicas incluindo o CEO, indicando que a fumaça do narguilé tem capacidade de aumentar a expressão das CTNs e levar ao aumento da possibilidade de transformação maligna (CHIOU; YU; HUANG *et al.*, 2008; RODRIGUES; XAVIER; ANDRADE *et al.*, 2018; YU; FEATHERSTON; TAN *et al.*, 2016; ZHAO; LIU; CHEN *et al.*, 2018). É interessante observar que Fu *et al.* (2015) analisou a correlação destas três proteínas em lesões de língua de pacientes e observou fraca correlação entre SOX-2 e Nanog e entre SOX-2 e OCT-4 diferindo dos nossos resultados que observaram correlação moderada entre os marcadores de CTNs. Esse resultado pode ser explicado, pois nossa amostra era de línguas sem lesão apenas com exposição a fumaça do narguilé enquanto a amostra de Fu *et al.* (2015) havia amostras de tecido tumoral com pacientes com diferentes características clínicas e tempo de lesão gerando resultados diferentes. Além disso, nossa correlação moderada demonstra que essas 3 proteínas associadas as CTNs podem estar agindo em conjunto como reação à agressão do narguilé.

A expressão aumentada de SOX-2, OCT-4 e Nanog está correlacionada com a presença das CTNs, bem como com um pior prognóstico do CEO. Além disso, células duplamente positivas para OCT-4 e SOX-2 foram encontradas nas lesões potencialmente malignizáveis da mucosa oral (BAILLIE; TAN; ITINTEANG, 2017; CURTARELLI; GONÇALVES; DOS SANTOS *et al.*, 2018; ISLAM; QIAO; SMITH *et al.*, 2015; TSAI; HU; LEE *et al.*, 2014).

Também foi observado um aumento significativo da taxa de proliferação celular a partir do grupo de 60 dias, expresso pela proteína Ki-67, sendo a presença desse marcador associada à alterações displásicas em cavidade oral e uma classificação displásica mais grave. Apesar de não terem sido observadas displasias epiteliais, a expressão da proteína Ki-67 pode sugerir alteração na taxa de proliferação celular em resposta ao dano causado pelo narguilé (BIANCO; SCOTTI; VIEIRA *et al.*, 2015; KUROKAWA; MATSUMOTO; MURATA *et al.*, 2003).

Em pacientes usuários de narguilé, mesmo em um tecido histologicamente normal, foi observado a expressão de p53 (ZAID; AZAR-MAALOUF; BARAKAT *et al.*, 2018), fato confirmado em nosso estudo, principalmente a partir do grupo de 30 dias. Demonstrando que a composição da fumaça do narguilé altera a expressão dessa proteína que, mesmo que expressa isoladamente, está associada à carcinogênese e pior prognóstico, além de maior recorrência das lesões (YANG; DING; FU *et al.*, 2019).

Observou-se correlação fraca entre a expressão de p53 e Ki-67 em língua e a literatura demonstra que a expressão aumentada de ambas as proteínas está relacionada tanto à graduação displásica mais grave quanto ao pior prognóstico da lesão, e diversos estudos apontam-nas como potenciais marcadores de carcinogênese, especialmente quando apresentam expressão associada (GISSI; GABUSI; SERVIDIO *et al.*, 2015; HUMAYUN; PRASAD, 2011; KANNAN; CHANDRAN; PILLAI *et al.*, 1996; MONTEBUGNOLI; FELICETTI; GISSI *et al.*, 2008; SUWASINI; CHATTERJEE; PURKAIT *et al.*, 2019; YADAV; MALIK; BALANI *et al.*, 2019). Tal resultado indica que o uso do narguilé pode causar alterações nas vias de apoptose e proliferação celular, que posteriormente poderão estar associadas a alterações como doenças orais potencialmente malignizáveis e CEO. Esses resultados diferem de Oliveira Semenzati *et al* (2012), que, ao estudarem esses marcadores em animais expostos a fumaça de cigarro convencional, não observaram expressão de p53 mesmo após 60 dias de exposição, encontrando marcação apenas de Ki-67 (DE OLIVEIRA SEMENZATI; DE SOUZA

SALGADO; ROCHA *et al.*, 2012) indicando dessa forma que a fumaça de narguilé pode causar alterações na expressão de p53 antes que o cigarro convencional, sinalizando um dano mais severo.

Em nossos resultados houve a correlação entre a expressão de Nanog, OCT-4, SOX-2 e p53 em língua. Sabe-se que a OCT-4 exerce papel na manutenção da sobrevivência de CTNs, em parte inibindo a apoptose através da via OCT-4/TCL1/Akt1. Essa via está associada a via p21, que tem relação com a p53, explicando, dessa forma, a correlação observada nos resultados quando observa-se a p53 mutada (LIU; YU; LIU, 2013; MIRZA; GYSIN; MALEK *et al.*, 2004; SCHAEFER; STEINER; LENGGERKE, 2020). Também, pôde ser observado a associação do aumento da expressão de Nanog e p53 e, conforme resultados de Lee *et al.* (2015), a expressão aumentada de Nanog e a positividade de p53 mutante estão significativamente associadas a tumores em estágio clinicamente avançados, metástase de linfonodo cervical positiva, tumores de alto grau histológico e taxas de sobrevida global pobres em CEO. Dessa forma, a correlação moderada da expressão de ambos os marcadores pode ser associada a lesões mais avançadas demonstrando o dano causado pelo uso do narguilé nesse tecido (LEE; KANG; LEE *et al.*, 2015).

5.2 Traqueia

As células basais em traqueia e vias aéreas são usualmente quiescentes e se diferenciam em epitélio pseudoestratificado colunar ciliado. O uso do cigarro convencional desencadeia uma resposta hiperproliferativa resultando em alterações epiteliais potencialmente malignas progressivas que variam de metaplasia escamosa a displasia (KIM; VAN DE LAAR; CABANERO *et al.*, 2016). Nas amostras deste trabalho não se observou alterações displásicas, no entanto observou-se início de metaplasia com perda de cílios, hiperplasia epitelial e hiperkeratose focal, indicando que o uso do narguilé pode levar à alterações semelhantes às causadas pelo cigarro como também observado por Van den Berg *et al* (2007) e Shaideh *et al* (2011) (SHRAIDEH; NAJJAR, 2011a; VAN DEN BERG; VAN TINTEREN; VAN ZANDWIJK *et al.*, 2007). Todavia, deve ser ressaltado que alterações displásicas são raras em pacientes fumantes convencionais que evoluem para CEP, sendo a metaplasia uma característica importante para o diagnóstico precoce (VAN DEN BERG; VAN TINTEREN; VAN ZANDWIJK *et al.*, 2007).

Em traqueia, pôde ser observada a expressão de Nanog e OCT-4 com pico de expressão no grupo de 90 dias. Já a expressão de SOX-2 foi a única que permaneceu sem diferença estatística e com menor expressão ao longo do tempo. Isso pode ser explicado devido a função de cada um desses marcadores quando associados a células pluripotentes normais. OCT-4 e Nanog estão associadas ao controle de células extraembrionárias e também reprimem a diferenciação do ectoderma embrionário, mas tem pouco efeito em outras linhagens enquanto a SOX-2 tem relação com fator de transcrição de células-tronco embrionárias (LIU; YU; LIU, 2013; YUAN; KADARA; BEHRENS *et al.*, 2010). Enquanto a SOX-2 teve baixa expressão em traqueia, semelhante aos resultados de Kim *et al* (2016) que ressaltaram a possível diminuição do promotor SOX-2 durante a progressão de alterações no epitélio de traqueia (KIM; VAN DE LAAR; CABANERO *et al.*, 2016). Outro estudo também demonstrou que o aumento da SOX-2 em traqueia e pulmão demora um tempo maior, podendo levar até 34 semanas em camundongos (LU; FUTTNER; ROCK *et al.*, 2010).

Os resultados de expressão das proteínas associadas às CTNs em traqueia no grupo controle eram esperados, pois estudos anteriores também demonstraram que as vias aéreas de camundongos expressam tais marcadores de forma endógena (LING; KUO; LI *et al.*, 2006; LIU; YU; LIU, 2013). Outros estudos também demonstraram que um dano pontual em traqueia levaria ao aumento desses marcadores em 6 horas e com posterior decréscimo em 48h, diferindo de nossos estudos onde a agressão ocorreu de forma crônica e por longo período (SONG; JIA; JIA *et al.*, 2010; ZHOU; SONG; LI *et al.*, 2017).

Em traqueia, a expressão de OCT-4 se correlacionou com a expressão de Nanog e SOX-2 podendo indicar alterações incipientes no epitélio local, pois a sinalização desses marcadores de CTNs controla a transição epitélio-mesenquimal, regula a capacidade de iniciação do tumor e está associada a pior prognóstico (CHIOU; WANG; CHOU *et al.*, 2010; ZHAO; LIU; CHEN *et al.*, 2018).

A expressão de p53 em traqueia teve aumento gradual e foi estatisticamente significativa no grupo de 60 dias, concordando com a literatura, na medida que alterações histológicas em epitélio respiratório associadas à presença desse marcador podem ser um marcador inicial para o carcinoma epidermóide principalmente em uma população de risco (BOERS; TEN VELDE; THUNNISSEN, 1996; BREUER; SNIJDERS; SUTEDJA *et al.*, 2003). A expressão da proteína p53 indica alteração no ciclo celular e regulação de apoptose nesse tecido exposto à fumaça de narguilé e houve aumento da expressão conforme aumento

do tempo de exposição (com máximo no grupo de 60 dias) indicando piora no quadro. Além disso, já foi observado em outros estudos que hiperplasia epitelial em vias áreas e estágios iniciais de neoplasias já apresentam alteração na expressão dessa proteína (KITAMURA; KAMEDA; NAKAMURA *et al.*, 1995). Interessante ressaltar que a alteração causada pela fumaça de narguilé neste trabalho foi precoce quando comparado à exposição ao cigarro encontrado por Magnani *et al.* (2015), que realizou a exposição de cobaias ao cigarro convencional durante 260 dias e não observou a expressão de p53 em epitélio de traqueia, indicando uma alteração maior do tecido quando exposto a fumaça do narguilé em comparação com cigarro convencional (MAGNANI; CATANEO; DOMINGUES *et al.*, 2015).

A expressão do Ki-67 em traqueia foi detectada em maior intensidade que a expressão em língua, o que pode ser explicado pelo fato do epitélio de traqueia ser pseudoestratificado não queratinizado e, portanto, mais sensível a agressões do meio externo em comparação com o epitélio escamoso da língua (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; LEE; LIU; LEE *et al.*, 2001). A traqueia demonstrou um aumento na expressão dessa proteína a partir do grupo de 30 dias indicando um aumento da proliferação celular, sendo que essa resposta proliferativa está associada à hiperplasia epitelial como proteção a agressão (LEE; LIU; LEE; KURIE *et al.*, 2001). Estudos associam a presença desse aumento de expressão com o desenvolvimento de carcinomas em vias aéreas e, possivelmente, à aquisição de um fenótipo invasivo (CAVARGA; KOCAN; BOOR *et al.*, 2009; ISHIKURO; DOSAKA-AKITA; KATO *et al.*, 1997). Os resultados desta pesquisa são compatíveis com resultados observados em fumantes de cigarro convencional que também causa aumento da expressão dessa proteína em vias aéreas (LEE; LIU; LEE *et al.*, 2001; WAYNE; ROBINSON, 2006). A correlação de ambos os marcadores, como observado em nosso estudo, está associado a pior prognóstico e lesões com classificação de maior gravidade em vias aéreas (NGUYEN; MIREJOVSKÝ; MIREJOVSKÝ *et al.*, 2000; SOUSA; ESPÍRITO SANTO; SILVA *et al.*, 2011; ZHU; HU; FANG *et al.*, 2019).

5.3 Correlação de expressão das proteínas entre Língua e Traqueia

A expressão entre as proteínas associadas às CTNs e p53 foram semelhantes em língua e traqueia e esta correlação pode ser explicada pelo papel da p53 associada às CTNs. Em células tronco embrionária, o dano ao DNA é respondido pela ativação da p53 levando a uma alta

expressão da proteína p53. Em particular, duas sequências dentro da região do promotor Nanog são reguladas por p53. Lin e Lin (2017) mostraram que a ativação de p53 normal inibe o fator de transcrição Nanog, promovendo assim a diferenciação de células-tronco em resposta ao dano ao DNA inibindo a gênese tumoral (LIN; LIN, 2017). Dessa forma, como observado em nossos resultados tanto em língua quanto em traqueia, ocorreu uma expressão aumentada da proteína p53 mutada, esta apesar de estar presente e com sua expressão aumentada não consegue inibir a via do fator de transcrição de Nanog nem ativar apoptose, podendo dessa forma explicar a ativação de fatores como Nanog e outros associados como OCT-4 e SOX-2.

Em diversas regiões, tanto em língua quanto em traqueia, pôde ser observado uma intensa marcação de fundo incluindo acúmulo em papilas quando utilizou-se anticorpos para as CTNs, como Nanog, OCT-4 de SOX-2 e também marcador Ki-67. No entanto isso foi observado em diversos estudos prévios que demonstraram que esses marcadores podem estar presentes em tecidos em renovação de roedores (GALIGER; KOSTIN; GOLEC *et al.*, 2014; HISHA; TANAKA; UENO, 2016; JIANG; DU; CHEN, 2018; QIAO; HE; CAI *et al.*, 2014; TANAKA; KOMAI; TOKUYAMA *et al.*, 2013).

6 CONCLUSÃO

Neste estudo observou-se alterações tanto histológicas quanto imunoistoquímicas no tecido de língua e traqueia dos camundongos expostos a fumaça de narguilé.

Em língua, observou-se discretas alterações citológicas e arquiteturais sugestivas de alterações displásicas enquanto em traqueia pôde ser observado perda de epitélio, hiperplasia epitelial e discreta hiperqueratinização que indicam início de metaplasia. Esta alteração aumentou progressivamente conforme o aumento do tempo de exposição a fumaça do narguilé.

A expressão imunoistoquímica dos marcadores de CTNs, p53 e Ki-67 variou conforme o tempo de exposição. Em língua observou-se aumento da expressão dessas proteínas com ápice da expressão das proteínas de CTNs, p53 no grupo de 30 dias e de Ki-67 no grupo de 90 dias.

Em traqueia, Nanog apresentou sua maior expressão em 90 dias enquanto SOX-2 manteve-se com expressão sem diferença estatística entre os grupos atingindo a maior expressão em 15 dias. A expressão da proteína Ki-67 demonstrou maior marcação no grupo de

30 dias e a proteína p53 atingiu seu auge no grupo de 60 dias, indicando uma possível alteração nestas proteínas essenciais para manutenção do ciclo celular, proliferação celular e controle da apoptose.

Observou-se correlação moderada entre as proteínas p53 e Ki-67, sendo que de acordo com a literatura ambas estão associadas à um pior prognóstico e uma alteração histológica mais intensa. Também, constatou-se a correlação positiva entre as proteínas associadas as CTNs e p53 indicando uma relação entre a manifestação destas e alteração no ciclo celular.

Em vista das importantes alterações histológicas observadas em língua e traqueia e a expressão de proteínas nos tecidos analisados conclui-se que a fumaça de narguilé tem potencial carcinogênico e deve ser cada vez mais estudada *in vitro* e *in vivo*. Também se sugere a inserção dessa informação como ensino nas Universidades para o preparo de futuros profissionais de saúde e a orientação de pacientes. Observa-se também a necessidade urgente de políticas públicas e conscientização desse hábito como sendo de alto risco, para dessa forma termos prevenção do câncer de boca e em vias aéreas.

REFERÊNCIAS

- AKL, E. A.; GADDAM, S.; GUNUKULA, S. K.; HONEINE, R. *et al.* The effects of waterpipe tobacco smoking on health outcomes: a systematic review. **Int J Epidemiol**, 39, n. 3, p. 834-857, Jun 2010.
- AKRAM, Z.; AL-KHERAIF, A. A.; KELLESARIAN, S. V.; VOHRA, F. *et al.* Comparison of oral Candida carriage in waterpipe smokers, cigarette smokers, and non-smokers. **J Oral Sci**, 60, n. 1, p. 115-120, 2018.
- AL MUTAIRI, S. S.; SHIHAB-ELDEEN, A. A.; MOJIMINIYI, O. A.; ANWAR, A. A. Comparative analysis of the effects of hubble-bubble (Sheesha) and cigarette smoking on respiratory and metabolic parameters in hubble-bubble and cigarette smokers. **Respirology**, 11, n. 4, p. 449-455, Jul 2006.
- AL RASHIDI, M.; SHIHADDEH, A.; SALIBA, N. A. Volatile aldehydes in the mainstream smoke of the narghile waterpipe. **Food Chem Toxicol**, 46, n. 11, p. 3546-3549, Nov 2008.
- ALANAZI, N. H.; LEE, J. W.; DOS SANTOS, H.; JOB, J. S. *et al.* The use of planned behavior theory in predicting cigarette smoking among Waterpipe smokers. **Tob Induc Dis**, 15, p. 29, 2017.
- ALJARRAH, K.; ABABNEH, Z. Q.; AL-DELAIMY, W. K. Perceptions of hookah smoking harmfulness: predictors and characteristics among current hookah users. **Tob Induc Dis**, 5, n. 1, p. 16, Dec 2009.
- AMAYA, C. N.; BRYAN, B. A. Enrichment of the embryonic stem cell reprogramming factors Oct4, Nanog, Myc, and Sox2 in benign and malignant vascular tumors. **BMC Clin Pathol**, 15, p. 18, 2015.
- AMER, H. W.; WAGUIH, H. M.; EL-ROUBY, D. H. Development of field cancerization in the clinically normal oral mucosa of shisha smokers. **Int J Dent Hyg**, 17, n. 1, p. 39-45, Feb 2019.
- ASLAM, H. M.; SALEEM, S.; GERMAN, S.; QURESHI, W. A. Harmful effects of shisha: literature review. **Int Arch Med**, 7, p. 16, 2014.
- AZAB, M.; KHABOUR, O. F.; ALKARAKI, A. K.; EISSENBERG, T. *et al.* Water pipe tobacco smoking among university students in Jordan. **Nicotine Tob Res**, 12, n. 6, p. 606-612, Jun 2010.
- BAILLIE, R.; TAN, S. T.; ITINTEANG, T. Cancer Stem Cells in Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma: A Review. **Front Oncol**, 7, p. 112, 2017.
- BENTUR, L.; HELLOU, E.; GOLDBART, A.; PILLAR, G. *et al.* Laboratory and clinical acute effects of active and passive indoor group water-pipe (narghile) smoking. **Chest**, 145, n. 4, p. 803-809, Apr 2014.

BERTONI, N.; SZKLO, A.; BONI, R.; COUTINHO, C. *et al.* Electronic cigarettes and narghile users in Brazil: Do they differ from cigarettes smokers? **Addict Behav**, 98, p. 106007, Nov 2019.

BIANCO, B. C.; SCOTTI, F. M.; VIEIRA, D. S.; BIZ, M. T. *et al.* Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9, myofibroblasts and Ki-67 in actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma. **Int J Exp Pathol**, 96, n. 5, p. 311-318, Oct 2015.

BOERS, J. E.; TEN VELDE, G. P.; THUNNISSEN, F. B. P53 in squamous metaplasia: a marker for risk of respiratory tract carcinoma. **Am J Respir Crit Care Med**, 153, n. 1, p. 411-416, Jan 1996.

BREUER, R. H.; SNIJDERS, P. J.; SUTEDJA, T. G.; V D LINDEN, H. *et al.* Suprabasal p53 immunostaining in premalignant endobronchial lesions in combination with histology is associated with bronchial cancer. **Lung Cancer**, 40, n. 2, p. 165-172, May 2003.

CAI, J.; HE, B.; LI, X.; SUN, M. *et al.* Regulation of tumorigenesis in oral epithelial cells by defined reprogramming factors Oct4 and Sox2. **Oncol Rep**, 36, n. 2, p. 651-658, Aug 2016.

CAVARGA, I.; KOCAN, P.; BOOR, A.; BELAK, J. *et al.* Immunohistochemical markers of proliferation and vascularisation in preneoplastic bronchial lesions and invasive non-small cell lung cancer. **Neoplasma**, 56, n. 5, p. 414-421, 2009.

CHANG, B.; PARK, M. J.; CHOI, S. I.; IN, K. H. *et al.* NANOG as an adverse predictive marker in advanced non-small cell lung cancer treated with platinum-based chemotherapy. **Onco Targets Ther**, 10, p. 4625-4633, 2017.

CHEAH, P. L.; LOOI, L. M. p53: an overview of over two decades of study. **Malays J Pathol**, 23, n. 1, p. 9-16, Jun 2001.

CHEN, Z.; WANG, T.; CAI, L.; SU, C. *et al.* Clinicopathological significance of non-small cell lung cancer with high prevalence of Oct-4 tumor cells. **J Exp Clin Cancer Res**, 31, p. 10, Feb 2012.

CHENG, W.; WANG, H.; YUAN, J.; CHENG, Z. *et al.* The Prognostic Value of Nanog Overexpression in Lung Cancer: A Meta-Analysis. **Biomed Res Int**, 2018, p. 3429261, 2018.

CHIOU, S. H.; WANG, M. L.; CHOU, Y. T.; CHEN, C. J. *et al.* Coexpression of Oct4 and Nanog enhances malignancy in lung adenocarcinoma by inducing cancer stem cell-like properties and epithelial-mesenchymal transdifferentiation. **Cancer Res**, 70, n. 24, p. 10433-10444, Dec 2010.

CHIOU, S. H.; YU, C. C.; HUANG, C. Y.; LIN, S. C. *et al.* Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma. **Clin Cancer Res**, 14, n. 13, p. 4085-4095, Jul 2008.

COBB, C.; WARD, K. D.; MAZIAK, W.; SHIHADDEH, A. L. *et al.* Waterpipe tobacco smoking: an emerging health crisis in the United States. **Am J Health Behav**, 34, n. 3, p. 275-285, 2010 May-Jun 2010.

CORREIA, L. L.; JOHNSON, J. A.; MCERLEAN, P.; BAUER, J. *et al.* SOX2 Drives Bronchial Dysplasia in a Novel Organotypic Model of Early Human Squamous Lung Cancer. **Am J Respir Crit Care Med**, 195, n. 11, p. 1494-1508, 06 2017.

CURTARELLI, R. B.; GONÇALVES, J. M.; DOS SANTOS, L. G. P.; SAVI, M. G. *et al.* Expression of Cancer Stem Cell Biomarkers in Human Head and Neck Carcinomas: a Systematic Review. **Stem Cell Rev**, Aug 2018.

DE OLIVEIRA SEMENZATI, G.; DE SOUZA SALGADO, B.; ROCHA, N. S.; MICHELIN MATHEUS, S. M. *et al.* Histological and immunohistochemical study of the expression of p53 and ki-67 proteins in the mucosa of the tongue, pharynx and larynx of rats exposed to cigarette smoke. **Inhal Toxicol**, 24, n. 11, p. 723-731, Sep 2012.

DU, Y.; MA, C.; WANG, Z.; LIU, Z. *et al.* Nanog, a novel prognostic marker for lung cancer. **Surg Oncol**, 22, n. 4, p. 224-229, Dec 2013.

EISSENBERG, T.; SHIHADDEH, A. Waterpipe tobacco and cigarette smoking: direct comparison of toxicant exposure. **Am J Prev Med**, 37, n. 6, p. 518-523, Dec 2009.

EL-SETOUHY, M.; LOFFREDO, C. A.; RADWAN, G.; ABDEL RAHMAN, R. *et al.* Genotoxic effects of waterpipe smoking on the buccal mucosa cells. **Mutat Res**, 655, n. 1-2, p. 36-40, 2008 Aug-Sep 2008.

EL-ZAATARI, Z. M.; CHAMI, H. A.; ZAATARI, G. S. Health effects associated with waterpipe smoking. **Tob Control**, 24 Suppl 1, p. i31-i43, Mar 2015.

EMBALÓ, B.; MIGUEL, A. F. P.; KONRATH, A. C.; MODOLO, F. *et al.* Evaluation of two classification systems for oral epithelial dysplasia. **Oral Dis**, Apr 2021.

EMBALÓ, B.; PARIZE, H. N.; RIVERO, E. R. C. Evaluation of cell proliferation in cystic lesions associated with impacted third molars. **Microsc Res Tech**, 81, n. 11, p. 1241-1245, Nov 2018.

FERONE, G.; SONG, J. Y.; SUTHERLAND, K. D.; BHASKARAN, R. *et al.* SOX2 Is the Determining Oncogenic Switch in Promoting Lung Squamous Cell Carcinoma from Different Cells of Origin. **Cancer Cell**, 30, n. 4, p. 519-532, 10 2016.

FLAUSINO, C.; HOFFMEISTER, G.; PILATI, P.; MODOLO, F. *et al.* A New Adapted Machine to Simulate Narghile Smoke. *Journal of Cytology & Tissue Biology*. 7 2020.

FLAUSINO, C. S.; HOFFMEISTER, G. F. **EFEITOS DA FUMAÇA DO NARGUILÉ EM LÍNGUA, TRAQUEIA E PULMÃO DE CAMUDONGO BALB/C: um estudo preliminar.** Itajaí, Univali: 61 p. 2017.

FOLESCU, R.; LEVAI, C. M.; GRIGORAŞ, M. L.; ARGHIRESCU, T. S. *et al.* Expression and significance of Ki-67 in lung cancer. *Rom J Morphol Embryol*, 59, n. 1, p. 227-233, 2018.

FU, T. Y.; HSIEH, I. C.; CHENG, J. T.; TSAI, M. H. *et al.* Association of OCT4, SOX2, and NANOG expression with oral squamous cell carcinoma progression. *J Oral Pathol Med*, 45, n. 2, p. 89-95, Feb 2016.

GALIGER, C.; KOSTIN, S.; GOLEC, A.; AHLBRECHT, K. *et al.* Phenotypical and ultrastructural features of Oct4-positive cells in the adult mouse lung. *J Cell Mol Med*, 18, n. 7, p. 1321-1333, Jul 2014.

GARCIA MARTINS, R. H.; MARQUES MADEIRA, S. L.; FABRO, A. T.; ROCHA, N. E. S. *et al.* Effects to exposure of tobacco smoke and alcohol on the tongue and pharynx of rats. *Inhal Toxicol*, 24, n. 3, p. 153-160, Feb 2012.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em Cores.** 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

GAWLIK-RZEMIENIEWSKA, N.; BEDNAREK, I. The role of NANOG transcriptional factor in the development of malignant phenotype of cancer cells. *Cancer Biol Ther*, 17, n. 1, p. 1-10, 2016.

GE, N.; LIN, H. X.; XIAO, X. S.; GUO, L. *et al.* Prognostic significance of Oct4 and Sox2 expression in hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *J Transl Med*, 8, p. 94, Oct 2010.

GHOSH, A.; STEWART, D.; MATLASHEWSKI, G. Regulation of human p53 activity and cell localization by alternative splicing. *Mol Cell Biol*, 24, n. 18, p. 7987-7997, Sep 2004.

GIROD, S. C.; KRÄMER, C.; KNÜFERMANN, R.; KRUEGER, G. R. p53 expression in the carcinogenesis in the oral mucosa. *J Cell Biochem*, 56, n. 4, p. 444-448, Dec 1994.

GISSI, D. B.; GABUSI, A.; SERVIDIO, D.; CERVELLATI, F. *et al.* Predictive Role of p53 Protein as a Single Marker or Associated with ki67 Antigen in Oral Leukoplakia: A Retrospective Longitudinal Study. *Open Dent J*, 9, p. 41-45, 2015.

GRENDDEL, T.; SOKOLSKÝ, J.; VAŠČÁKOVÁ, A.; HUDÁK, V. *et al.* Early stages of trachea healing process: (immuno/lectin) histochemical monitoring of selected markers and adhesion/growth-regulatory endogenous lectins. **Folia Biol (Praha)**, 58, n. 4, p. 135-143, 2012.

HABU, N.; IMANISHI, Y.; KAMEYAMA, K.; SHIMODA, M. *et al.* Expression of Oct3/4 and Nanog in the head and neck squamous carcinoma cells and its clinical implications for delayed neck metastasis in stage I/II oral tongue squamous cell carcinoma. **BMC Cancer**, 15, p. 730, Oct 2015.

HAKIM, F.; HELLOU, E.; GOLDBART, A.; KATZ, R. *et al.* The acute effects of water-pipe smoking on the cardiorespiratory system. **Chest**, 139, n. 4, p. 775-781, Apr 2011.

HARPOLE, D. H.; HERNDON, J. E.; WOLFE, W. G.; IGLEHART, J. D. *et al.* A prognostic model of recurrence and death in stage I non-small cell lung cancer utilizing presentation, histopathology, and oncoprotein expression. **Cancer Res**, 55, n. 1, p. 51-56, Jan 1995.

HE, J.; XIONG, L.; LI, Q.; LIN, L. *et al.* 3D modeling of cancer stem cell niche. **Oncotarget**, 9, n. 1, p. 1326-1345, Jan 2018.

HISHA, H.; TANAKA, T.; UENO, H. Lingual Epithelial Stem Cells and Organoid Culture of Them. **Int J Mol Sci**, 17, n. 2, Jan 2016.

HUMAYUN, S.; PRASAD, V. R. Expression of p53 protein and ki-67 antigen in oral premalignant lesions and oral squamous cell carcinomas: An immunohistochemical study. **Natl J Maxillofac Surg**, 2, n. 1, p. 38-46, Jan 2011.

ISHIKURO, A.; DOSAKA-AKITA, H.; KATO, M.; FUJINO, M. *et al.* Ki-67 labeling indices in non-small cell lung cancer: comparison between image cytometry and flow cytometry. **Cytometry**, 30, n. 4, p. 186-191, Aug 1997.

ISLAM, F.; QIAO, B.; SMITH, R. A.; GOPALAN, V. *et al.* Cancer stem cell: fundamental experimental pathological concepts and updates. **Exp Mol Pathol**, 98, n. 2, p. 184-191, Apr 2015.

JACKSON, D.; AVEYARD, P. Waterpipe smoking in students: prevalence, risk factors, symptoms of addiction, and smoke intake. Evidence from one British university. **BMC Public Health**, 8, p. 174, May 2008.

JAVED, F.; ALHARTHI, S. S.; BINSHABAIB, M. S.; GAJENDRA, S. *et al.* Toxicological impact of waterpipe smoking and flavorings in the oral cavity and respiratory system. **Inhal Toxicol**, 29, n. 9, p. 389-396, 08 2017.

JAWAD, M.; MCEWEN, A.; MCNEILL, A.; SHAHAB, L. To what extent should waterpipe tobacco smoking become a public health priority? **Addiction**, 108, n. 11, p. 1873-1884, Nov 2013.

JIANG, Y.; DU, Z.; CHEN, L. Histological study of postnatal development of mouse tongues. **Exp Ther Med**, 15, n. 1, p. 383-386, Jan 2018.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 524 p.

KANNAN, S.; CHANDRAN, G. J.; PILLAI, K. R.; MATHEW, B. *et al.* Expression of p53 in leukoplakia and squamous cell carcinoma of the oral mucosa: correlation with expression of Ki67. **Clin Mol Pathol**, 49, n. 3, p. M170-175, Jun 1996.

KARACHALIOU, N.; ROSELL, R.; VITERI, S. The role of SOX2 in small cell lung cancer, lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. **Transl Lung Cancer Res**, 2, n. 3, p. 172-179, Jun 2013.

KATURJI, M.; DAHER, N.; SHEHEITLI, H.; SALEH, R. *et al.* Direct measurement of toxicants inhaled by water pipe users in the natural environment using a real-time in situ sampling technique. **Inhal Toxicol**, 22, n. 13, p. 1101-1109, Nov 2010.

KAUFHOLD, S.; GARBÁN, H.; BONAVIDA, B. Yin Yang 1 is associated with cancer stem cell transcription factors (SOX2, OCT4, BMI1) and clinical implication. **J Exp Clin Cancer Res**, 35, p. 84, May 2016.

KHABOUR, O. F.; ALZOUBI, K. H.; BANI-AHMAD, M.; DODIN, A. *et al.* Acute exposure to waterpipe tobacco smoke induces changes in the oxidative and inflammatory markers in mouse lung. **Inhal Toxicol**, 24, n. 10, p. 667-675, Aug 2012.

KIM, B. R.; VAN DE LAAR, E.; CABANERO, M.; TARUMI, S. *et al.* SOX2 and PI3K Cooperate to Induce and Stabilize a Squamous-Committed Stem Cell Injury State during Lung Squamous Cell Carcinoma Pathogenesis. **PLoS Biol**, 14, n. 11, p. e1002581, Nov 2016.

KITAHARA, A. B. P.; MICHELS, A. C.; LUIZ, S. T.; NAGASHIMA, S. *et al.* Immunohistochemical detection of NANOG in oral leukoplakia. **Oral Dis**, Apr 2021.

KITAMURA, H.; KAMEDA, Y.; NAKAMURA, N.; NAKATANI, Y. *et al.* Proliferative potential and p53 overexpression in precursor and early stage lesions of bronchioloalveolar lung carcinoma. **Am J Pathol**, 146, n. 4, p. 876-887, Apr 1995.

KNISHKOWY, B.; AMITAI, Y. Water-pipe (narghile) smoking: an emerging health risk behavior. **Pediatrics**, 116, n. 1, p. e113-119, Jul 2005.

KUROKAWA, H.; MATSUMOTO, S.; MURATA, T.; YAMASHITA, Y. *et al.* Immunohistochemical study of syndecan-1 down-regulation and the expression of p53 protein or Ki-67 antigen in oral leukoplakia with or without epithelial dysplasia. **J Oral Pathol Med**, 32, n. 9, p. 513-521, Oct 2003.

LEE, H. J.; KANG, Y. H.; LEE, J. S.; BYUN, J. H. *et al.* Positive expression of NANOG, mutant p53, and CD44 is directly associated with clinicopathological features and poor prognosis of oral squamous cell carcinoma. **BMC Oral Health**, 15, n. 1, p. 153, Dec 2015.

LEE, J. J.; LIU, D.; LEE, J. S.; KURIE, J. M. *et al.* Long-term impact of smoking on lung epithelial proliferation in current and former smokers. **J Natl Cancer Inst**, 93, n. 14, p. 1081-1088, Jul 2001.

LI, F.; NIU, B. W.; ZHU, M. M. Ablation of NTPDase2+ cells inhibits the formation of filiform papillae in tongue tip. **Animal Model Exp Med**, 1, n. 2, p. 143-151, Jun 2018.

LI, L.; YU, H.; WANG, X.; ZENG, J. *et al.* Expression of seven stem-cell-associated markers in human airway biopsy specimens obtained via fiberoptic bronchoscopy. **J Exp Clin Cancer Res**, 32, p. 28, May 2013.

LI, L. T.; JIANG, G.; CHEN, Q.; ZHENG, J. N. Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review). **Mol Med Rep**, 11, n. 3, p. 1566-1572, Mar 2015.

LI, X.; WANG, J.; XU, Z.; AHMAD, A. *et al.* Expression of Sox2 and Oct4 and their clinical significance in human non-small-cell lung cancer. **Int J Mol Sci**, 13, n. 6, p. 7663-7675, 2012.

LIN, T.; LIN, Y. p53 switches off pluripotency on differentiation. **Stem Cell Res Ther**, 8, n. 1, p. 44, 02 2017.

LING, T. Y.; KUO, M. D.; LI, C. L.; YU, A. L. *et al.* Identification of pulmonary Oct-4+ stem/progenitor cells and demonstration of their susceptibility to SARS coronavirus (SARS-CoV) infection in vitro. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 103, n. 25, p. 9530-9535, Jun 2006.

LIPKUS, I. M.; MAYS, D. Comparing harm beliefs and risk perceptions among young adult waterpipe tobacco smokers and nonsmokers: Implications for cessation and prevention. **Addict Behav Rep**, 7, p. 103-110, Jun 2018.

LIU, A.; YU, X.; LIU, S. Pluripotency transcription factors and cancer stem cells: small genes make a big difference. **Chin J Cancer**, 32, n. 9, p. 483-487, Sep 2013.

LIU, K.; LIN, B.; ZHAO, M.; YANG, X. *et al.* The multiple roles for Sox2 in stem cell maintenance and tumorigenesis. **Cell Signal**, 25, n. 5, p. 1264-1271, May 2013.

LOH, Y. H.; WU, Q.; CHEW, J. L.; VEGA, V. B. *et al.* The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. **Nat Genet**, 38, n. 4, p. 431-440, Apr 2006.

LU, Y.; FUTTNER, C.; ROCK, J. R.; XU, X. *et al.* Evidence that SOX2 overexpression is oncogenic in the lung. **PLoS One**, 5, n. 6, p. e11022, Jun 2010.

LUIZ, S. T.; MODOLO, F.; MOZZER, I.; DOS SANTOS, E. C. *et al.* Immunoexpression of SOX-2 in oral leukoplakia. **Oral Dis**, 24, n. 8, p. 1449-1457, Nov 2018.

LUO, W.; LI, S.; PENG, B.; YE, Y. *et al.* Embryonic stem cells markers SOX2, OCT4 and Nanog expression and their correlations with epithelial-mesenchymal transition in nasopharyngeal carcinoma. **PLoS One**, 8, n. 2, p. e56324, 2013.

MAGNANI, K. L.; CATANEO, D. C.; DOMINGUES, M. A.; HASIMOTO, E. N. *et al.* Respiratory immunohistochemical study in rats exposed to cigarette smoke and alcohol. **Acta Cir Bras**, 30, n. 3, p. 178-185, Mar 2015.

MAMTANI, R.; CHEEMA, S.; SHEIKH, J.; AL MULLA, A. *et al.* Cancer risk in waterpipe smokers: a meta-analysis. **Int J Public Health**, 62, n. 1, p. 73-83, Jan 2017.

MAZIAK, W. The waterpipe: a new way of hooking youth on tobacco. **Am J Addict**, 23, n. 2, p. 103-107, 2014 Mar-Apr 2014.

MINAKER, L. M.; SHUH, A.; BURKHALTER, R. J.; MANSKE, S. R. Hookah use prevalence, predictors, and perceptions among Canadian youth: findings from the 2012/2013 Youth Smoking Survey. **Cancer Causes Control**, 26, n. 6, p. 831-838, Jun 2015.

MIRSADRAEE, M.; KHAKZAD, M. R.; AHMADZADEH, M.; SHAYESTEH, V. *et al.* Acute Effect of Water Pipe Smoke on

Sensitized Animals. **Tanaffos**, 9, p. 39-47, 2010a.

MIRSADRAEE, M.; KHAKZAD, M. R.; AHMADZADEH, M.; SHAYESTEH, V. *et al.* Acute Effect of Water Pipe Smoke on

Sensitized Animals. 9: 39-47 p. 2010b.

MIRZA, A. M.; GYSIN, S.; MALEK, N.; NAKAYAMA, K. *et al.* Cooperative regulation of the cell division cycle by the protein kinases RAF and AKT. **Mol Cell Biol**, 24, n. 24, p. 10868-10881, Dec 2004.

MOHAMMAD, Y.; KAKAH, M. Chronic respiratory effect of narguileh smoking compared with cigarette smoking in women from the East Mediterranean region. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis**, 3, n. 3, p. 405-414, 2008.

MOHARIL, R. B.; DIVE, A.; KHANDEKAR, S.; BODHADE, A. Cancer stem cells: An insight. **J Oral Maxillofac Pathol**, 21, n. 3, p. 463, 2017 Sep-Dec 2017.

MONTEBUGNOLI, L.; FELICETTI, L.; GISSI, D. B.; CERVELLATI, F. *et al.* Predictive Role of p53 Protein as a Single Marker or Associated to Ki67 Antigen in Oral Carcinogenesis. **Open Dent J**, 2, p. 24-29, 2008.

NADERI, N. J.; PASHA, M. P. Comparison of Cytotoxic Effect of Cigarette and Waterpipe Smoking on Human Buccal Mucosa. **Int J Prev Med**, 8, p. 98, 2017.

NAKKASH, R. T.; KHALIL, J.; AFIFI, R. A. The rise in narghile (shisha, hookah) waterpipe tobacco smoking: a qualitative study of perceptions of smokers and non smokers. **BMC Public Health**, 11, p. 315, May 2011.

NEERGAARD, J.; SINGH, P.; JOB, J.; MONTGOMERY, S. Waterpipe smoking and nicotine exposure: a review of the current evidence. **Nicotine Tob Res**, 9, n. 10, p. 987-994, Oct 2007.

NEMMAR, A.; AL HEMEIRI, A.; AL HAMMADI, N.; YUVARAJU, P. *et al.* Early pulmonary events of nose-only water pipe (shisha) smoking exposure in mice. **Physiol Rep**, 3, n. 3, Mar 2015.

NESKEY, D. M.; OSMAN, A. A.; OW, T. J.; KATSONIS, P. *et al.* Evolutionary Action Score of TP53 Identifies High-Risk Mutations Associated with Decreased Survival and Increased Distant Metastases in Head and Neck Cancer. **Cancer Res**, 75, n. 7, p. 1527-1536, Apr 2015.

NGUYEN, V. N.; MIREJOVSKÝ, P.; MIREJOVSKÝ, T.; MELÍNOVÁ, L. *et al.* Expression of cyclin D1, Ki-67 and PCNA in non-small cell lung cancer: prognostic significance and comparison with p53 and bcl-2. **Acta Histochem**, 102, n. 3, p. 323-338, Aug 2000.

NIKITAKIS, N. G.; RASSIDAKIS, G. Z.; TASOULAS, J.; GKOUVERIS, I. *et al.* Alterations in the expression of DNA damage response-related molecules in potentially preneoplastic oral epithelial lesions. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, 125, n. 6, p. 637-649, 06 2018.

PONTICIELLO, A.; BARRA, E.; GIANI, U.; BOCCHINO, M. *et al.* P53 immunohistochemistry can identify bronchial dysplastic lesions proceeding to lung cancer: a prospective study. **Eur Respir J**, 15, n. 3, p. 547-552, Mar 2000.

PRIMACK, B. A.; FERTMAN, C. I.; RICE, K. R.; ADACHI-MEJIA, A. M. *et al.* Waterpipe and cigarette smoking among college athletes in the United States. **J Adolesc Health**, 46, n. 1, p. 45-51, Jan 2010.

PRIMACK, B. A.; SHENSA, A.; KIM, K. H.; CARROLL, M. V. *et al.* Waterpipe smoking among U.S. university students. **Nicotine Tob Res**, 15, n. 1, p. 29-35, Jan 2013.

PRIMACK, B. A.; WALSH, M.; BRYCE, C.; EISSENBERG, T. Water-pipe tobacco smoking among middle and high school students in Arizona. **Pediatrics**, 123, n. 2, p. e282-288, Feb 2009.

QIAO, B.; HE, B.; CAI, J.; YANG, W. The expression profile of Oct4 and Sox2 in the carcinogenesis of oral mucosa. **Int J Clin Exp Pathol**, 7, n. 1, p. 28-37, 2014.

QUE, J.; LUO, X.; SCHWARTZ, R. J.; HOGAN, B. L. Multiple roles for Sox2 in the developing and adult mouse trachea. **Development**, 136, n. 11, p. 1899-1907, Jun 2009.

RAM, R.; BRASCH, H. D.; DUNNE, J. C.; DAVIS, P. F. *et al.* The Identification of Three Cancer Stem Cell Subpopulations within Moderately Differentiated Lip Squamous Cell Carcinoma. **Front Surg**, 4, p. 12, 2017.

RASTAM, S.; EISSENBERG, T.; IBRAHIM, I.; WARD, K. D. *et al.* Comparative analysis of waterpipe and cigarette suppression of abstinence and craving symptoms. **Addict Behav**, 36, n. 5, p. 555-559, May 2011.

REN, Z. H.; ZHANG, C. P.; JI, T. Expression of SOX2 in oral squamous cell carcinoma and the association with lymph node metastasis. **Oncol Lett**, 11, n. 3, p. 1973-1979, Mar 2016.

RIZZINO, A. Sox2 and Oct-3/4: a versatile pair of master regulators that orchestrate the self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. **Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med**, 1, n. 2, p. 228-236, 2009 Sep-Oct 2009.

RIZZINO, A. Concise review: The Sox2-Oct4 connection: critical players in a much larger interdependent network integrated at multiple levels. **Stem Cells**, 31, n. 6, p. 1033-1039, Jun 2013.

ROCK, J. R.; RANDELL, S. H.; HOGAN, B. L. Airway basal stem cells: a perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling. **Dis Model Mech**, 3, n. 9-10, p. 545-556, 2010 Sep-Oct 2010.

RODDA, D. J.; CHEW, J. L.; LIM, L. H.; LOH, Y. H. *et al.* Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. **J Biol Chem**, 280, n. 26, p. 24731-24737, Jul 2005.

RODRIGUES, M. F. S. D.; XAVIER, F. C. A.; ANDRADE, N. P.; LOPES, C. *et al.* Prognostic implications of CD44, NANOG, OCT4, and BMI1 expression in tongue squamous cell carcinoma. **Head Neck**, 40, n. 8, p. 1759-1773, Aug 2018.

SABAPATHY, K.; LANE, D. P. Understanding p53 functions through p53 antibodies. **J Mol Cell Biol**, Feb 2019.

SAINI, H.; HAKEEM, I.; MUKHERJEE, S.; CHOWDHURY, S. *et al.* Autophagy Regulated by Gain of Function Mutant p53 Enhances Proteasomal Inhibitor-Mediated Cell Death through Induction of ROS and ERK in Lung Cancer Cells. **J Oncol**, 2019, p. 6164807, 2019.

SAUNDERS, A.; FAIOLA, F.; WANG, J. Concise review: pursuing self-renewal and pluripotency with the stem cell factor Nanog. **Stem Cells**, 31, n. 7, p. 1227-1236, Jul 2013.

SCHAEFER, T.; STEINER, R.; LENGKERKE, C. SOX2 and p53 Expression Control Converges in PI3K/AKT Signaling with Versatile Implications for Stemness and Cancer. **Int J Mol Sci**, 21, n. 14, Jul 2020.

SCOTTI, F. M.; MITT, V. C.; VIEIRA, D. S.; BIZ, M. T. *et al.* Expression of stem cell markers Nanog and Nestin in lip squamous cell carcinoma and actinic cheilitis. **Oral Dis**, 24, n. 7, p. 1209-1216, Oct 2018.

SHIHADDEH, A.; AZAR, S.; ANTONIOS, C.; HADDAD, A. Towards a topographical model of narghile water-pipe café smoking: a pilot study in a high socioeconomic status neighborhood of Beirut, Lebanon. **Pharmacol Biochem Behav**, 79, n. 1, p. 75-82, Sep 2004.

SHIHADDEH, A.; SALEH, R. Polycyclic aromatic hydrocarbons, carbon monoxide, "tar", and nicotine in the mainstream smoke aerosol of the narghile water pipe. **Food Chem Toxicol**, 43, n. 5, p. 655-661, May 2005.

SHRAIDEH, Z. A.; NAJJAR, H. N. Histological Changes in Tissues of Trachea and Lung Alveoli of Albino Rats Exposed to the Smoke of Two Types of Narghile Tobacco Products. **Jordan Journal of Biological Sciences**, 4, n. 4, p. 219-224, 2011a.

SHRAIDEH, Z. A.; NAJJAR, H. N. Histological Changes in Tissues of Trachea and Lung Alveoli of Albino Rats Exposed to the Smoke of Two Types of Narghile Tobacco Products. **Jordan j biolsci**. 4: 219-224 p. 2011b.

SMALLEY, M.; ASHWORTH, A. Stem cells and breast cancer: A field in transit. **Nat Rev Cancer**, 3, n. 11, p. 832-844, Nov 2003.

SMITH-SIMONE, S.; MAZIAK, W.; WARD, K. D.; EISSENBERG, T. Waterpipe tobacco smoking: knowledge, attitudes, beliefs, and behavior in two U.S. samples. **Nicotine Tob Res**, 10, n. 2, p. 393-398, Feb 2008.

SODJA, E.; RIJAVEC, M.; KOREN, A.; SADIKOV, A. *et al.* The prognostic value of whole blood SOX2, NANOG and OCT4 mRNA expression in advanced small-cell lung cancer. **Radiol Oncol**, 50, n. 2, p. 188-196, Jun 2016.

SONG, N.; JIA, X. S.; JIA, L. L.; MA, X. B. *et al.* Expression and role of Oct3/4, Nanog and Sox2 in regeneration of rat tracheal epithelium. **Cell Prolif**, 43, n. 1, p. 49-55, Feb 2010.

SOUSA, V.; ESPÍRITO SANTO, J.; SILVA, M.; CABRAL, T. *et al.* EGFR/erB-1, HER2/erB-2, CK7, LP34, Ki67 and P53 expression in preneoplastic lesions of bronchial epithelium: an immunohistochemical and genetic study. **Virchows Arch**, 458, n. 5, p. 571-581, May 2011.

STRULOVICI-BAREL, Y.; SHAYKHIEV, R.; SALIT, J.; DEEB, R. S. *et al.* Pulmonary Abnormalities in Young, Light-Use Waterpipe (Hookah) Smokers. **Am J Respir Crit Care Med**, 194, n. 5, p. 587-595, 09 2016.

SUWASINI, S.; CHATTERJEE, K.; PURKAIT, S. K.; S AMADDAR, D. *et al.* Expression of P53 Protein and Ki-67 Antigen in Oral Leukoplakia with Different Histopathological Grades of Epithelial Dysplasia. **Journal of international Society of preventive and Community dentistry**, 8, n. 6, 2019.

TANAKA, T.; KOMAI, Y.; TOKUYAMA, Y.; YANAI, H. *et al.* Identification of stem cells that maintain and regenerate lingual keratinized epithelial cells. **Nat Cell Biol**, 15, n. 5, p. 511-518, May 2013.

TENG, Z.; CHEN, W.; YANG, D.; ZHANG, Z. *et al.* Expression of p53 in ground-glass nodule of lung cancer and non-lung cancer patients. **Oncol Lett**, 17, n. 2, p. 1559-1564, Feb 2019.

TOMPKINS, D. H.; BESNARD, V.; LANGE, A. W.; KEISER, A. R. *et al.* Sox2 activates cell proliferation and differentiation in the respiratory epithelium. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 45, n. 1, p. 101-110, Jul 2011.

TORRES-RENDON, A.; ROY, S.; CRAIG, G. T.; SPEIGHT, P. M. Expression of Mcm2, geminin and Ki67 in normal oral mucosa, oral epithelial dysplasias and their corresponding squamous-cell carcinomas. **Br J Cancer**, 100, n. 7, p. 1128-1134, Apr 2009.

TSAI, L. L.; HU, F. W.; LEE, S. S.; YU, C. H. *et al.* Oct4 mediates tumor initiating properties in oral squamous cell carcinomas through the regulation of epithelial-mesenchymal transition. **PLoS One**, 9, n. 1, p. e87207, 2014.

VALACH, J.; FOLTÁN, R.; VLK, M.; SZABO, P. *et al.* Phenotypic characterization of oral mucosa: what is normal? **J Oral Pathol Med**, 46, n. 9, p. 834-839, Oct 2017.

VAN DEN BERG, R. M.; VAN TINTEREN, H.; VAN ZANDWIJK, N.; VISSER, C. *et al.* The influence of fluticasone inhalation on markers of carcinogenesis in bronchial epithelium. **Am J Respir Crit Care Med**, 175, n. 10, p. 1061-1065, May 2007.

VAN SCHAIJK, B.; DAVIS, P. F.; WICKREMESEKERA, A. C.; TAN, S. T. *et al.* Subcellular localisation of the stem cell markers OCT4, SOX2, NANOG, KLF4 and c-MYC in cancer: a review. **J Clin Pathol**, 71, n. 1, p. 88-91, Jan 2018.

VERMEULEN, L.; SOUSA E MELO, F.; DICK, R.; MEDEMA, J. P. The developing cancer stem-cell model: clinical challenges and opportunities. *The Lancet Oncology*. 13: 83-89 p. 2012.

VIEGAS, C. A. D. A. Formas não habituais de uso do tabaco. **J Bras Pneumol**, v.34, p. 1069-1073.

WALTERS, M. S.; SALIT, J.; JU, J. H.; STAUDT, M. R. *et al.* Waterpipe smoking induces epigenetic changes in the small airway epithelium. **PLoS One**, 12, n. 3, p. e0171112, 2017.

WANG, M. L.; CHIOU, S. H.; WU, C. W. Targeting cancer stem cells: emerging role of Nanog transcription factor. **Onco Targets Ther**, 6, p. 1207-1220, Sep 2013.

WAYNE, S.; ROBINSON, R. A. Upper aerodigestive tract squamous dysplasia: correlation with p16, p53, pRb, and Ki-67 expression. **Arch Pathol Lab Med**, 130, n. 9, p. 1309-1314, Sep 2006.

YADAV, P.; MALIK, R.; BALANI, S.; NIGAM, R. K. *et al.* Expression of p-16, Ki-67 and p-53 markers in dysplastic and malignant lesions of the oral cavity and oropharynx. **J Oral Maxillofac Pathol**, 23, n. 2, p. 224-230, 2019 May-Aug 2019.

YANG, X. H.; DING, L.; FU, Y.; CHEN, S. *et al.* p53-positive expression in dysplastic surgical margins is a predictor of tumor recurrence in patients with early oral squamous cell carcinoma. **Cancer Manag Res**, 11, p. 1465-1472, 2019.

YU, H. H.; FEATHERSTON, T.; TAN, S. T.; CHIBNALL, A. M. *et al.* Characterization of Cancer Stem Cells in Moderately Differentiated Buccal Mucosal Squamous Cell Carcinoma. **Front Surg**, 3, p. 46, 2016.

YUAN, P.; KADARA, H.; BEHRENS, C.; TANG, X. *et al.* Sex determining region Y-Box 2 (SOX2) is a potential cell-lineage gene highly expressed in the pathogenesis of squamous cell carcinomas of the lung. **PLoS One**, 5, n. 2, p. e9112, Feb 2010.

Zaid, K.; Azar-Maalouf, E.; Barakat, C.; Chantiri, M. p53 Overexpression in Oral Mucosa in Relation to Shisha Smoking in Syria and Lebanon. **Asian Pac J Cancer Prev**, 19, n. 7, p. 1879-1882, Jul 2018.

Zhao, L.; Liu, J.; Chen, S.; Fang, C. *et al.* Prognostic significance of NANOG expression in solid tumors: a meta-analysis. **Onco Targets Ther**, 11, p. 5515-5526, 2018.

Zhou, X.; Huang, G. R.; Hu, P. Over-expression of Oct4 in human esophageal squamous cell carcinoma. **Mol Cells**, 32, n. 1, p. 39-45, Jul 2011.

Zhou, Y.; Song, N.; Li, X.; Han, Y. *et al.* Changes in the methylation status of the Oct3/4, Nanog, and Sox2 promoters in stem cells during regeneration of rat tracheal epithelium after injury. **Oncotarget**, 8, n. 2, p. 2984-2994, Jan 2017.

Zhu, W. Y.; Hu, X. F.; Fang, K. X.; Kong, Q. Q. *et al.* Prognostic value of mutant p53, Ki-67, and TTF-1 and their correlation with EGFR mutation in patients with non-small cell lung cancer. **Histol Histopathol**, 34, n. 11, p. 1269-1278, Nov 2019.

ANEXO A – Parecer da Comissão de ética de animais



PARECER COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UNIVALI

Protocolo: 063/17	Data: 01/12/2017
Título: Alterações em boca, traqueia e pulmão de camundongos expostos a fumaça do narguilé	
Coordenador do Projeto: Sarah Freygang Mendes Pilati	
Executores: Mayara de Arruda Tomaz, Morgana de Souza, Fernando Galli, Laura Sagaz	
Colaboradores: David R. Tames, Maria de Lourdes Correa, Claudia Fernanda da Silva, Filipe Modolo Siqueira,	
<p>Objetivos</p> <p>Objetivos Geral: Determinar os efeitos e as alterações celulares na cavidade oral, traqueia e pulmão de roedores, decorrentes do emprego da fumaça produzida pelo narguilé.</p> <p>Objetivos Específicos: Avaliar as características clínicas e histológicas de roedores submetidos à fumaça do narguilé durante um período de 7, 15, 30, 60 e 90 dias, identificando, após o período de exposição, alterações presentes na cavidade oral, traqueia e pulmão, bem como, reunir histopatológicos para estabelecer uma comparação entre os tecidos saudáveis e expostos à fumaça. Também realizar análise de presença de proteínas associadas a inflamação, proliferação celular e carcinogênese através de imunohistoquímica.</p>	

I. RESUMO:

II. ANÁLISE:

- Data de início e término: 03/2018 – 06/2018, adequadas;
- Qualificação da equipe e treinamento: Pesquisador responsável e colaboradores possuem experiência nos procedimentos a serem aplicados, executores necessitam de treinamento (Previamente ao início do projeto o aluno será treinado pela orientadora e co-orientador);
- Justificativa do projeto: adequada;
- Detalhamento dos procedimentos experimentais: **descritos, porém solicita-se maior detalhamento sobre volume e fluxo de "fumaça" a que os animais serão expostos (vide item III. PARECER)**
- Condições de manutenção: adequadas;
- Número de animais solicitados e planejamento estatístico: adequados;
- Espécie, linhagem e sexo: **Swiss, fêmeas, 25g.**




III. PARECER: APROVADO

- Listar pendências ou critérios de aprovação ou reprovação.

"A duração da sessão será de 30 minutos/dia durante 7,15,30,60 e 90 dias dias. O volume de fumaça de "tabaco" a que os animais dos grupos testes serão expostos é de 35 ml por dois segundos enquanto os outros 58 segundos serão de ar puro (NEMMAR et al., 2015; HOFFMEISTER et al, 2017). A taxa de fluxo da bomba será ajustada manualmente para manter o volume de 530mL/2seg (sopro especificado pelo método Beirute), este regime foi escolhido por que ele se aproxima, em média, da topografia do sopro humano durante o uso do aparelho de narguilé (KHABOUR et al., 2012)."

IV. REANÁLISE:

V. PARECER FINAL: APROVADO



Telmo José Mezadri
Coordenador CEUA/UNIVALI