

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

WALESSA BRASIL DA SILVA

**Proteínas relacionadas à hipóxia são superexpressas no Carcinoma epidermoide da cabeça e pescoço de pacientes fumantes: Uma análise imunohistoquímica**

BELÉM - PARÁ

2016

WALESSA BRASIL DA SILVA

**Proteínas relacionadas à hipóxia são superexpressas no Carcinoma epidermoide da cabeça e pescoço de pacientes fumantes: Uma análise imunohistoquímica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Pará, como pré-requisito para obtenção do Título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio de Melo Alves Junior

BELÉM – PARÁ

2016

WALESSA BRASIL DA SILVA

**Proteínas relacionadas à hipóxia são superexpressas no Carcinoma epidermoide da cabeça e pescoço de pacientes fumantes: Uma análise imunohistoquímica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Pará, como pré-requisito para obtenção do Título de Mestre em Odontologia pela Banca examinadora composta pelos membros:

Examinador: Prof. Dr. Sérgio de Melo Alves Júnior

Instituição: Universidade Federal do Pará

Assinatura: \_\_\_\_\_

Examinador: Prof. Dr. João de Jesus Viana Pinheiro

Instituição: Universidade Federal do Pará

Assinatura: \_\_\_\_\_

Examinador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Sueli da Silva Kataoka

Instituição: Universidade Federal do Pará

Assinatura: \_\_\_\_\_

A banca examinadora considera a discente:

Aprovada ( ) Reprovada ( )

Data: 12 de Fevereiro de 2016.

Local de defesa: Sala de aula do Programa de Pós-graduação em Odontologia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil.

## DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação à  
Deus, por seu infinito amor e  
benignidade.

## ADRADECIMENTOS

Em especial à Deus por me permitir concretizar este objetivo através de Seu poder, amor e proteção.

À minha família, Walderez Primavera e Alessandra Brasil por terem acreditado, apoiado e investido em meus planos e objetivos de vida acadêmica, e em especial à Suellen Jastes, por seu amor sem medidas, carinho, cuidado, apoio e paciência, que me proporcionam amor, confiança, paz e equilíbrio para enfrentar e vencer todos os obstáculos impostos pela vida.

À CAPES e Ministério da Educação pelo financiamento da bolsa de estudos durante o mestrado.

Ao Hospital Ophir Loyola pelo suporte técnico à esta pesquisa.

Aos professores Sergio de Melo Alves Junior, orientador desta pesquisa e João de Jesus Viana Pinheiro por toda dedicação, atenção, ensinamentos e aconselhamentos.

Aos colegas de mestrado, Artur Soares, Lara Pinto, Larissa Martel e Mylenna Libdy pelo companheirismo e amizade, em especial à Natacha Malu, por sua amizade e contribuição técnica e laboratorial nesta pesquisa.

# **Proteínas relacionadas à hipóxia são superexpressas no Carcinoma epidermoide da cabeça e pescoço de pacientes fumantes: Uma análise imunohistoquímica**

## **RESUMO**

O Carcinoma epidermoide (CE) da cabeça e pescoço é o sexto câncer mais comum e na maioria dos casos é causado pelo fumo. A hipóxia intratumoral é uma característica inerente do CE e induz a expressão de determinadas proteínas. No entanto, ainda não está bem estabelecido se há diferença no comportamento biológico do CE entre indivíduos fumantes e não fumantes em relação à hipóxia. Portanto, este estudo investigou a expressão das proteínas relacionadas à hipóxia no CE de pacientes fumantes e não fumantes através de análise imunohistoquímica. Foram selecionadas 45 amostras de CE e 14 de epitélio oral normal (grupo controle) para a realização de imunohistoquímica das proteínas HIF1A, NOTCH1, ADAM12 e HBEGF. As áreas neoplásicas e epiteliais foram aleatoriamente fotografadas, mensuradas e analisadas estatisticamente. Observou-se diferença estatística ( $p < 0.05$ ) na imunopressão das proteínas estudadas entre os grupos CE ( $n = 45$ ) e controle ( $n = 14$ ). Classificando o grupo de CE ( $n = 45$ ) em pacientes fumantes ( $n = 37$ ) e não fumantes ( $n = 8$ ), observou-se que a imunopressão das proteínas HIF1A, NOTCH1 e ADAM12 foi estatisticamente maior em fumantes do que em não fumantes ( $p < 0.05$ ), enquanto que a imunopressão de HBEGF não apresentou diferença estatisticamente significativa entre fumantes e não fumantes ( $p > 0.05$ ). A imunopressão de HIF1A, NOTCH1, ADAM12 e HBEGF foi maior em fumantes quando comparada com o grupo controle ( $p < 0.05$ ), no entanto entre o grupo de não fumantes e o grupo controle não foi estatisticamente significativa ( $p > 0.05$ ). Correlações relevantes foram observadas entre a imunopressão de HIF1A e o fumo ( $p = 0.04$ ), entre a imunopressão de ADAM12 e metástases em linfonodos ( $p = 0.03$ ), bem como entre a imunopressão de NOTCH1 e ADAM12 ( $p = 0.001$ ). Portanto, conclui-se que as proteínas HIF1A, NOTCH1 e ADAM12 integram conjuntamente a via de sinalização ativada pela hipóxia intratumoral, bem como sofrem influência adicional de forma direta ou indireta do fumo resultando em aumento de expressão, por esta razão a imunopressão de HIF1A, NOTCH1 e ADAM12 foi maior em fumantes do que em não fumantes. Enquanto que, a similaridade de imunopressão de HBEGF entre fumante e não fumantes sugere que esta proteína é induzida somente pela hipóxia intratumoral, e que o fumo não exerce influência sobre sua expressão.

**Palavras-chave:** Carcinoma epidermoide; NOTCH1; ADAM12; HIF1A; HBEGF

## **Hypoxia-related proteins are upregulated in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma of smokers patients: A Immunohistochemical analysis**

### ***ABSTRACT***

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is the sixth most common cancer and in most cases is caused by smoking habit. Intratumoral hypoxia is a HNSCC inherent characteristic and induces hypoxia-related proteins immunoexpression. However, it is not yet established if there are differences of HNSCC biological behavior between smokers and non-smokers regarding hypoxia. Therefore, we investigated this proteins immunoexpression in HNSCC of smokers and non-smokers. Forty-five HNSCC (n = 45) and 14 normal oral epitheliums (control group) samples were selected for immunohistochemistry of HIF1A, NOTCH1, ADAM12 and HBEGF proteins. Neoplastic and epithelial areas were randomly photographed, measured and statistically analyzed. A difference of hypoxia-related proteins between HNSCC (n=45) and control group (n=14) was observed ( $p < 0.05$ ). Classifying HNSCC in smokers (n=37) and non-smokers (n=8), HIF1A, NOTCH1 and ADAM12 immunoexpression were different between both groups ( $p < 0.05$ ), also there was no difference of HBEGF immunoexpression between them ( $p > 0.05$ ). Hypoxia-related proteins immunoexpression were different between smokers and control group ( $p < 0.05$ ) while between non-smokers and control group were not different ( $p > 0.05$ ). Relevant correlations were found between HIF1A and smoking habit ( $p = 0.04$ ), also between ADAM12 and lymph nodes metastasis ( $p = 0.03$ ). NOTCH1 and ADAM12 were strong associated ( $p = 0.001$ ). Thus, HIF1A, NOTCH1 and ADAM12 were upregulated in HNSCC of smokers. Therefore, HIF1A, NOTCH1 and ADAM12 together compound a singling pathway induce by IH also by smoke, for this reason were upregulated in HNSCC of smokers, while HBEGF similar immunoexpression between smokers and non-smokers suggests a single IH influence.

***Keywords:*** Squamous cell carcinoma; NOTCH1; ADAM12; HIF1A; HBEGF

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas do periódico científico *Neoplasia*. Disponível em:  
<<https://www.elsevier.com/journals/neoplasia/1476-5586/guide-for-authors#38000>>



## Sumário

Introdução.....	10
Materiais e Métodos .....	13
Análise imunohistoquímica .....	13
Quantificação das proteínas relacionadas à hipóxia .....	14
Análise estatística .....	15
Resultados.....	15
Dados clinicopatológicos .....	15
As amostras de CE expressaram as proteínas relacionadas à hipóxia .....	16
As amostras de CE de fumantes apresentaram maior expressão de HIF1A, NOTCH1 e ADAM12 .....	16
Padrão de imunomarcção de HIF1A, NOTCH1, ADAM12 e HBEGF .....	17
Correlações da imunexpressão de HIF1A, NOTCH1, ADAM12 e HBEGF.....	17
Discussão .....	18
Referências .....	24
Tabelas.....	31
Tabela 1. Dados clinicopatológicos.....	31
Tabela 2. A correlação da expressão de HIF1A, NOTCH1, ADAM12 e HBEGF com as variáveis clinicopatológicas.....	32
Tabela 3. A correlação entre a expressão das proteínas relacionadas à hipóxia.....	33
Figuras .....	34
Figura 1. Padrão de imunomarcção das proteínas relacionadas à hipóxia no CE de fumantes e não fumantes e no epitélio oral normal (grupo controle). Imagens da linha A apresentam a imunomarcção de HIF1A, NOTCH1, ADAM12 e HBEGF no CE de fumantes. Imagens da linha B apresentam a imunomarcção de HIF1A, NOTCH1, ADAM12 e HBEGF no CE de não fumantes. Imagens da linha C apresentam a imunomarcção de HIF1A, NOTCH1, ADAM12 e HBEGF no grupo controle.....	34
Gráficos .....	35
Gráfico 1. Diferença estatística de imunexpressão das proteínas relacionadas à hipóxia entre os grupos Carcinoma epidermoide (n=45) e controle (n=14), determinada pelo Teste T de Student e Mann-Whitney.....	35
Gráfico 2. Diferença estatística de imunexpressão das proteínas relacionadas à hipóxia entre os grupos fumantes (CE, n=37), não fumantes (CE, n=8) e controle (n=14), determinada por ANOVA um critério.....	36
Anexo I.....	37
Manuscrito (versão na língua inglesa).....	37

## **Introdução**

O Carcinoma epidermoide (CE) da cabeça e pescoço é o sexto tipo de câncer mais comum mundialmente e na maioria dos casos é causado pelo fumo [1]. O CE exhibe células epiteliais neoplásicas, solitárias ou aglomeradas invadindo o tecido conjuntivo adjacente. Igualmente à maioria dos cânceres, o CE é capaz de induzir a angiogênese para suplementação nutricional própria, e deste modo proporcionando-lhe crescimento tumoral. No entanto, a angiogênese tumoral é deficiente, portanto forma vasos sanguíneos qualitativa e quantitativamente deficientes, ocasionando déficit de aporte sanguíneo resultando em reduzida disponibilidade de oxigênio ( $O_2$ ), fenômeno molecular denominado de hipóxia intratumoral (HI). A HI induz a proliferação celular neoplásica e o crescimento tumoral através de uma cascata de eventos moleculares [2].

Durante os estágios iniciais de desenvolvimento tumoral, a HI é decorrente do déficit de aporte sanguíneo devido às anormalidades estruturais e funcionais dos vasos sanguíneos (quadro de hipóxia aguda) e em estágios avançados, também é decorrente do déficit de aporte sanguíneo, porém ocasionado pelo aumento das distâncias dos vasos sanguíneos devido ao crescimento tumoral (quadro de hipóxia crônica). A hipóxia intratumoral também pode ser provocada pela redução do transporte de  $O_2$  realizado pela hemoglobina (quadro de hipóxia anêmica) [3].

A inalação de monóxido de carbono (CO) pode provocar um quadro de hipóxia anêmica, também denominado de hipóxia tóxica, devido à sua ligação com a hemoglobina na corrente circulatória, decorrente da atração duzentas vezes mais forte entre monóxido de carbono-hemoglobina do que entre oxigênio-hemoglobina, e deste modo impedindo o transporte de  $O_2$  realizado pela hemoglobina [3]. O fumo é a principal fonte não-ambiental de CO, um gás incolor, inodoro e tóxico [3].

A HI induz a expressão do fator induzido por hipóxia, subunidade alfa (HIF1A) [4]. O Fator induzido por hipóxia (HIF1) é um complexo proteico heterodimérico

pertencente à família de fatores de transcrição helix-loop-helix. O HIF1 possui duas subunidades, o HIF1A (hypoxia inducible factor 1, alpha subunit) e o HIF1B (Aryl hydrocarbon nuclear receptor translocator ou ARNT). A unidade HIF1B é constitutivamente expressa e a unidade HIF1A é regulada pela tensão de oxigênio. Em um ambiente de normóxia, o HIF1A é rapidamente degradado (meia-vida menor que 5') pela proteína von Hippel-Lindau (VHL). Para ocorrer a degradação do HIF1A são necessárias moléculas de O<sub>2</sub> e ferro. Portanto em um ambiente de hipóxia (reduzida disponibilidade de O<sub>2</sub>) o HIF1A não sofre degradação e deste modo é ativado e expresso [5, 6].

Deste modo, a HI induz diretamente a ativação de HIF1A, o qual se ligará à subunidade HIF1B formando o HIF1. Em seguida, o HIF1 transloca-se para o núcleo, resultando na expressão de genes responsivos à hipóxia e responsáveis pela angiogênese, invasividade e metástases no CE [7, 8]. A expressão de HIF1A aumenta os níveis de Jagged2 (JAG2), uma proteína pertencente à família de ligantes de NOTCH1 [Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila)]. Este evento molecular desencadeará a sinalização de NOTCH1 através da ligação JAG2-NOTCH1. O NOTCH1 é uma proteína transmembrana responsável por processos fisiológicos, como por exemplo a proliferação e apoptose celular, a superexpressão desta proteína é associada à progressão e metástases no CE [9, 10]. A expressão de NOTCH1 recruta metaloproteinases (MMPs) e o complexo  $\gamma$ -secretase [4].

O complexo  $\gamma$ -secretase cliva o domínio intracelular do NOTCH1 (DICN). Em seguida, o DICN é liberado no citoplasma e transloca-se para o núcleo celular, onde liga-se ao fator de transcrição CSL (CBF1, Suppressor of Hairless, Lag-1), esta ligação aumenta os níveis da proteína ADAM12 (A disintegrin and metalloproteinase domain 12) [4, 11, 12].

ADAM12 é uma metaloproteinase zinco dependente, membro da família adamalysin. Nas células humanas, ADAM12 apresenta duas isoformas, a parte longa transmembrana (ADAM-12L), a qual possui múltiplas estruturas transmembrana e a parte secretada (ADAM-12S), desprovida de domínio citoplasmático e transmembrana [13, 14].

A principal atividade de ADAM12 é a clivagem de substratos da matriz extracelular (ECM), como por exemplo o colágeno tipo IV, fibronectina e gelatina. Por esta razão, a superexpressão de ADAM12 tem sido associada à formação de invadopódios, estruturas celulares ricas em actina que possibilitam a invasão celular neoplásica [4, 15, 16]. Ademais, a expressão de ADAM12 possui papel importante na clivagem do ectodomínio de diversos fatores de crescimento, como por exemplo o HBEGF (Heparin binding EGF like growth factor) [17-19].

O HBEGF é uma proteína transmembrana pertencente à família dos fatores de crescimento epidérmico. O HBEGF possui duas isoformas, a forma ancorada à membrana (pró-HB-EGF), a qual é clivada por ADAM12, e a forma solúvel (s-HBEGF), a qual é liberada após a clivagem do pró-HBEGF. Esta clivagem também libera um fragmento terminal de HBEGF (HBEGF-CTF), o qual transloca-se do plasma para o núcleo. Curiosamente, o domínio pró-HBEGF também transloca-se para o núcleo após o processo de clivagem por ADAM12. Em tumores malignos, a expressão de HBEGF é associada à proliferação tumoral e metástases [20, 21].

Em síntese, está solidamente estabelecido que o fumo induz o surgimento do CE bem como a hipóxia é uma das suas principais características. A HI desencadeia a expressão de determinadas proteínas relacionadas à proliferação e crescimento tumoral, e à metástases através de uma complexa via de sinalização descrita acima. No entanto, ainda é desconhecido se há diferença no comportamento biológico do CE entre indivíduos

fumantes e não fumantes em relação à hipóxia. Portanto, esta investigação é pioneira na análise da expressão das proteínas relacionadas à hipóxia no CE de pacientes fumantes e não fumantes e possíveis correlações das proteínas estudadas com as variáveis clinicopatológicas (fumo, consumo de álcool, estágios clínicos, metástase em linfonodos, recidiva e morte).

## **Materiais e Métodos**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará (Nº do parecer: 877.291) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital Ophir Loyola (Nº do parecer: 904.248). Foram selecionadas as 45 amostras disponíveis de CE no hospital referência em tratamento oncológico da rede de saúde pública no estado do Pará, Hospital Ophir Loyola, Belém, Pará, Brasil

### **Técnica imunohistoquímica**

Para a imunohistoquímica (técnica da imunoperoxidase) foram utilizados os seguintes anticorpos primários: Anti-HIF1A (Rabbit Anti-HIF1A Monoclonal Antibody, clone EP1215Y. Millipore, Temecula, CA, USA); Anti-NOTCH1 (Rabbit Anti-NOTCH1 Intracellular Polyclonal Antibody, #07-1231. Millipore, Temecula, CA, USA.); Anti-ADAM12 (Goat Anti-ADAM12 polyclonal antibody ab28747, , Abcam, Paisley, UK) e Anti-HBEGF (Goat Anti-HBEGF Polyclonal Antibody, , R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Os 45 blocos de parafina de CE e 14 de epitélio oral normal (grupo controle) foram seccionados continuamente em 4 µm de espessura, e posteriormente colhidos em lâminas tratadas com organossilano (3-aminopropil-triethosilano, Sigma® Chemical. Co.

St. Louis, MO, USA). As secções foram desparafinizadas em xilol e hidratadas em sequência decrescente de soluções de etanol. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizada pela imersão das lâminas em solução de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 3% e álcool metílico, na proporção 1:1 durante 20 minutos. Posteriormente, a recuperação antigênica foi realizada em tampão de citrato (pH 6,0) em câmara de pressão Pascal (Dako, Carpinteria, CA, EUA) por 30 segundos. Após esta etapa, foi efetuada a eliminação de anticorpos inespecíficos com albumina de soro bovino a 1% (BSA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e solução salina tamponada com fosfato (PBS) por uma hora. Em seguida, as lâminas foram incubadas com Anti-HIF1A em diluição de 1:100, Anti-NOTCH1 em diluição de 1:600, Anti-ADAM12 em diluição de 1:133 e com Anti-HBEGF em diluição de 1:15. Após esta etapa, o anticorpo secundário foi incubado por 30 minutos (EnVision Plus, Dako®, Carpinteria, CA, USA). A diaminobenzidina (Dako®, Carpinteria, CA, USA) foi utilizada como cromógeno, e logo após, as lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Mayer (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e montados em Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, EUA).

#### Quantificação das proteínas relacionadas à hipóxia

Cinco imagens de campo claro (5 áreas randomicamente selecionadas de cada amostra) foram adquiridas em microscópio AxioScope.A1, equipado com câmera CCD AxioCam HRc (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) e objetiva de 40x. O Plug-in Color deconvolution e o software de domínio público ImageJ foram utilizados para verificar a imunexpressão das proteínas, respectivamente segmentando e quantificando em fração de área marcada (%), as áreas pigmentadas por diaminobenzidina. O padrão de imunomarcção foi classificado da seguinte forma: quanto à localização: nuclear e/ou citoplasmática, quanto à intensidade fraca ( $\leq 50\%$ ) e forte ( $> 50\%$ ) e quanto à distribuição

em uniforme e pontual [21-23]. O software BioEstat 5.0 (BioEstat, Belém, Brasil) foi utilizado para realização de testes estatísticos.

### Análise estatística

Os testes de Mann-Whitney e o Teste T de Student foram aplicados para comparar a expressão de cada proteína entre o grupo de CE (n=45) e o grupo controle (n=14). Assim como, para comparar a expressão de cada proteína entre fumantes (n=37) e não fumantes (n=8). O teste ANOVA um critério foi aplicado para comparar a expressão de cada proteína entre fumantes (n=37), não fumantes (n=8) e grupo controle (n=14). A regressão logística múltipla foi aplicada para verificar possíveis correlações entre a expressão das proteínas e variáveis clinicopatológicas. A matriz de correlação foi aplicada para verificar a possível correlação entre a expressão das proteínas.

## **Resultados**

### Dados clinicopatológicos

De acordo com a Tabela 1, 91,9% de pacientes fumantes eram homens e 8,10% eram mulheres com idade média de 64,13 anos, variando entre 33 a 92 anos e 64,86% apresentavam histórico de consumo de álcool. Trinta e quatro pacientes não fumantes eram homens (62,5%) com idade média de 67,12 anos, variando entre 54 a 84 anos e apenas um paciente não fumante apresentava histórico de consumo de álcool. Vinte e três (62,16%) pacientes fumantes eram leucodermas, 6 (16,22%) eram melanodermas e 8 (21,62%) feodermas, enquanto que 3 (37,5%) pacientes não fumantes eram leucodermas, 2 (25%) melanodermas e 2 (25%) feodermas. Treze (35,1%) pacientes fumantes estavam em estágios clínicos iniciais (Estágios I e II) e 24 (64,9%) em estágios clínicos avançados (Estágios III e IV). Enquanto que, 75% dos pacientes não fumantes estavam em estágios

clínicos avançados e apenas 25% estavam em estágios iniciais. Treze pacientes fumantes (35,13%) e cinco não fumantes (62,5%) apresentaram metástases em linfonodos na anamnese e 21,62% dos pacientes fumantes apresentaram tumores bem diferenciados (grau I), 45,94% moderadamente diferenciados (grau II) e 13,51% pobremente diferenciado (grau III). Enquanto que, 37,5% dos pacientes não fumantes apresentaram tumores em grau I, 25% em grau II e 25% em grau III. Seis pacientes fumantes e um não fumante apresentaram recidiva após o tratamento inicial em um período médio de 5.1 meses e 75.67% dos pacientes fumantes e 75% dos não fumantes estavam vivos em uma média de período de tratamento de aproximadamente 6 meses.

As amostras de CE expressaram as proteínas relacionadas à hipóxia

As proteínas relacionadas à hipóxia foram expressas em todas as amostras de CE (n=45) e também no grupo controle (n=14). Observou-se diferença estatística ( $p < 0.05$ ) de imunexpressão das proteínas citadas entre as amostras de CE (n=45) e o grupo controle (Gráfico 1).

As amostras de CE de fumantes apresentaram maior expressão de HIF1A, NOTCH1 e ADAM12

Classificando as 45 amostras de CE em fumantes (n=37) e não fumantes (n=8), a imunexpressão das proteínas HIF1A, NOTCH1 e ADAM12 foi maior em fumantes do que em não fumantes ( $p < 0.05$ ). A porcentagem de imunexpressão de HBEGF foi discretamente maior em fumantes, porém não ocorreu diferença estatística entre fumantes e não fumantes ( $p > 0.05$ ). O grupo de fumantes apresentou maior expressão de todas as proteínas quando comparado ao grupo controle ( $p < 0.05$ ), enquanto que o grupo de fumantes e grupo controle não apresentaram diferença estatística ( $p > 0.05$ ) (Gráfico 2).



## Padrão de imunomarcção de HIF1A, NOTCH1, ADAM12 e HBEGF

A imunomarcção de HIF1A nas células neoplásicas de pacientes fumantes foi fraca (47,96%), uniforme, nuclear e citoplasmática (Figura 1. 1A). As células neoplásicas de pacientes não fumantes apresentaram imunomarcção de HIF1A similar à imunomarcção de pacientes fumantes, porém a porcentagem de expressão foi menor (37%) (Figura 1. 1B). No grupo controle, as células epiteliais exibiram imunomarcção de HIF1A fraca (35%), uniforme, nuclear e citoplasmática (Figura 1. 1C).

A imunomarcção de NOTCH1 nas células neoplásicas de fumantes foi forte (64.16%), uniforme, citoplasmática e nuclear (Figura 1. 2A), igualmente nas células neoplásicas de não fumantes, porém com média de marcação de 52,77% (Figura 2. 2B). No grupo controle, a imunomarcção de NOTCH1 nas células epiteliais foi fraca (49%), uniforme e predominantemente citoplasmática (Figura 1. 2C).

ADAM12 exibiu imunomarcção forte (59,44%), uniforme e predominantemente citoplasmática nas células neoplásicas de pacientes fumantes (Figura 1. 3A), em não fumantes foi fraca (31,75%), uniforme e predominantemente citoplasmática (Figura 1. 3B) e no grupo controle foi fraca (39%), uniforme e predominantemente citoplasmática (Figura 1. 3C).

As células neoplásicas de pacientes fumantes apresentaram imunomarcção de HBEGF forte (64,68%), uniforme, nuclear e citoplasmática (Figura 1. 4A), em pacientes não fumantes foi forte (61,54%), uniforme, nuclear e citoplasmática (Figura 1. 4B) e nas células epiteliais do grupo controle foi forte (51%), uniforme e citoplasmática (Figura 1. 4C).

## Correlações da imunoexpressão de HIF1A, NOTCH1, ADAM12 e HBEGF

A imunexpressão de HIF1A foi associada ao fumo ( $p = 0.04$ ) e a imunexpressão de ADAM12 foi correlacionada à metástase em linfonodos ( $p = 0.03$ ). A imunexpressão de ambas as proteínas não apresentou correlação com qualquer outra variável analisada ( $p > 0.05$ ). A imunexpressão de NOTCH1 e HBEGF não foram associadas a nenhuma variável analisada ( $p > 0.05$ ) (Tabela 2). Observou-se forte associação entre a imunexpressão de ADAM12 e NOTCH1 ( $p = 0.001$ ), nenhuma outra associação da imunexpressão entre proteínas foi observada ( $p > 0.05$ ) (Tabela 3).

## **Discussão**

A HI é a principal característica patológica do CE. A HI é um evento molecular intermitente que induz a expressão de proteínas associadas à angiogênese, proliferação e crescimento tumoral. Ademais, a HI pode resultar em resistência à radioterapia e quimioterapia, além de potencializar metástase em linfonodos, resultando em um prognóstico ruim [5, 24, 25]. O fumo é o principal fator indutor do CE [26, 27]. No entanto, ainda é desconhecido se há diferença no comportamento patológico do CE entre indivíduos fumantes e não fumantes.

Foram analisadas no CE de pacientes fumantes e não fumantes a expressão das proteínas HIF1A, NOTCH1, ADAM12 e HBEGF, através de teste imunohistoquímico. As 45 amostras de CE exibiram maior expressão das proteínas relacionadas à hipóxia quando comparadas com o grupo controle, bem como em um modelo descrito sobre a formação de invadopódios através da expressão de HIF1A, NOTCH1, ADAM12 e HBEGF [4].

Curiosamente, ao classificar as 45 amostras de CE em pacientes fumantes e não fumantes os resultados são modificados. Estatisticamente, somente o grupo de fumantes exibiu maior expressão das proteínas relacionadas à hipóxia quando comparado ao grupo

controle, enquanto que o grupo de não fumantes e o controle exibiram expressão similar das proteínas citadas.

Além disso, a expressão de HIF1A, NOTCH1 e ADAM12 foi estatisticamente mais elevada em pacientes fumantes do que em não fumantes. Enquanto que, a expressão de HBEGF não apresentou diferença estatística entre os grupos de fumantes e não fumantes, embora tenha se apresentado discretamente mais elevada em fumantes. Deste modo, supõem-se que o fumo exerce relevante influência na expressão de HIF1A, NOTCH1 e ADAM12 [26, 28-30].

De acordo com evidências recentes [31], o padrão genético de células neoplásicas do CE de pacientes fumantes e não fumantes é similar e supostamente ambos pacientes apresentam o mesmo comportamento patológico de células neoplásicas. No entanto, os resultados do presente estudo revelaram que as células neoplásicas (CE) de pacientes fumantes exibiram maior expressão das proteínas HIF1A, NOTCH1 e ADAM12, assim como a expressão de HIF1A foi fortemente correlacionada com o fumo e a expressão de ADAM12 estreitamente associada à metástase em linfonodos.

De fato, segundo evidências [4, 8, 9, 32], estas proteínas estão fortemente relacionadas à progressão tumoral e metástases no CE. Portanto, possivelmente as células neoplásicas do CE de pacientes fumantes apresentam comportamento patológico diferente das células neoplásicas de pacientes fumantes.

A exposição ao tabaco (fumo) provoca mutações genéticas no DNA das mitocôndrias (mtDNA) [33]. A mitocôndria é uma organela citoplasmática, que possui carga genética própria e é responsável pela produção de energia através da respiração celular. Na respiração celular, ocorre a conversão de glicose em piruvato (glicólise), através da adição de O<sub>2</sub> na molécula de glicose, e através da glicólise ocorre liberação de energia (ATP) para a célula. As mutações do mtDNA ocorrem durante ou após a transição

do estágio pré-maligno para o estágio maligno. Ademais, estas mutações aumentam a dependência de glicólise, mesmo em períodos de disponibilidade satisfatória de oxigênio, portanto as mutações no DNA mitocondrial induzem as mitocôndrias a realizarem mais glicólise e conseqüentemente produzem mais moléculas de piruvato [1, 6, 26, 34].

A dependência metabólica de glicólise é denominada de Efeito Warburg ou glicólise aeróbica. Evidências [1, 6, 26, 34] reportam que altos níveis de piruvato (produto do Efeito Warburg) induzem diretamente a expressão do fator induzido por hipóxia, subunidade alfa (HIF1A). Portanto, supõe-se que as células neoplásicas do CE de pacientes fumantes apresentariam maior número de mutações no mtDNA do que no CE de pacientes não fumantes, e deste modo, células neoplásicas de pacientes fumantes exibiriam maior expressão da proteína HIF1A. De fato, a análise estatística revelou forte correlação entre a expressão de HIF1A e o fumo, sem qualquer influência de outras variáveis analisadas. A estatística também revelou maior expressão de HIF1A em células neoplásicas (CE) de fumantes do que em não fumantes, sugerindo que a maior expressão de HIF1A no grupo de fumantes é induzida pela HI inerente e também pelo fumo.

Embora a expressão de NOTCH1 e ADAM12 não tenham sido correlacionadas estatisticamente com o fumo, ambas as proteínas foram superexpressas no grupo de fumantes. Portanto, provavelmente o fumo influencia indiretamente a superexpressão de NOTCH1 e ADAM12 através da expressão elevada de HIF1A, que irá aumentar os níveis do ligante de NOTCH1 (JAG2), por conseguinte ativando a sinalização de NOTCH1 através da ligação NOTCH1-JAG2 e por fim induzindo o aumento da expressão de ADAM12 [24, 35, 36].

Provavelmente, a inalação de monóxido de carbono (CO) também exerce grande influência na expressão elevada de HIF1A, NOTCH1 e ADAM12 nas células neoplásicas de pacientes fumantes. O fumo é a maior fonte de CO, quando inalado adentra a corrente

circulatória, e liga-se à hemoglobina, devido à uma atração 200 vezes mais forte à hemoglobina do que ao O<sub>2</sub> [3].

Este evento molecular forma a molécula de carboxihemoglobina (COHb) impedindo o transporte de O<sub>2</sub> realizado pela hemoglobina, provocando reduzida disponibilidade de O<sub>2</sub>, caracterizando um quadro de hipóxia tóxica [37]. Portanto, possivelmente ocorre maior nível de hipóxia nas células neoplásicas (CE) de pacientes fumantes devido à hipóxia tóxica provocada pelo fumo, somada à HI inerente do CE, resultando na expressão elevada de HIF1A, NOTCH1 e ADAM12.

A expressão de NOTCH1 em fumantes e em não fumantes apresentou-se intensa (>50%) e não foi correlacionada com nenhuma proteína estudada, enquanto que outros estudos Ravindran and Devaraj [38] evidenciaram correlação entre variáveis clinicopatológicas e um padrão de imunomarcção de NOTCH1 de intensidade fraca. O padrão de imunomarcção de NOTCH1 nas células neoplásicas de pacientes fumantes e não fumantes localizou-se no núcleo e citoplasma, porque NOTCH1 é uma proteína transmembrana clivada por  $\gamma$ -secretase, provocando a translocação de seu DICN do citoplasma para o núcleo [4]. Ademais, a imunexpressão de NOTCH1 e ADAM12 foram fortemente correlacionadas entre si, provavelmente porque de acordo com evidências científicas a expressão de NOTCH1 aumenta a expressão de ADAM12 [4, 9, 12, 39].

A expressão de ADAM12 foi associada à metástase em linfonodos e localizou-se predominantemente no citoplasma das células neoplásicas (CE) de fumantes e não fumantes, este padrão de imunomarcção tem sido correlacionado com altas taxas de migração e invasão neoplásicas [32]. Portanto, os pacientes fumantes apresentarão maior probabilidade de migração e invasão neoplásica porque apresentaram superexpressão de ADAM12 comparado aos não fumantes.

A imunomarcação de HIF1A localizou-se no núcleo e citoplasma nas células neoplásicas de fumantes e não fumantes, bem como em outros dados científicos [40], embora determinadas evidências relatam a presença de HIF1A somente no núcleo associada ao prognóstico ruim do câncer [41, 42]. Porém, quando o HIF1A é ativado ocorre uma rápida acumulação localizada no citoplasma e somente em seguida, a proteína transloca-se para o núcleo [43].

A expressão de HIF1A foi maior nas células neoplásicas (CE) de pacientes fumantes do que em não fumantes, embora ambos os grupos apresentaram fraca imunomarcação ( $\leq 50\%$ ) de HIF1A, provavelmente porque segundo evidências [44], a superexpressão de HIF1A é associada a estágios clínicos iniciais do câncer, e de fato, tanto as amostras de CE de pacientes fumantes quanto as de não fumantes apresentavam-se em estágios clínicos avançados. Evidências sugerem que, a superexpressão de HIF1A também é correlacionada com variáveis clinicopatológicas [42, 45-47], no entanto no presente estudo a expressão de HIF1A foi correlacionada somente ao fumo.

Igualmente à proteína HIF1A, a superexpressão de HBEGF localizada no núcleo de células neoplásicas (CE) é associada a estágios clínicos avançados [20, 21, 48]. Conforme acima citado, a maioria dos pacientes fumantes e não fumantes analisados apresentavam estágios clínicos avançados do CE e ambos os grupos apresentaram superexpressão de HBEGF ( $>50\%$ ), além disto a expressão de HBEGF não foi correlacionada com fumo, provavelmente por estes resultados não foi encontrada diferença estatística entre fumantes e não fumantes, embora as células neoplásicas (CE) de pacientes fumantes apresentaram maior expressão de HBEGF do que as de não fumantes.

Concluindo, as proteínas HIF1A, NOTCH1 e ADAM12 integram conjuntamente a via de sinalização da hipóxia intratumoral e sofrem influência adicional de forma direta

e indireta do fumo. A ausência de diferença estatística na expressão de HBEGF entre fumantes e não fumantes sugere que o HBEGF sofra influência somente da hipóxia intratumoral sem interferência do fumo. A hipóxia intratumoral é uma característica marcante do CE e é fortemente correlacionado a progressão, invasão e metástase tumoral, além de acarretar resistência à quimioterapia e radioterapia levando à um prognóstico ruim. Por conseguinte, a expressão das proteínas relacionadas à hipóxia intratumoral caracterizam um quadro de prognóstico ruim. Portanto, a maior expressão de HIF1A, NOTCH1 e ADAM12 em fumantes representa maior probabilidade destes indivíduos apresentarem altas taxas de progressão, invasão e metástase tumoral, além de maior resistência à quimioterapia e radioterapia, e deste modo um pior prognóstico em comparação à indivíduos não fumantes.

## Referências

- [1] Sun W, Zhou S, Chang SS, McFate T, Verma A, Califano JA (2009). Mitochondrial mutations contribute to HIF1alpha accumulation via increased reactive oxygen species and up-regulated pyruvate dehydrogenase kinase 2 in head and neck squamous cell carcinoma *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **15**, 476-484.
- [2] van de Schootbrugge C, Schults EM, Bussink J, Span PN, Grenman R, Pruijn GJ, Kaanders JH, Boelens WC (2014). Effect of hypoxia on the expression of alphaB-crystallin in head and neck squamous cell carcinoma *BMC cancer* **14**, 252.
- [3] Bleecker ML (2015). Carbon monoxide intoxication *Handbook of clinical neurology* **131**, 191-203.
- [4] Diaz B, Yuen A, Iizuka S, Higashiyama S, Courtneidge SA (2013). Notch increases the shedding of HB-EGF by ADAM12 to potentiate invadopodia formation in hypoxia *The Journal of cell biology* **201**, 279-292.
- [5] Tawk B, Schwager C, Deffaa O, Dyckhoff G, Warta R, Linge A, Krause M, Weichert W, Baumann M, Herold-Mende C, et al. (2015). Comparative analysis of transcriptomics based hypoxia signatures in head- and neck squamous cell carcinoma *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*.
- [6] Bardos JI, Ashcroft M (2005). Negative and positive regulation of HIF-1: a complex network *Biochimica et biophysica acta* **1755**, 107-120.
- [7] Goscinski MA, Nesland JM, Giercksky KE, Dhakal HP (2013). Primary tumor vascularity in esophagus cancer. CD34 and HIF1-alpha expression correlate with tumor progression *Histology and histopathology* **28**, 1361-1368.
- [8] Sun G, Hu W, Lu Y, Wang Y (2013). A meta-analysis of HIF-1alpha and esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) risk *Pathology oncology research : POR* **19**, 685-693.



- [9] Yoshida R, Nagata M, Nakayama H, Niimori-Kita K, Hassan W, Tanaka T, Shinohara M, Ito T (2013). The pathological significance of Notch1 in oral squamous cell carcinoma *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **93**, 1068-1081.
- [10] Song X, Xia R, Li J, Long Z, Ren H, Chen W, Mao L (2014). Common and complex Notch1 mutations in Chinese oral squamous cell carcinoma *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **20**, 701-710.
- [11] D'Souza B, Miyamoto A, Weinmaster G (2008). The many facets of Notch ligands *Oncogene* **27**, 5148-5167.
- [12] Li H, Solomon E, Duhachek Muggy S, Sun D, Zolkiewska A (2011). Metalloprotease-disintegrin ADAM12 expression is regulated by Notch signaling via microRNA-29 *The Journal of biological chemistry* **286**, 21500-21510.
- [13] Kveiborg M, Albrechtsen R, Couchman JR, Wewer UM (2008). Cellular roles of ADAM12 in health and disease *The international journal of biochemistry & cell biology* **40**, 1685-1702.
- [14] Uehara E, Shiiba M, Shinozuka K, Saito K, Kouzu Y, Koike H, Kasamatsu A, Sakamoto Y, Ogawara K, Uzawa K, et al. (2012). Upregulated expression of ADAM12 is associated with progression of oral squamous cell carcinoma *International journal of oncology* **40**, 1414-1422.
- [15] Roy R, Wewer UM, Zurakowski D, Pories SE, Moses MA (2004). ADAM 12 cleaves extracellular matrix proteins and correlates with cancer status and stage *The Journal of biological chemistry* **279**, 51323-51330.
- [16] Buccione R, Caldieri G, Ayala I (2009). Invadopodia: specialized tumor cell structures for the focal degradation of the extracellular matrix *Cancer metastasis reviews* **28**, 137-149.
- [17] Frohlich C, Klitgaard M, Noer JB, Kotsch A, Nehammer C, Kronqvist P, Berthelsen J, Blobel C, Kveiborg M, Albrechtsen R, et al. (2013). ADAM12 is expressed in the tumour

vasculature and mediates ectodomain shedding of several membrane-anchored endothelial proteins *The Biochemical journal* **452**, 97-109.

- [18] Albrechtsen R, Kveiborg M, Stautz D, Vikesa J, Noer JB, Kotzsh A, Nielsen FC, Wewer UM, Frohlich C (2013). ADAM12 redistributes and activates MMP-14, resulting in gelatin degradation, reduced apoptosis and increased tumor growth *Journal of cell science* **126**, 4707-4720.
- [19] Biadasiewicz K, Fock V, Dekan S, Proestling K, Velicky P, Haider S, Knofler M, Frohlich C, Pollheimer J (2014). Extravillous trophoblast-associated ADAM12 exerts pro-invasive properties, including induction of integrin beta 1-mediated cellular spreading *Biology of reproduction* **90**, 101.
- [20] Kramer C, Klasmeyer K, Bojar H, Schulz WA, Ackermann R, Grimm MO (2007). Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor isoforms and epidermal growth factor receptor/ErbB1 expression in bladder cancer and their relation to clinical outcome *Cancer* **109**, 2016-2024.
- [21] Shimura T, Yoshida M, Fukuda S, Ebi M, Hirata Y, Mizoshita T, Tanida S, Kataoka H, Kamiya T, Higashiyama S, et al. (2012). Nuclear translocation of the cytoplasmic domain of HB-EGF induces gastric cancer invasion *BMC cancer* **12**, 205.
- [22] Weber DC, Tille JC, Combescure C, Egger JF, Laouiti M, Hammad K, Granger P, Rubbia-Brandt L, Miralbell R (2012). The prognostic value of expression of HIF1alpha, EGFR and VEGF-A, in localized prostate cancer for intermediate- and high-risk patients treated with radiation therapy with or without androgen deprivation therapy *Radiation oncology* **7**, 66.
- [23] Jokilehto T, Rantanen K, Luukkaa M, Heikkinen P, Grenman R, Minn H, Kronqvist P, Jaakkola PM (2006). Overexpression and nuclear translocation of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase PHD2 in head and neck squamous cell carcinoma is associated

with tumor aggressiveness *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **12**, 1080-1087.

- [24] Chen WL, Wang CC, Lin YJ, Wu CP, Hsieh CH (2015). Cycling hypoxia induces chemoresistance through the activation of reactive oxygen species-mediated B-cell lymphoma extra-long pathway in glioblastoma multiforme *Journal of translational medicine* **13**, 389.
- [25] Ioannou M, Paraskeva E, Baxevanidou K, Simos G, Papamichali R, Papacharalambous C, Samara M, Koukoulis G (2015). HIF-1alpha in colorectal carcinoma: review of the literature *Journal of BUON : official journal of the Balkan Union of Oncology* **20**, 680-689.
- [26] Sun W, Chang SS, Fu Y, Liu Y, Califano JA (2011). Chronic CSE treatment induces the growth of normal oral keratinocytes via PDK2 upregulation, increased glycolysis and HIF1alpha stabilization *PloS one* **6**, e16207.
- [27] Weiner D, Khankin EV, Levy Y, Reznick AZ (2009). Effects of cigarette smoke borne reactive nitrogen species on salivary alpha-amylase activity and protein modifications *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* **60 Suppl 5**, 127-132.
- [28] Khabour OF, Alzoubi KH, Abu Thiab TM, Al-Husein BA, Eissenberg T, Shihadeh AL (2015). Changes in the expression and protein level of matrix metalloproteinases after exposure to waterpipe tobacco smoke *Inhalation toxicology* **27**, 689-693.
- [29] Sun W, Califano JA (2014). Sequencing the head and neck cancer genome: implications for therapy *Annals of the New York Academy of Sciences* **1333**, 33-42.
- [30] Shi D, Guo W, Chen W, Fu L, Wang J, Tian Y, Xiao X, Kang T, Huang W, Deng W (2012). Nicotine promotes proliferation of human nasopharyngeal carcinoma cells by regulating alpha7AChR, ERK, HIF-1alpha and VEGF/PEDF signaling *PloS one* **7**, e43898.

- [31] Kolokythas A, Zhou Y, Schwartz JL, Adami GR (2015). Similar Squamous Cell Carcinoma Epithelium microRNA Expression in Never Smokers and Ever Smokers *PLoS one* **10**, e0141695.
- [32] Rao VH, Kandel A, Lynch D, Pena Z, Marwaha N, Deng C, Watson P, Hansen LA (2012). A positive feedback loop between HER2 and ADAM12 in human head and neck cancer cells increases migration and invasion *Oncogene* **31**, 2888-2898.
- [33] Ju YS, Alexandrov LB, Gerstung M, Martincorena I, Nik-Zainal S, Ramakrishna M, Davies HR, Papaemmanuil E, Gundem G, Shlien A, et al. (2014). Origins and functional consequences of somatic mitochondrial DNA mutations in human cancer *eLife* **3**.
- [34] Ralph SJ, Rodriguez-Enriquez S, Neuzil J, Saavedra E, Moreno-Sanchez R (2010). The causes of cancer revisited: "mitochondrial malignancy" and ROS-induced oncogenic transformation - why mitochondria are targets for cancer therapy *Molecular aspects of medicine* **31**, 145-170.
- [35] Curry JM, Sprandio J, Cognetti D, Luginbuhl A, Bar-ad V, Pribitkin E, Tuluc M (2014). Tumor microenvironment in head and neck squamous cell carcinoma *Seminars in oncology* **41**, 217-234.
- [36] Yoon S, Woo SU, Kang JH, Kim K, Shin HJ, Gwak HS, Park S, Chwae YJ (2012). NF-kappaB and STAT3 cooperatively induce IL6 in starved cancer cells *Oncogene* **31**, 3467-3481.
- [37] Krzych-Falta E, Modzelewska D, Samolinski B (2015). Levels of exhaled carbon monoxide in healthy active and passive smokers *Przegląd lekarski* **72**, 99-102.
- [38] Ravindran G, Devaraj H (2012). Aberrant expression of beta-catenin and its association with DeltaNp63, Notch-1, and clinicopathological factors in oral squamous cell carcinoma *Clinical oral investigations* **16**, 1275-1288.
- [39] Sakamoto K, Fujii T, Kawachi H, Miki Y, Omura K, Morita K, Kayamori K, Katsube K, Yamaguchi A (2012). Reduction of NOTCH1 expression pertains to maturation

abnormalities of keratinocytes in squamous neoplasms *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **92**, 688-702.

- [40] Vasconcelos MG, Vasconcelos RG, Pereira de Oliveira DH, de Moura Santos E, Pinto LP, da Silveira EJ, Queiroz LM (2015). Distribution of Hypoxia-Inducible Factor-1alpha and Glucose Transporter-1 in Human Tongue Cancers *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* **73**, 1753-1760.
- [41] Luo JC, Shibuya M (2001). A variant of nuclear localization signal of bipartite-type is required for the nuclear translocation of hypoxia inducible factors (1alpha, 2alpha and 3alpha) *Oncogene* **20**, 1435-1444.
- [42] Fan Y, Li H, Ma X, Gao Y, Chen L, Li X, Bao X, Du Q, Zhang Y, Zhang X (2015). Prognostic Significance of Hypoxia-Inducible Factor Expression in Renal Cell Carcinoma: A PRISMA-compliant Systematic Review and Meta-Analysis *Medicine* **94**, e1646.
- [43] To KK, Huang LE (2005). Suppression of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) transcriptional activity by the HIF prolyl hydroxylase EGLN1 *The Journal of biological chemistry* **280**, 38102-38107.
- [44] Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Skarlatos J, Corti L, Blandamura S, Piazza M, Gatter KC, Harris AL (2001). Hypoxia inducible factor (HIF-1a and HIF-2a) expression in early esophageal cancer and response to photodynamic therapy and radiotherapy *Cancer research* **61**, 1830-1832.
- [45] Chai DM, Bao ZQ, Hu JG, Ma L, Feng ZZ, Tao YS (2013). Vasculogenic mimicry and aberrant expression of HIF-1alpha/E-cad are associated with worse prognosis of esophageal squamous cell carcinoma *Journal of Huazhong University of Science and Technology Medical sciences = Hua zhong ke ji da xue xue bao Yi xue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao Yixue Yingdewen ban* **33**, 385-391.

- [46] Zhang L, Ye SB, Li ZL, Ma G, Chen SP, He J, Liu WL, Xie D, Zeng YX, Li J (2014). Increased HIF-1alpha expression in tumor cells and lymphocytes of tumor microenvironments predicts unfavorable survival in esophageal squamous cell carcinoma patients *International journal of clinical and experimental pathology* **7**, 3887-3897.
- [47] Honguero Martinez AF, Arnau Obrer A, Figueroa Almanzar S, Leon Atance P, Guijarro Jorge R (2014). Analysis of Expression of Vascular Endothelial Growth Factor A and Hypoxia Inducible Factor-1alpha in Patients Operated on Stage I Non-Small-Cell Lung Cancer *Lung cancer international* **2014**, 810786.
- [48] Hayes KE, Walk EL, Ammer AG, Kelley LC, Martin KH, Weed SA (2013). Ablason kinases negatively regulate invadopodia function and invasion in head and neck squamous cell carcinoma by inhibiting an HB-EGF autocrine loop *Oncogene* **32**, 4766-4777.

## Tabelas

Tabela 1. Dados clinicopatológicos.

<b>Variáveis</b>	<b>Fumantes No. (%)</b>	<b>Não Fumantes No. (%)</b>
Total de casos	37 (82.22%)	8 (17.77%)
Idade (anos)		
Média	64.13	67.12
Variação	33-92	54-84
Gênero		
Masculino	34 (91.89%)	5 (62.5%)
Femenino	3 (8.10%)	3 (37.5%)
Raça		
Melanoderma	6 (16.21%)	2 (25%)
Leucoderma	23 (62.16%)	3 (37.5%)
Feoderma	7 (18.91%)	3 (37.5%)
Consumo de álcool		
Sim	24 (64.86%)	1 (12.5%)
Não	13 (35.13%)	7 (87.5%)
Estágio Clínico		
Estágio I-II	13 (35.13%)	2 (25%)
Estágio III-IV	24 (64.86%)	6 (75%)
Metástase em linfonodo (N)		
N0	24 (64.86%)	5 (62.5%)
N+	13 (35.13%)	2 (25%)
Grau histológico		
I	8 (21.62%)	3 (37.5%)
II	17 (45.94%)	2 (25%)
III	5 (13.51%)	2 (25%)
Recidiva		
Sim	6 (16.21%)	1 (12.5%)
Não	31 (83.78%)	7 (87.5%)
Morte		
Sim	9 (24.32%)	2 (25%)
Não	28 (75.67%)	6 (75%)

Tabela 2. A correlação da expressão de HIF1A, NOTCH1, ADAM12 e HBEGF com as variáveis clinicopatológicas.

Variáveis	HIF1A		NOTCH1		ADAM12		HBEGF	
	OR (IC 95%)	(p)	OR (IC 95%)	(p)	OR (IC 95%)	(p)	OR (IC 95%)	(p)
Fumo	10.43 (1.01-107.90)	0.04*	1.78 (0.22-14.27)	0.58	226214.62 (0.00-∞)	0.67	1.2 (0.16-9.35)	0.85
Consumo de álcool	0.68 (0.17-2.74)	0.59	1.77 (0.29-10.69)	0.53	3.54 (0.34-36.94)	0.28	1.08 (0.2-5.86)	0.92
Estágios Clínicos	0.54 (0.13-2.21)	0.39	1.55 (0.32-7.65)	0.58	5.4 (0.52-55.76)	0.15	0.55 (0.09-3.45)	0.53
Metástase em linfonodo	1.64 (0.39-6.88)	0.49	0.44 (0.09-2.21)	0.32	0.08 (0.01-0.86)	0.03*	2.31 (0.37-14.55)	0.36
Recidiva	1.1 (0.17-7.31)	0.91	26557.81(0.00-∞)	0.86	2.54 (0.09-69.75)	0.58	0.44 (0.06-3.48)	0.43
Morte	1.49(0.31-7.26)	0.62	3.01 (0.29-31.10)	0.35	24221.18 (0.00-∞)	0.76	0.63 (0.11-3.58)	0.6

\* $p < 0.05$ , determinado por Regressão logística múltipla. OR: Odds ratio. IC: Intervalo de confiança.



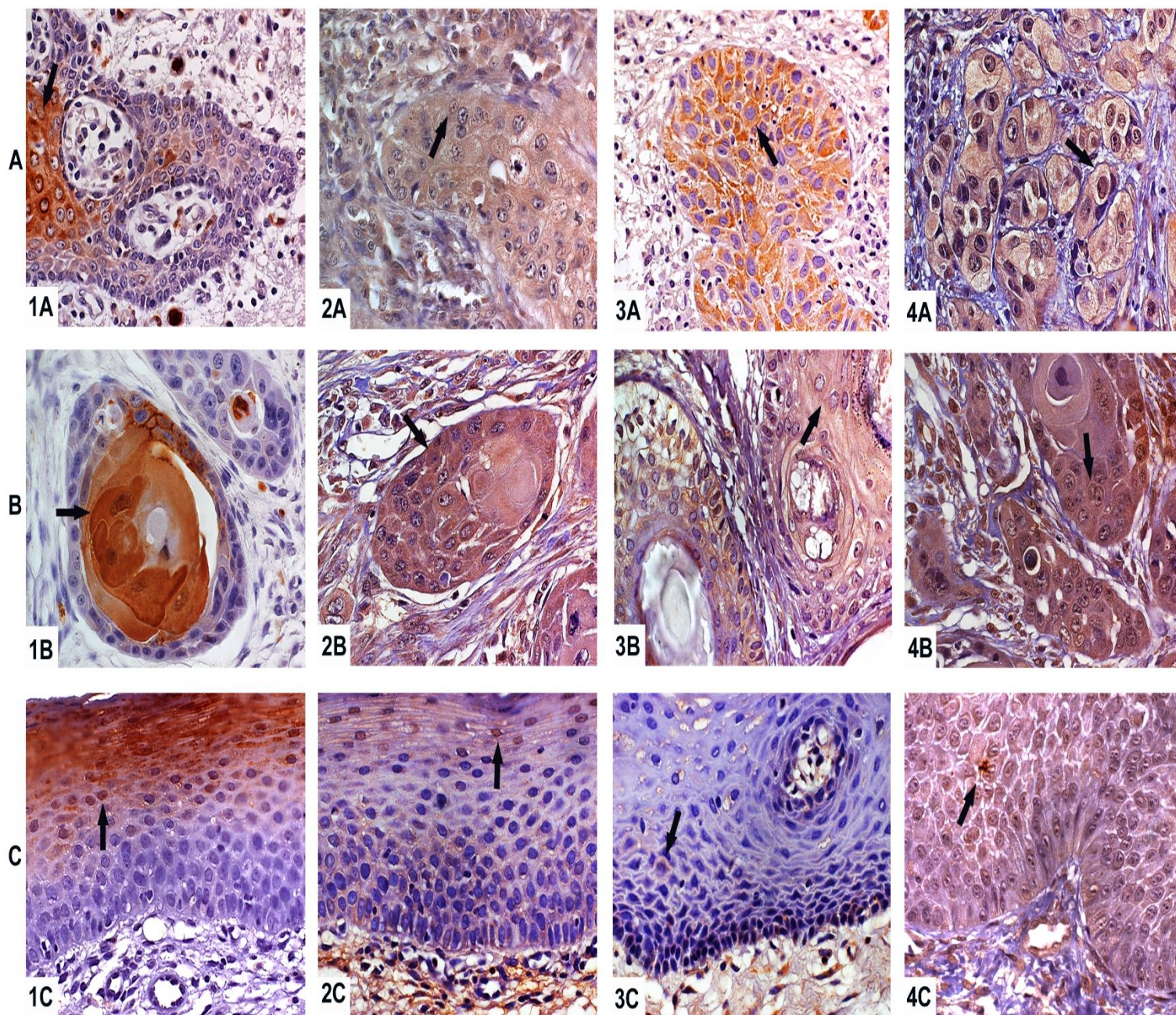
Tabela 3. A correlação entre a expressão das proteínas relacionadas à hipóxia.

<b>Variáveis</b>	<b>HIF1A (<i>p</i>)</b>	<b>NOTCH1 (<i>p</i>)</b>	<b>ADAM12 (<i>p</i>)</b>	<b>HBEGF (<i>p</i>)</b>
<b>HIF1A</b>	-	-	-	-
<b>NOTCH1</b>	0.18	-	-	-
<b>ADAM12</b>	0.74	0.001*	-	-
<b>HBEGF</b>	0.06	0.54	0.28	-

\* $p < 0.05$ , determinado pela Matriz de correlação.

**Figuras**

Figura 1. Padrão de imunomarcção das proteínas relacionadas à hipóxia no CE de fumantes e não fumantes e no epitélio oral normal (grupo controle). Imagens da linha A apresentam a imunomarcção de HIF1A, NOTCH1, ADAM12 e HBEGF no CE de fumantes (Setas apontam a localização da imunomarcção de cada proteína). Imagens da linha B apresentam a imunomarcção de HIF1A, NOTCH1, ADAM12 e HBEGF no CE de não fumantes (Setas apontam a localização da imunomarcção de cada proteína). Imagens da linha C apresentam a imunomarcção de HIF1A, NOTCH1, ADAM12 e HBEGF no grupo controle (Setas apontam a localização da imunomarcção de cada proteína).

**HIF1A****NOTCH1****ADAM12****HBEGF**

## Gráficos

Gráfico 1. Diferença estatística de imunoposição das proteínas relacionadas à hipóxia entre os grupos Carcinoma epidermoide (n=45) e controle (n=14), determinada pelo Teste T de Student e Mann-Whitney.

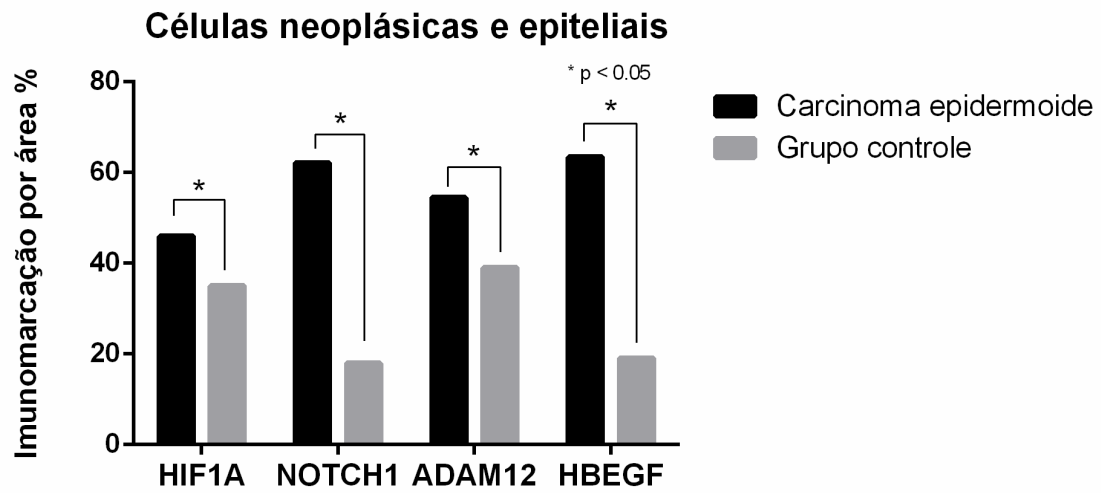
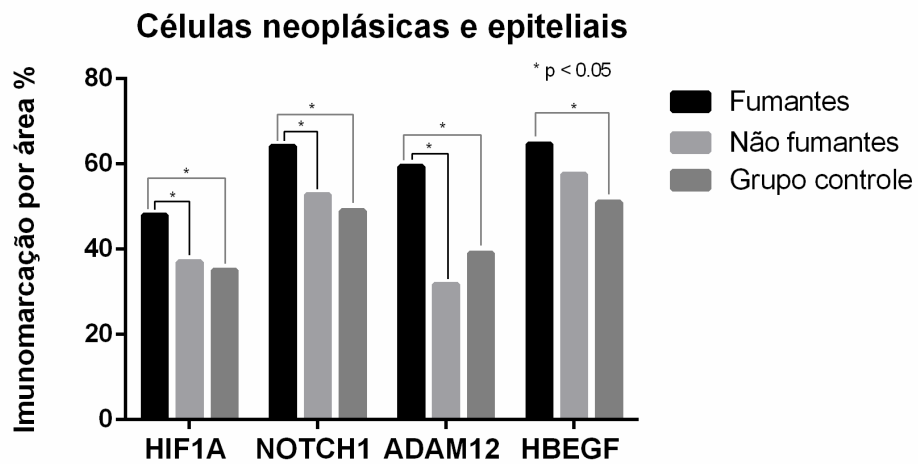


Gráfico 2. Diferença estatística de imunoposição das proteínas relacionadas à hipóxia entre os grupos fumantes (CE, n=37), não fumantes (CE, n=8) e controle (n=14), determinada por ANOVA um critério.



## **Anexo I**

Manuscrito (versão na língua inglesa)

### **Introduction**

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is the sixth most common cancer worldwide and in most cases is caused by smoking habit [1]. HNSCC exhibit an invasion of solitary and/or clustered epithelial cells in the adjacent connective tissue. Equally to most cancer, HNSCC is capable to induce angiogenesis for its own nutrition supply and consequently tumor growth. However, this angiogenesis results in the formation of a deficient and abnormal bloodstream, thereby decreasing blood supply, as well oxygen availability. The low oxygen availability in HNSCC is known as intratumoral hypoxia (IH). IH induces neoplastic proliferation and tumoral growth through series of molecular events [2].

During early stages of tumor development, IH is caused by a deficient blood supply due to structural and functional abnormalities of blood vessels (acute hypoxia), whereas in advanced stages also occurs a poor blood supply, however due to an increase in blood flow distances caused by tumoral growth (chronic hypoxia). Also, a reduced oxygen transportation by hemoglobin (anemic hypoxia) may cause IH. Carbon monoxide (CO) may induce an anemic hypoxic phase in tumor microenvironment, through a bind to hemoglobin, due its strong affinity. This event will prevent the transport of oxygen (O<sub>2</sub>) carried by hemoglobin. Tobacco smoke is the major indoor source of CO, a colorless, odorless and toxic gas [3].

The IH induces the hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (HIF1A). Hypoxia-inducible factor 1 (HIF1) is a heterodimeric protein complex member of the basic helix–loop–helix transcription factor family. HIF1 protein is compound by two subunits, HIF1A and HIF1B (Aryl hydrocarbon nuclear receptor translocator or ARNT). The HIF1B is constitutively expressed and HIF1A is regulated by oxygen tension. In normoxic

microenvironment, HIF1A suffer a rapidly proteasomal degradation (half-life of less than 5 min) by its selective inhibitor, the von Hippel-Lindau protein (VHL). The HIF1A proteasomal degradation requires oxygen and iron, therefore in a hypoxic microenvironment (low oxygen available) HIF1A is activated [4, 5].

Therefore, intratumoral hypoxia directly induces HIF1A activation, which will bind to HIF1B forming HIF1, followed by its translocation to cell nucleus resulting in hypoxic target genes expression responsible for angiogenesis, invasiveness and metastasis in HNSCC [6, 7].

The HIF1A expression increases Jagged 2 (JAG2) levels, a protein member of the NOTCH ligand family. This molecular event will trigger NOTCH1 signaling via JAG2-NOTCH1 bind. NOTCH1 is a transmembrane protein responsible for physiological processes, for example proliferation and apoptosis, also is associated to progression and metastasis in HNSCC [8, 9]. NOTCH1 signaling recruits metalloproteases (MMPs) and  $\gamma$ -secretase complex [10].

The  $\gamma$ -secretase complex cleaves the NOTCH1 intracellular domain (NICD), which is released in cytoplasm and translocate to cell nucleus. At cell nucleus, NICD binds to CSL (CBF1, Suppressor of Hairless, Lag-1), a transcription factor increasing ADAM12 levels [10-12]. Emerging evidences reported NOTCH1 and ADAM12 activation by ROS and RNS (reactive nitrogen species) through Nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) signaling, a transcription factor linked to cell survival and proliferation [13-15].

ADAM12 is a metalloprotease zinc dependent member of adamalysin family. In humans' cells, ADAM12 exhibits two isoforms, ADAM12-L the long transmembrane form, which has a multiple transmembrane domain structure and ADAM12-S a secreted form lacking the transmembrane and cytoplasmic domains [16, 17].

The most relevant activity of ADAM12 is the cleavage of extracellular matrix substrates including collagen IV, fibronectin and gelatin, in fact ADAM12

overexpression has been associated to invadopodia formation, cellular actin-rich structures that aid neoplastic cells invasion [10, 18, 19]. Also, ADAM12 plays a significant role in several growth factors and its receptors cleavage, as the cleavage of HBEGF [20-22].

HBEGF is a transmembrane protein which belongs to epidermal growth factors (EGF) family. This transmembrane protein has two isoforms, an anchored membrane form (proHBEGF) that is cleaved by ADAM12, and the soluble ectodomain form (sHBEGF) released via ADAM12 cleavage. sHBEGF binds to its ligand, the epidermal growth factor receptor (EGFR) activating molecular events like invadopodia formation [10, 23, 24].

Moreover, this cleavage yields a carboxy-terminal fragment of HBEGF (HBEGF-CTF), which translocated from plasma membrane to nucleus. Interestingly, after shedding stimuli proHBEGF also translocate to nucleus. In malignant tumors, HBEGF expression is associated to tumoral proliferation and metastasis [25, 26].

Briefly, it is well-known that smoking habit induces HNSCC development also that hypoxia is a common feature in HNSCC microenvironment. The IH triggers proteins related to neoplastic proliferation, tumoral growth and metastasis through a complex signaling here described. However, it is unclear if there are differences in HNSCC biological behavior regarding hypoxia when comparing smokers and non-smokers patients. Therefore, the aim of this pioneer investigation is to analyze the immunoexpression of hypoxia-related proteins and their possible correlations with clinicopathological variables in HNSCC of smokers and non-smokers patients.

## **Materials and Methods**

This study was approved by the Research Ethics Committees of Ophir Loyola Hospital (Approval number: 904.248) and by Health Sciences Institute of Federal

University of Pará (Approval number: 877.291). Forty-five available cases of HNSCC were selected at the Ophir Loyola Hospital, Belém Pará, Brazil.

### **Immunohistochemistry analysis**

For immunohistochemistry (immunoperoxidase technique) the following primary antibodies were used: Anti-HIF1A (Rabbit Anti-HIF1A Monoclonal Antibody, clone EP1215Y. Millipore, Temecula, CA, USA); Anti-NOTCH1 (Rabbit Anti-NOTCH1 Intracellular Polyclonal Antibody, #07-1231. Millipore, Temecula, CA, USA.); Anti-ADAM12 (Goat Anti-ADAM12 polyclonal antibody ab28747, 0,5mg/ml, Abcam, Paisley, UK) and Anti-HBEGF (Goat Anti-HBEGF Polyclonal Antibody, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). The 45 paraffin-embedded specimens of HNSCC and the 14 normal oral epithelium (control group) were cut on 4.0µm sections and then mounted over organosilane treated slides (Sigma® Chemical. Co. St. Louis, MO, USA). The slides were dewaxed in xylene and rehydrated through a graded series of ethanol solutions. Endogenous peroxidase activity was blocked using 3% hydrogen peroxide in methanol (1:1) for 20 minutes. Antigen retrieval was performed by heating the slides in citrate buffer (pH 6.0) at Pascal pressure chamber (Dako, Carpinteria, CA, EUA) for 30 seconds. For reduce nonspecific immunostaining, 1% bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and phosphate buffered saline (PBS) were applied for 1 hour. Then, the primary antibodies were incubated for 1 hour at followed dilutions: 1:100 of anti-HIF1A; 1:600 of anti-NOTCH1; 1:133 of anti-ADAM12 and 1:15 of anti-HBEGF. EnVision Plus (EnVision Plus, Dako®, Carpinteria, CA, USA) was used as secondary antibody followed by diaminobenzidine (Dako®, Carpinteria, CA, USA) staining and Mayers hematoxylin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) counterstaining. Next, slides were mounted in Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, EUA).

### **Evaluation of proteins immunolabeling**



The brightfield images were photographed from 5 randomly selected areas of each slide using AxioScope A1 microscope equipped with CCD AxioCam HRc camera (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) and 40x objective. The Plug-in Color deconvolution and software ImageJ were respectively used for segmentation and quantification of proteins immunoexpression (%). Based on evidences [26-28], immunolabeling was categorized into 3 patterns: localization (nuclear and/or cytoplasmic), intensity [low ( $\leq 50\%$ ) and high ( $> 50\%$ )] and distribution (uniform or punctate). Software BioEstat 5.0 (BioEstat, Belém, Brazil) was used for statistical analysis.

### **Statistical analysis**

Mann-Whitney and Student t test were applied to compare each protein immunoexpression between HNSCC (n=45) and control group (n=14). Also, Mann-Whitney and T test were applied to compare each protein immunoexpression between smokers (n=37) and non-smokers (n=8). One-way Anova was applied to compare each protein immunoexpression between smokers, non-smokers and control group. Multivariate logistic regression was applied to verify correlations between proteins immunoexpression and clinicopathological data. Matrix correlation test was applied to verify correlations between proteins immunoexpression.

## **Results**

### **Clinicopathological data**

According to Table 1, 91.9% of smokers were male and 8.1% were female, with mean age was 64.13 years and 64.86% had a history of alcohol consumption. Thirty-four non-smokers were male (62.5%) with an average age of 67.12, ranging from 54 to 84 years and one non-smokers had alcohol consumption. Twenty-three smokers (62.16%) were leucodermic, 6 (16.21%) melanodermic and 8 (21.62%) feodermic, while 3 non-

smokers (37.5%) were leucodermic, 2 (25%) melanodermic and 2 (25%) feodermic. A total of 13 smokers (35.13%) were at initial clinical stages (Stages I and II) and 24 (64.86%) at advanced clinical stages (Stages III and IV). Seventy-five percent of non-smokers were at advanced clinical stages and few were at initial clinical stages (25%). Thirteen smokers (35.13%) and five non-smokers (62.5%) had lymph nodes metastasis at anamnesis and 21.62% of smokers presented tumors well-differentiated (Grade I), 45.94% moderately differentiated (Grade II) and 13.51% poorly differentiated (Grade III). While, 37.5% of non-smokers were well-differentiated, 25% moderately differentiated and 25% poorly differentiated. Six smokers and one non-smoker had tumor recurrence after initial treatment within a periodical rate of 5.1 months and 75.67% of smokers and 75% of non-smokers were alive at the end of treatment, within an average treatment period of 6.99 months.

### **HNSCC expressed hypoxia-related proteins**

Hypoxia-related proteins were expressed in all HNSCC (n=45) and control samples. Also, there is a difference ( $p < 0.05$ ) of above-mentioned proteins immunoexpression between HNSCC and control group (Graph 1).

### **HIF1A, NOTCH1 and ADAM12 are upregulated in HNSCC smokers samples**

Classifying HNSCC (n=45) in smokers (n=37) and non-smokers groups (n=8), the HIF1A, NOTCH1 and ADAM12 showed higher immunoexpression ( $p < 0.05$ ) in smokers compared to non-smokers. Despite, HBEGF immunoexpression was discreet higher in smokers, there is no statistical difference between smokers and non-smokers ( $p > 0.05$ ). All hypoxia-related proteins exhibit higher immunoexpression ( $p < 0.05$ ) in smokers compared to control group, while non-smokers and control group has similar proteins immunoexpression (Graph 2).

### **HIF1A, NOTCH1, ADAM12 and HBEGF immunolabeling pattern**

Smokers exhibit a low (47.96%), uniform, nuclear and cytoplasmic HIF1A immunolabeling in neoplastic cells (Figure 1. 1A). Non-smokers showed a similar HIF1A staining pattern with smokers, however with a staining average of 37% (Figure 1. 1B). Control group revealed a low (35%), uniform, nuclear and cytoplasmic staining in epithelial cells (Figure 1. 1C).

NOTCH1 immunolabeling was nuclear, cytoplasmic, high (64.16%) and uniform in smokers' neoplastic cells (Figure 1. 2A) and nuclear, cytoplasmic, high (52.77%) and uniform in non-smokers (Figure 2. 2B) also in control group (epithelial cells) was low (49%), uniform and predominantly cytoplasmic (Figure 1. 2C)

ADAM12 immunolabeling was high (59.44%), uniform and cytoplasmic in neoplastic cells of smokers (Figure 1. 3A). Non-smokers showed a low (31.75%), uniform and cytoplasmic immunostaining pattern (Figure 1. 3B). Control group exhibited a low (39%), uniform and predominantly cytoplasmic immunolabeling in epithelial cells (Figure 1. 3C).

HBEGF immunolabeling was cytoplasmic and nuclear, high (64.68%) and uniform in neoplastic cells of smokers (Figure 1. 4A). A nuclear, cytoplasmic, high (61.54%) and uniform immunostaining was observed in non-smokers neoplastic cells (Figure 1. 4B). Control group showed a high (51%), cytoplasmic and uniform immunolabeling in epithelial cells (Figure 1. 4C).

### **HIF1A, NOTCH1, ADAM12 and HBEGF immunoexpression correlations**

HIF1A immunoexpression revealed a relevant correlation with smoking habit ( $p = 0.04$ ), also the immunoexpression of ADAM12 is associated to lymph nodes metastasis ( $p = 0.03$ ). HIF1A and ADAM12 immunoexpressions does not showed any correlation to

others variables, as well as NOTCH1 and HBEGF immunoexpressions ( $p > 0.05$ ) (Table 2). There is an association between NOTCH1 and ADAM12 immunoexpression ( $p = 0.001$ ), however there is no correlation between the other proteins ( $p > 0.05$ ) (Table 3).

## **Discussion**

Tumoral hypoxia is a common intermittent molecular event in HNSCC microenvironment. The tumoral hypoxia microenvironment induces the overexpression of certain proteins related to proliferation, angiogenesis and tumoral growth. Also, tumoral hypoxia may cause radiotherapy and chemotherapy resistance and lymph-node metastasis, leading to a poor prognosis [4, 13, 29]. Smoking habit is the major etiology of HNSCC [30, 31]. Although, is unknown if there is a difference in HNSCC pathological behavior between smokers and non-smokers.

For this reason, we analyzed the immunoexpression of HIF1A, NOTCH1, ADAM12 and HBEGF, hypoxia-related proteins in HNSCC of smokers and non-smokers. The forty-five HNSCC samples revealed higher hypoxia-related proteins immunoexpression compared to control group, agreeing with a recently described proposed model for invadopodia formation through above-mentioned proteins immunoexpression [10].

Surprisingly, our results change when the forty-five HNSCC samples are classified in smokers and non-smokers. Smokers exhibit a higher immunoexpression of HIF1A, NOTCH1 and ADAM12 and despite an absent statistical difference of HBEGF immunoexpression between smokers and non-smokers, there is a discreet higher immunoexpression in smokers. Therefore, supposes that smoking habit plays a crucial role over HIF1A, NOTCH1 and ADAM12 immunoexpression in HNSCC [30, 32-34].

A similar genetic pattern between smokers and non-smokers HNSCC neoplastic cells was found [35] and supposedly there is a similar HNSCC behavior in both groups.

However, our data revealed higher immunoexpression of HIF1A, NOTCH1 and ADAM12 in HNSCC neoplastic cells of smokers, a strong correlation between HIF1A immunoexpression and smoking habit also between ADAM12 immunoexpression and lymph nodes metastasis. These hypoxia-related proteins contribute to an increased HNSCC progression and metastasis [7, 8, 10, 36] and possibly resulting in a singular tumor behavior in smokers and non-smokers patients.

Tobacco smoke exposure cause genetic mutations in mitochondrial DNA (mtDNA) [37]. Mitochondria is a cytoplasmic organelle with own genetic load responsible for energy production through cellular respiration. In cellular respiration, occurs a glucose conversion into pyruvate (glycolysis) adding O<sub>2</sub> in the glucose molecule, thus releasing energy (ATP) to cell. The mitochondrial DNA mutations occur during or after the transition of premalignant to malignant stage. Furthermore, mtDNA mutations cause increased glycolysis dependence, even in available oxygen episode leading to a mitochondrial respiration impairment, so mtDNA induce more glycolysis by mitochondria, therefore producing more pyruvate [1, 5, 30, 38].

The glycolytic dependence is known as Warburg effect or aerobic glycolysis [6, 7]. Evidences [1, 5, 30, 38] report that high levels of pyruvate (Warburg effect product) directly induce the hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (HIF1A). Therefore, supposes that neoplastic cells of smokers have more mtDNA mutations than neoplastic cells of non-smokers, thus neoplastic cells of smokers exhibit higher HIF1A expression. Indeed, our statistical analysis revealed strong correlation between HIF1A immunoexpression and smoking habit, without any influence of other variables analyzed. Also, was statistically observed higher HIF1A immunoexpression in neoplastic cells of smokers than in non-smokers, suggesting that smoking habit added to IH induces HIF1A higher immunoexpression in smokers.

Despite NOTCH1 and ADAM12 immunoexpression do not show a directly statistical correlation with smoking habit, both immunoexpression proteins are statistically higher in HNSCC samples of smokers. Therefore, it is reasonable to suggest tobacco smoke indirectly influence NOTCH1 and ADAM12 overexpression via HIF1A signaling [10].

Probably, carbon monoxide inhalation also plays a relevant role in HIF1A, NOTCH1 and ADAM12 upregulation in HNSCC of smokers. Tobacco smoke is the major indoor source of carbon monoxide (CO), a colorless, odorless and toxic gas. In bloodstream, carbon monoxide binds to hemoglobin, due to its affinity 200 times greater than with oxygen [3].

This molecular event forms a carboxyhemoglobin molecule (COHb), which hinders oxygen transportation causing a low oxygen availability resulting in a toxic hypoxia [39]. Therefore, possibly occurs an increased hypoxia in neoplastic cells of smokers, due to an inherent intratumoral hypoxia added to a toxic hypoxia caused by smoking habit, resulting in HIF1A, NOTCH1 and ADAM12 upregulation.

NOTCH1 immunoexpression was upregulated in HNSCC samples of smokers and non-smokers (> 50%) and was not correlated with any studied variables, while other scientific evidences [40] founded statistical correlation between clinicopathological variables and NOTCH1 downregulation. Moreover, NOTCH1 is a transmembrane protein that is cleaved and its NICD is translocated to nucleus [10] basing its immunolocalization (cytoplasmic and nuclear) in our data.

ADAM12 immunoexpression was associated with lymph nodes metastasis and showed a predominantly cytoplasmic immunolabeling in smokers and non-smokers. This immunolabeling pattern is linked to an increased neoplastic migration and invasiveness[36]. However, according to our data smokers have a higher possibility of migration, invasion and metastasis due to its ADAM12 higher immunoexpression

compared to non-smokers. Also, there was a strong correlation between NOTCH1 and ADAM12 immunoexpression. Possibly, this correlation occurs because NOTCH1 signaling increase ADAM12 levels [8, 10, 12, 41].

According to our immunohistochemistry data, HIF1A was localized in nucleus and cytoplasm of smokers and non-smokers neoplastic cells, as well others data [42], meanwhile evidences suggest a nuclear solitary immunolocalization and its association to a poor prognosis [43, 44]. However, before HIF1A singling, first occurs a rapidly cytoplasmic accumulation and then occurs its translocation to nucleus [45].

Although there is a statistical difference between smokers and non-smokers HIF1A immunoexpression, both groups revealed low ( $\leq 50\%$ ) immunoexpression, probably because HIF1A overexpression is linked with early stages of carcinomas [46] and in our data, both smokers and non-smokers were in advanced clinical stages. Also, there were no correlations between HIF1A immunoexpression variables analyzed, except with smoking habit agreeing with published associations between HIF1A overexpression and clinicopathological variables [25, 44, 47-49].

Equally, HBEGF nuclear immunolocalization and overexpression are related to HNSCC advanced clinical stages [25, 26, 50]. As above-mentioned, most smokers and non-smokers patients were in advanced clinical stages and both groups exhibit HBEGF overexpression ( $> 50\%$ ), therefore were not found statistical difference between them, despite a discreet higher immunoexpression in smokers. Also, there is no correlations between HBEGF immunoexpression and variables analyzed also no statistical difference between smokers and non-smokers, despite a discreet higher HBEGF immunoexpression in smokers neoplastic cells.

In conclusion, HIF1A, NOTCH1 and ADAM12 together compound a singling pathway induce by IH, which suffer smoke influence in a directly and indirectly manner. The absence of statistical difference of HBEGF immunoexpression between smokers and

non-smokers, suggests a single IH influence, without smoke influence. Intratumoral hypoxia is a HNSCC inherent characteristic and is strongly correlated to progression, invasion and tumoral metastasis, also to chemotherapy and radiotherapy resistance causing a poor prognosis. Thus, hypoxia-related proteins immunoreexpression in HNSCC also are linked to a poor prognosis. Therefore, HIF1A, NOTCH1 and ADAM12 higher immunoreexpression in HNSCC of smokers suggest that smokers show high probability of progression, invasion and tumoral metastasis, also higher chemotherapy and radiotherapy resistance leading to a worse prognosis compared to non-smokers.

### **Acknowledgments**

The author Walessa Brasil da Silva is grateful to CAPES foundation, Ministry of Education of Brazil for funding his scholarship.

### **References**

- [1] Sun W, Zhou S, Chang SS, McFate T, Verma A, Califano JA (2009). Mitochondrial mutations contribute to HIF1alpha accumulation via increased reactive oxygen species and up-regulated pyruvate dehydrogenase kinase 2 in head and neck squamous cell carcinoma *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **15**, 476-484.
- [2] van de Schootbrugge C, Schults EM, Bussink J, Span PN, Grenman R, Pruijn GJ, Kaanders JH, Boelens WC (2014). Effect of hypoxia on the expression of alphaB-crystallin in head and neck squamous cell carcinoma *BMC cancer* **14**, 252.
- [3] Bleecker ML (2015). Carbon monoxide intoxication *Handbook of clinical neurology* **131**, 191-203.
- [4] Tawk B, Schwager C, Deffaa O, Dyckhoff G, Warta R, Linge A, Krause M, Weichert W, Baumann M, Herold-Mende C, et al. (2015). Comparative analysis of transcriptomics based hypoxia signatures in head- and neck squamous cell carcinoma



*Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology.*

- [5] Bardos JI, Ashcroft M (2005). Negative and positive regulation of HIF-1: a complex network *Biochimica et biophysica acta* **1755**, 107-120.
- [6] Goscinski MA, Nesland JM, Giercksky KE, Dhakal HP (2013). Primary tumor vascularity in esophagus cancer. CD34 and HIF1-alpha expression correlate with tumor progression *Histology and histopathology* **28**, 1361-1368.
- [7] Sun G, Hu W, Lu Y, Wang Y (2013). A meta-analysis of HIF-1alpha and esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) risk *Pathology oncology research : POR* **19**, 685-693.
- [8] Yoshida R, Nagata M, Nakayama H, Niimori-Kita K, Hassan W, Tanaka T, Shinohara M, Ito T (2013). The pathological significance of Notch1 in oral squamous cell carcinoma *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **93**, 1068-1081.
- [9] Song X, Xia R, Li J, Long Z, Ren H, Chen W, Mao L (2014). Common and complex Notch1 mutations in Chinese oral squamous cell carcinoma *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **20**, 701-710.
- [10] Diaz B, Yuen A, Iizuka S, Higashiyama S, Courtneidge SA (2013). Notch increases the shedding of HB-EGF by ADAM12 to potentiate invadopodia formation in hypoxia *The Journal of cell biology* **201**, 279-292.
- [11] D'Souza B, Miyamoto A, Weinmaster G (2008). The many facets of Notch ligands *Oncogene* **27**, 5148-5167.
- [12] Li H, Solomon E, Duhachek Muggy S, Sun D, Zolkiewska A (2011). Metalloprotease-disintegrin ADAM12 expression is regulated by Notch signaling via microRNA-29 *The Journal of biological chemistry* **286**, 21500-21510.

- [13] Chen WL, Wang CC, Lin YJ, Wu CP, Hsieh CH (2015). Cycling hypoxia induces chemoresistance through the activation of reactive oxygen species-mediated B-cell lymphoma extra-long pathway in glioblastoma multiforme *Journal of translational medicine* **13**, 389.
- [14] Curry JM, Sprandio J, Cognetti D, Luginbuhl A, Bar-ad V, Pribitkin E, Tuluc M (2014). Tumor microenvironment in head and neck squamous cell carcinoma *Seminars in oncology* **41**, 217-234.
- [15] Yoon S, Woo SU, Kang JH, Kim K, Shin HJ, Gwak HS, Park S, Chwae YJ (2012). NF-kappaB and STAT3 cooperatively induce IL6 in starved cancer cells *Oncogene* **31**, 3467-3481.
- [16] Kveiborg M, Albrechtsen R, Couchman JR, Wewer UM (2008). Cellular roles of ADAM12 in health and disease *The international journal of biochemistry & cell biology* **40**, 1685-1702.
- [17] Uehara E, Shiiba M, Shinozuka K, Saito K, Kouzu Y, Koike H, Kasamatsu A, Sakamoto Y, Ogawara K, Uzawa K, et al. (2012). Upregulated expression of ADAM12 is associated with progression of oral squamous cell carcinoma *International journal of oncology* **40**, 1414-1422.
- [18] Roy R, Wewer UM, Zurakowski D, Pories SE, Moses MA (2004). ADAM 12 cleaves extracellular matrix proteins and correlates with cancer status and stage *The Journal of biological chemistry* **279**, 51323-51330.
- [19] Buccione R, Caldieri G, Ayala I (2009). Invadopodia: specialized tumor cell structures for the focal degradation of the extracellular matrix *Cancer metastasis reviews* **28**, 137-149.
- [20] Frohlich C, Klitgaard M, Noer JB, Kotzsch A, Nehammer C, Kronqvist P, Berthelsen J, Blobel C, Kveiborg M, Albrechtsen R, et al. (2013). ADAM12 is expressed

in the tumour vasculature and mediates ectodomain shedding of several membrane-anchored endothelial proteins *The Biochemical journal* **452**, 97-109.

[21] Albrechtsen R, Kveiborg M, Stautz D, Vikesa J, Noer JB, Kotzsh A, Nielsen FC, Wewer UM, Frohlich C (2013). ADAM12 redistributes and activates MMP-14, resulting in gelatin degradation, reduced apoptosis and increased tumor growth *Journal of cell science* **126**, 4707-4720.

[22] Biadasiewicz K, Fock V, Dekan S, Proestling K, Velicky P, Haider S, Knofler M, Frohlich C, Pollheimer J (2014). Extravillous trophoblast-associated ADAM12 exerts pro-invasive properties, including induction of integrin beta 1-mediated cellular spreading *Biology of reproduction* **90**, 101.

[23] Dateoka S, Ohnishi Y, Kakudo K (2012). Effects of CRM197, a specific inhibitor of HB-EGF, in oral cancer *Medical molecular morphology* **45**, 91-97.

[24] Ohnishi Y, Inoue H, Furukawa M, Kakudo K, Nozaki M (2012). Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor is a potent regulator of invasion activity in oral squamous cell carcinoma *Oncology reports* **27**, 954-958.

[25] Kramer C, Klasmeyer K, Bojar H, Schulz WA, Ackermann R, Grimm MO (2007). Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor isoforms and epidermal growth factor receptor/ErbB1 expression in bladder cancer and their relation to clinical outcome *Cancer* **109**, 2016-2024.

[26] Shimura T, Yoshida M, Fukuda S, Ebi M, Hirata Y, Mizoshita T, Tanida S, Kataoka H, Kamiya T, Higashiyama S, et al. (2012). Nuclear translocation of the cytoplasmic domain of HB-EGF induces gastric cancer invasion *BMC cancer* **12**, 205.

[27] Weber DC, Tille JC, Combescure C, Egger JF, Laouiti M, Hammad K, Granger P, Rubbia-Brandt L, Miralbell R (2012). The prognostic value of expression of HIF1alpha, EGFR and VEGF-A, in localized prostate cancer for intermediate- and high-

risk patients treated with radiation therapy with or without androgen deprivation therapy *Radiation oncology* **7**, 66.

[28] Jokilehto T, Rantanen K, Luukkaa M, Heikkinen P, Grenman R, Minn H, Kronqvist P, Jaakkola PM (2006). Overexpression and nuclear translocation of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase PHD2 in head and neck squamous cell carcinoma is associated with tumor aggressiveness *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **12**, 1080-1087.

[29] Ioannou M, Paraskeva E, Baxevanidou K, Simos G, Papamichali R, Papacharalambous C, Samara M, Koukoulis G (2015). HIF-1alpha in colorectal carcinoma: review of the literature *Journal of BUON : official journal of the Balkan Union of Oncology* **20**, 680-689.

[30] Sun W, Chang SS, Fu Y, Liu Y, Califano JA (2011). Chronic CSE treatment induces the growth of normal oral keratinocytes via PDK2 upregulation, increased glycolysis and HIF1alpha stabilization *PloS one* **6**, e16207.

[31] Weiner D, Khankin EV, Levy Y, Reznick AZ (2009). Effects of cigarette smoke borne reactive nitrogen species on salivary alpha-amylase activity and protein modifications *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* **60 Suppl 5**, 127-132.

[32] Khabour OF, Alzoubi KH, Abu Thiab TM, Al-Husein BA, Eissenberg T, Shihadeh AL (2015). Changes in the expression and protein level of matrix metalloproteinases after exposure to waterpipe tobacco smoke *Inhalation toxicology* **27**, 689-693.

[33] Sun W, Califano JA (2014). Sequencing the head and neck cancer genome: implications for therapy *Annals of the New York Academy of Sciences* **1333**, 33-42.

[34] Shi D, Guo W, Chen W, Fu L, Wang J, Tian Y, Xiao X, Kang T, Huang W, Deng W (2012). Nicotine promotes proliferation of human nasopharyngeal carcinoma cells by

regulating alpha7AChR, ERK, HIF-1alpha and VEGF/PEDF signaling *PloS one* **7**, e43898.

[35] Kolokythas A, Zhou Y, Schwartz JL, Adami GR (2015). Similar Squamous Cell Carcinoma Epithelium microRNA Expression in Never Smokers and Ever Smokers *PloS one* **10**, e0141695.

[36] Rao VH, Kandel A, Lynch D, Pena Z, Marwaha N, Deng C, Watson P, Hansen LA (2012). A positive feedback loop between HER2 and ADAM12 in human head and neck cancer cells increases migration and invasion *Oncogene* **31**, 2888-2898.

[37] Ju YS, Alexandrov LB, Gerstung M, Martincorena I, Nik-Zainal S, Ramakrishna M, Davies HR, Papaemmanuil E, Gundem G, Shlien A, et al. (2014). Origins and functional consequences of somatic mitochondrial DNA mutations in human cancer *eLife* **3**.

[38] Ralph SJ, Rodriguez-Enriquez S, Neuzil J, Saavedra E, Moreno-Sanchez R (2010). The causes of cancer revisited: "mitochondrial malignancy" and ROS-induced oncogenic transformation - why mitochondria are targets for cancer therapy *Molecular aspects of medicine* **31**, 145-170.

[39] Krzych-Falta E, Modzelewska D, Samolinski B (2015). Levels of exhaled carbon monoxide in healthy active and passive smokers *Przegląd lekarski* **72**, 99-102.

[40] Ravindran G, Devaraj H (2012). Aberrant expression of beta-catenin and its association with DeltaNp63, Notch-1, and clinicopathological factors in oral squamous cell carcinoma *Clinical oral investigations* **16**, 1275-1288.

[41] Sakamoto K, Fujii T, Kawachi H, Miki Y, Omura K, Morita K, Kayamori K, Katsube K, Yamaguchi A (2012). Reduction of NOTCH1 expression pertains to maturation abnormalities of keratinocytes in squamous neoplasms *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **92**, 688-702.

- [42] Vasconcelos MG, Vasconcelos RG, Pereira de Oliveira DH, de Moura Santos E, Pinto LP, da Silveira EJ, Queiroz LM (2015). Distribution of Hypoxia-Inducible Factor-1alpha and Glucose Transporter-1 in Human Tongue Cancers *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* **73**, 1753-1760.
- [43] Luo JC, Shibuya M (2001). A variant of nuclear localization signal of bipartite-type is required for the nuclear translocation of hypoxia inducible factors (1alpha, 2alpha and 3alpha) *Oncogene* **20**, 1435-1444.
- [44] Fan Y, Li H, Ma X, Gao Y, Chen L, Li X, Bao X, Du Q, Zhang Y, Zhang X (2015). Prognostic Significance of Hypoxia-Inducible Factor Expression in Renal Cell Carcinoma: A PRISMA-compliant Systematic Review and Meta-Analysis *Medicine* **94**, e1646.
- [45] To KK, Huang LE (2005). Suppression of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) transcriptional activity by the HIF prolyl hydroxylase EGLN1 *The Journal of biological chemistry* **280**, 38102-38107.
- [46] Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Skarlatos J, Corti L, Blandamura S, Piazza M, Gatter KC, Harris AL (2001). Hypoxia inducible factor (HIF-1a and HIF-2a) expression in early esophageal cancer and response to photodynamic therapy and radiotherapy *Cancer research* **61**, 1830-1832.
- [47] Chai DM, Bao ZQ, Hu JG, Ma L, Feng ZZ, Tao YS (2013). Vasculogenic mimicry and aberrant expression of HIF-1alpha/E-cad are associated with worse prognosis of esophageal squamous cell carcinoma *Journal of Huazhong University of Science and Technology Medical sciences = Hua zhong ke ji da xue xue bao Yi xue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao Yixue Yingdewen ban* **33**, 385-391.
- [48] Zhang L, Ye SB, Li ZL, Ma G, Chen SP, He J, Liu WL, Xie D, Zeng YX, Li J (2014). Increased HIF-1alpha expression in tumor cells and lymphocytes of tumor

microenvironments predicts unfavorable survival in esophageal squamous cell carcinoma patients *International journal of clinical and experimental pathology* **7**, 3887-3897.

[49] Honguero Martinez AF, Arnau Obrer A, Figueroa Almanzar S, Leon Atance P, Guijarro Jorge R (2014). Analysis of Expression of Vascular Endothelial Growth Factor A and Hypoxia Inducible Factor-1alpha in Patients Operated on Stage I Non-Small-Cell Lung Cancer *Lung cancer international* **2014**, 810786.

[50] Hayes KE, Walk EL, Ammer AG, Kelley LC, Martin KH, Weed SA (2013). Ablson kinases negatively regulate invadopodia function and invasion in head and neck squamous cell carcinoma by inhibiting an HB-EGF autocrine loop *Oncogene* **32**, 4766-4777.

**Tables**

Table 1. Clinicopathological data.

<b>Variable</b>	<b>Smokers No. (%)</b>	<b>Non-smokers No. (%)</b>
Total cases	37 (82.22%)	8 (17.77%)
Age (Years)		
Median	64.13	67.12
Range	33-92	54-84
Gender		
Male	34 (91.89%)	5 (62.5%)
Female	3 (8.10%)	3 (37.5%)
Race		
Melanodermic	6 (16.21%)	2 (25%)
Leucodermic	23 (62.16%)	3 (37.5%)
Feodermic	7 (18.91%)	3 (37.5%)
Alcohol consumption		
Yes	24 (64.86%)	1 (12.5%)
No	13 (35.13%)	7 (87.5%)
TNM clinical stage		
Stage I-II	13 (35.13%)	2 (25%)
Stage III-IV	24 (64.86%)	6 (75%)
Lymph nodes (N) status		
N0	24 (64.86%)	5 (62.5%)
N+	13 (35.13%)	2 (25%)
Histological grade		
I	8 (21.62%)	3 (37.5%)
II	17 (45.94%)	2 (25%)
III	5 (13.51%)	2 (25%)
Recurrence		
Yes	6 (16.21%)	1 (12.5%)
No	31 (83.78%)	7 (87.5%)
Death		
Yes	9 (24.32%)	2 (25%)
No	28 (75.67%)	6 (75%)



Table 2. HIF1A, NOTCH1, ADAM12 and HBEGF immunoexpression correlations with clinicopathological variables.

Variable	HIF1A		NOTCH1		ADAM12		HBEGF	
	<i>OR (CI 95%)</i>	<i>(p)</i>	<i>OR (CI 95%)</i>	<i>(p)</i>	<i>OR (CI 95%)</i>	<i>(p)</i>	<i>OR (CI 95%)</i>	<i>(p)</i>
Smoking habit	10.43 (1.01-107.90)	0.04*	1.78 (0.22-14.27)	0.58	226214.62 (0.00-∞)	0.67	1.2 (0.16-9.35)	0.85
Alcohol consumption	0.68 (0.17-2.74)	0.59	1.77 (0.29-10.69)	0.53	3.54 (0.34-36.94)	0.28	1.08 (0.2-5.86)	0.92
TNM Clinical Stage	0.54 (0.13-2.21)	0.39	1.55 (0.32-7.65)	0.58	5.4 (0.52-55.76)	0.15	0.55 (0.09-3.45)	0.53
Lymph nodes metastasis	1.64 (0.39-6.88)	0.49	0.44 (0.09-2.21)	0.32	0.08 (0.01-0.86)	0.03*	2.31 (0.37-14.55)	0.36
Recurrence	1.1 (0.17-7.31)	0.91	26557.81(0.00-∞)	0.86	2.54 (0.09-69.75)	0.58	0.44 (0.06-3.48)	0.43
Death	1.49(0.31-7.26)	0.62	3.01 (0.29-31.10)	0.35	24221.18 (0.00-∞)	0.76	0.63 (0.11-3.58)	0.6

\* $p < 0.05$ , as determined by Multivariate logistic regression. OR: Odds ratio; CI: Confidence Interval.

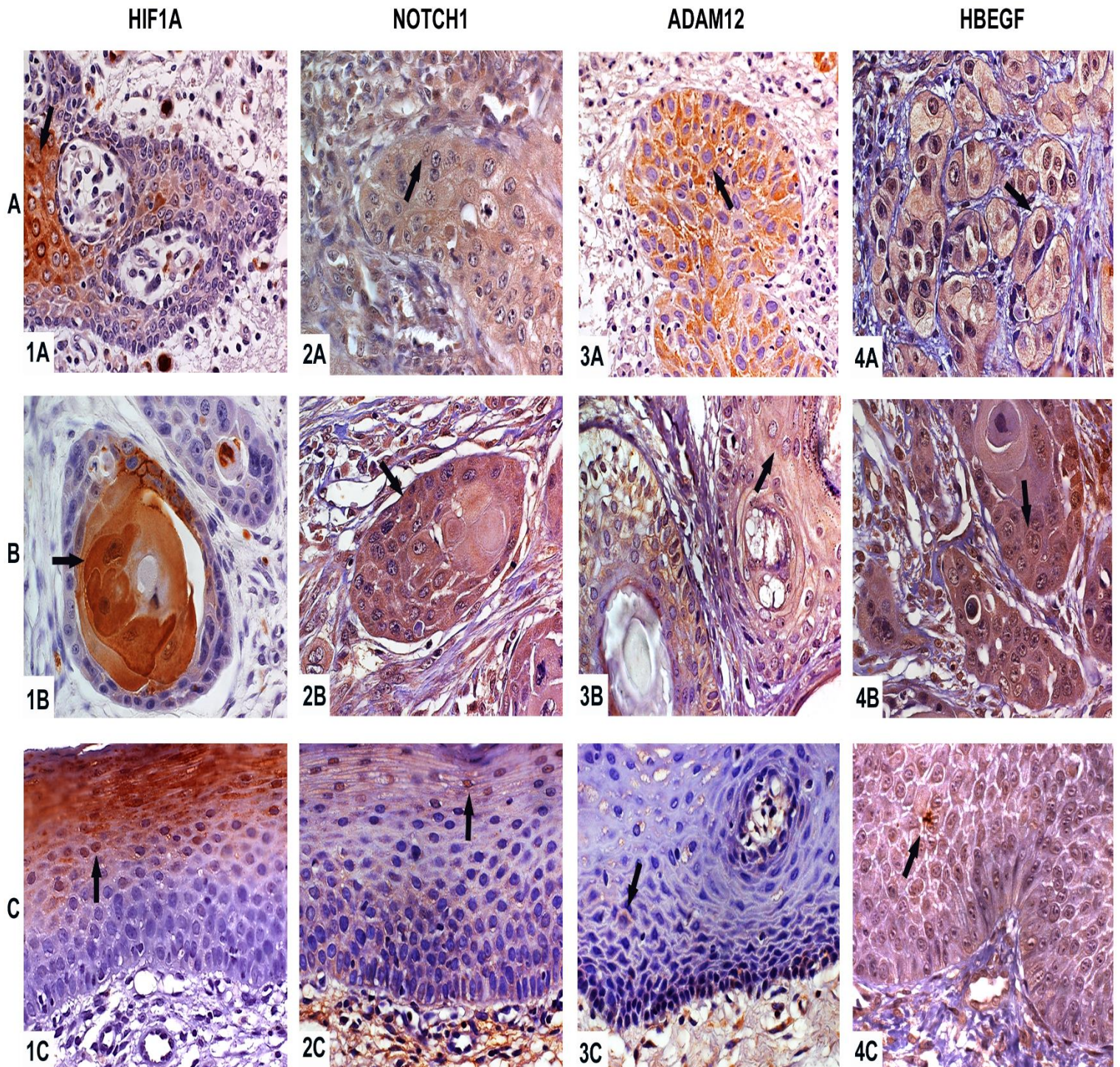
Table 3. Correlations between hypoxia-related proteins.

<b>Variable</b>	<b>HIF1A (<i>p</i>)</b>	<b>NOTCH1 (<i>p</i>)</b>	<b>ADAM12 (<i>p</i>)</b>	<b>HBEGF (<i>p</i>)</b>
<b>HIF1A</b>	-	-	-	-
<b>NOTCH1</b>	0.18	-	-	-
<b>ADAM12</b>	0.74	0.001*	-	-
<b>HBEGF</b>	0.06	0.54	0.28	-

\* $p < 0.05$ , as determined by Matrix correlation.

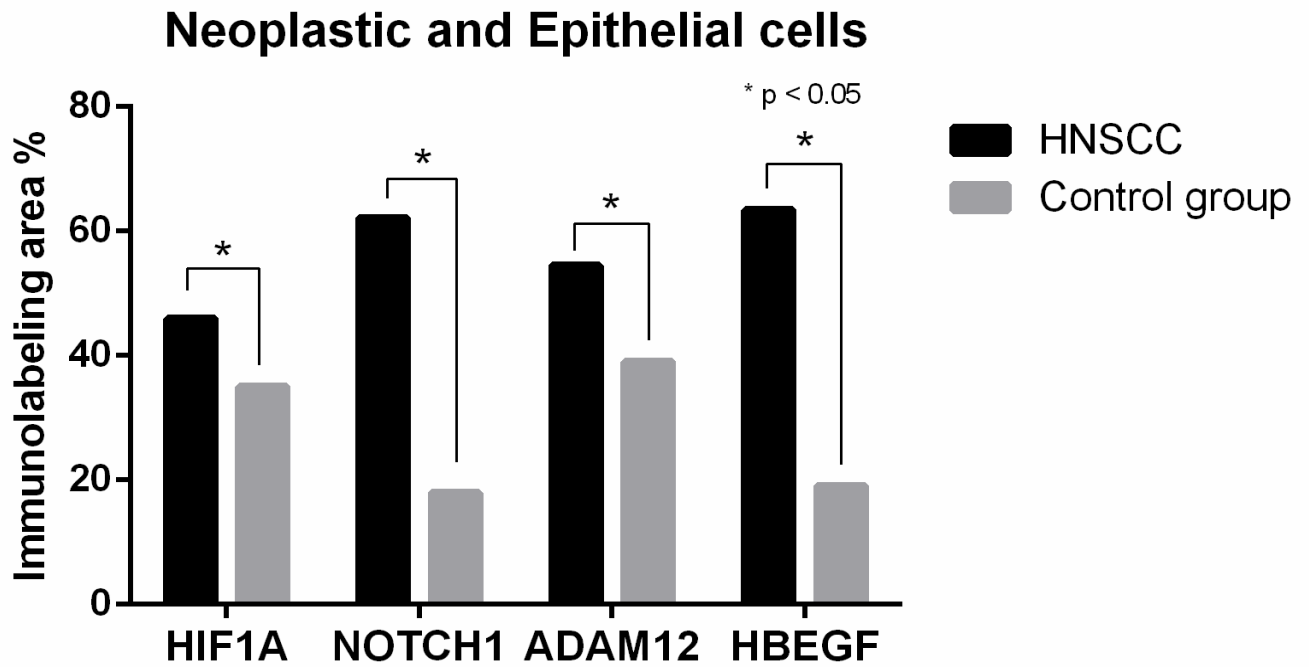
## Figures

Figure 1. Hypoxia-related proteins immunolabeling pattern in HNSCC of smokers and non-smokers and normal oral epithelium (control group). Line A images exhibit HIF1A, NOTCH1, ADAM12 and HBEGF immunolabeling in smokers samples (Arrows indicates immunolabeling localization of each protein). Line B images exhibit HIF1A, NOTCH1, ADAM12 and HBEGF immunolabeling in non-smokers samples (Arrows indicates immunolabeling localization of each protein). Line C images exhibit HIF1A, NOTCH1, ADAM12 and HBEGF immunolabeling in control group samples (Arrows indicates immunolabeling localization of each protein).



## Graphs

Graph 1. Statistical difference (Student T test and Mann-Whitney), of hypoxia-related proteins HNSCC (n=45) and control group (n=14).



Graph 2. Statistical difference (One-way ANOVA), of hypoxia-related proteins between smokers (HNSCC, n=37), non-smokers (HNSCC, n=8) and control group (n=14).

