

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS

Sabrina Ferreira de Jesus

Investigação de marcadores de hipóxia em neoplasias benignas e malignas
de glândulas salivares e o papel do HIF-1 α no carcinoma de células
escamosas de boca sob radiação

Montes Claros

2017

Sabrina Ferreira de Jesus

Investigação de marcadores de hipóxia em neoplasias benignas e malignas de glândulas salivares e o papel do HIF-1 α no carcinoma de células escamosas de boca sob radiação

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências em Saúde da Universidade Estadual de Montes Claros-Unimontes, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Mecanismos e aspectos clínicos das doenças.

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Sena Guimarães

Coorientadora: Prof(a). Dra Lucyana Conceição Farias

Montes Claros

2017

Jesus, Sabrina Ferreira de.

J58i

Investigação de marcadores de hipóxia em neoplasias benignas e malignas de glândulas salivares e o papel do HIF- α no carcinoma de células escamosas de boca sob radiação [manuscrito] / Sabrina Ferreira de Jesus. – 2017.

92 f. : il.

Inclui Bibliografia.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Montes Claros - Unimontes, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde/PPGCS, 2017.

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Sena Guimarães.

Orientadora: Profa. Dra. Lucyana Conceição Farias.

1. Câncer – Boca - Carcinoma de células escamosas. 2. Neoplasia de glândula salivar. 3. Radiação ionizante. I. Guimarães, André Luiz Sena. II. Farias, Lucyana Conceição. III. Universidade Estadual de Montes Claros. IV. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS

Reitor: Professor João dos Reis Canela

Vice-reitor: Professor Antônio Alvimar Souza

Pró-reitor de pesquisa: Professor Virgílio Mesquitas Gomes

Coordenadoria de Acompanhamento de Projetos: Karen Torres C. L. de Almeida

Coordenadoria de Iniciação Científica: Afrânio Farias de Melo

Coordenadoria de Inovação Tecnológica: Dario Alves de Oliveira

Pró-reitor de Pós-graduação: Professor Hercílio Martelli Júnior

Coordenadoria de Pós-graduação Lato-sensu: Felipe Fróes Couto

Coordenadoria de Pós-graduação Stricto-sensu: Idenílson Meireles Barbosa

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Coordenador: Marise Fagundes Silveira

Coordenador adjunto: Luiz Fernando Rezende



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



MESTRANDO(A): SABRINA FERREIRA DE JESUS.

TÍTULO DO TRABALHO: "Investigação de Marcadores de Hipóxia em Neoplasias Salivares Benignas e Malignas e o papel do HIF-1 α sob radiação no Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço".

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Mecanismos e Aspectos Clínicos das Doenças.

LINHA DE PESQUISA: Etiopatogenia e Fisiopatologia das Doenças .

BANCA (TITULARES)

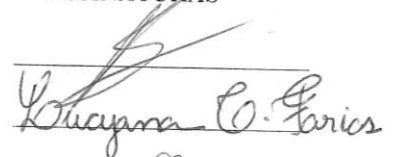
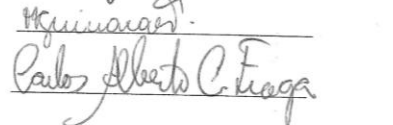
PROF. DR. ANDRÉ LUIZ SENA GUIMARÃES ORIENTADOR/PRESIDENTE

PROF^a. DR^a. LUCYANA CONCEIÇÃO FARIAS

PROF^a. DR^a. TALITA ANTUNES GUIMARÃES

PROF. DR. CARLOS ALBERTO DE CARVALHO FRAGA

ASSINATURAS



Lucyana C. Farias
Talita Antunes Guimarães
Carlos Alberto C. Fraga

BANCA (SUPLENTE)

PROF. DR. ALFREDO MAURÍCIO BATISTA DE PAULA

PROF. DR. JOÃO MARCUS DE OLIVEIRA ANDRADE

ASSINATURAS

APROVADA

REPROVADA

Hospital Universitário Clemente Farias – HUCF

<http://www.unimontes.br> / ppgcs@unimontes.br

Telefone: (0xx38) 3224-8372 / Fax: (0xx38) 3224-8372

Av. Cula Mangabeira, 562, Santo Expedito, Montes Claros – MG, Brasil – Cep: 39401-001

*Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Maria das Mercês e José Hermes, meus eternos professores, exemplos de dignidade, caráter e amor. Minha gratidão por sempre acreditarem nos meus sonhos e nunca duvidarem disso!! Minha irmã Sarah!!
Minhas palavras de gratidão não são suficientes! A palavra amar te descreve!*

Obrigada por tudo!

Amo vocês!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Deus. Por tudo que Ele fez, faz e fará por mim. Obrigada Deus por me mostrar o real sentido da vida. Tu és meu guia, minha luz. Deus é meu tudo!

À minha mãe guerreira, Maria da Mercês, minha maior provedora. Te agradeço por cada detalhe que me proporciona meios para seguir em busca dos meus sonhos que se tornam os seus também. Obrigada por todo amor e dedicação que tens mostrado durante toda minha vida.

Ao meu querido pai, José Hermes, pelas palavras de sabedoria, paciência, amor e fé. Obrigada pai por sempre me mostrar que meu caráter é o mais precioso que tenho. Obrigada por me mostrar todo dia que Jesus é o centro de minha vida.

À minha maninha, Sarah, que literalmente é minha alma gêmea. Obrigada por andar comigo, lado a lado. Cada vitória alcançada sinto a real torcida e alegria vinda de você. Sua alegria me motiva a cada dia fazer e dar o meu melhor.

Ao meu irmão, Juneo, pela torcida. Por sempre ter a certeza que iria vencer! Obrigada por acreditar tanto em mim.

Ao meu cunhado, Hugo, pelo carinho, pelo apoio e por estar sempre presente em minha família.

À minha amiga e irmã, Carla, pelo apoio e entusiasmo. Pela torcida em minhas conquistas e pelos bons conselhos.

Ao meu namorado, Douglas, pela paciência, por me ouvir nos momentos mais difíceis. Obrigada Amoh por sempre me fazer acreditar que vale a pena, que desistir é para os fracos.

Aos meus tios, tias, primos e primas que estão sempre na torcida.

Aos meus Amigos da Igreja Adventista do Sétimo dia, pela compreensão, torcida, carinho e pelas orações sinceras!

Ao meu Orientador Dr. André Luiz Sena Guimarães. Tao difícil de descrever!! Não te agradeço pela doçura, pelo carinho, pelas palavras brandas. Mas te agradeço pela sinceridade, pelas repreensões e até pelos “torras”. Obrigada por acreditar em mim. Obrigada pelo seu jeito de ser! Mesmo sendo desse jeito, mas você é único!!

À Dra. Lucyana Conceição Farias, que sempre esteve presente para tirar as mínimas dúvidas. Professora e pesquisadora incrível!! Obrigada pelo amor e dedicação em tudo que faz.

Ao Dr. Carlos Alberto de Carvalho Fraga, que me deu a oportunidade de ser Iniciação científica no Laboratório de Pesquisa em Saúde. Obrigada pela orientação, pelos primeiros ensinamentos e publicações. Foi o diferencial na minha vida científica.

Aos professores Dr. Alfredo Maurício e Dr. Sérgio Santos, pela disposição e atenção em todas vezes que precisava da colaboração de vocês.

À Marcela e Emisael meus colegas de graduação, colegas de laboratório, colegas de mestrado e principalmente meus Amigos para a vida toda!! Vocês são fundamentais hoje e sempre!

À Eloá e Lilian pelo companheirismo e sempre dispostas a ajudar. Obrigada meninas pela parceria e amizade.

À Eliane Sobrinho pela paciência!! Obrigada Li por sempre dar um jeito para algo que aparentemente não tínhamos como resolver. Podemos dizer que você foi o nosso Anjo.

Aos ICs Amanda(s), Guilherme, Júlia, Lorena(s), Suely e Tayslla pela disposição em tudo que lhes confiava.

Aos colegas de laboratório, Alanna, Andreia, Amanda Souto, Amanda Eudora, Daniel, Deborah, Jaciara, Janaina, Magda, Luiz Paulo, Karina, Eri, Raquel, pelos momentos de risadas, tensões, dificuldades e vitórias. Momentos inesquecíveis.

Aos colegas de laboratório que não estão mais presentes conosco, que seguiram seus sonhos. Obrigada Agostinho, Camila, Carla, Fabiano, Isabelle, Patrícia, Keila, Lucas, Mayane, Marcos, João Marcus, Talita, Rosângela, Stéphaney, Simone, Tatiana Carvalho. Cada um de vocês participaram da minha vida ao longo desses anos no Laboratório de Pesquisa em Saúde.

À Maria Paula, Marileide e Lourdes pela competência, carinho e amizade. Vocês são 1.000!

Aos avaliadores da defesa de dissertação, por aceitarem dispensar parte de seu tempo à análise crítica deste trabalho.

À Capes, pela bolsa concedida. E pelo financiamento do trabalho.

Enfim, todos vocês foram fundamentais para a realização desse sonho! Meus sinceros Agradecimentos!

Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,

Mas lutei para que o melhor fosse feito.

Não sou o que deveria ser,

Mas Graças a Deus, não

Sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

RESUMO

O câncer está entre as causas mais comuns de morbidade e mortalidade no mundo. Dentre as neoplasias malignas de epitélio, está o carcinoma de células escamosas que compreende mais de 90% dos cânceres de cabeça e pescoço, sendo o sexto tipo de câncer mais comum em todo o mundo representados em sua maioria por carcinoma de células escamosas (CCEP) e em parte por neoplasias de glândulas salivares (NGSs). O carcinoma de células escamosas de boca (CCEB) é um importante problema de saúde pública, sendo o tipo mais comum de neoplasia maligna oral. A hipóxia na neoplasia está associada a uma maior resistência à radiação ionizante e a vários tipos de quimioterapia. A principal proteína da via da hipóxia é o fator induzido por hipóxia-1 α (HIF-1 α), o qual é um fator de transcrição que tem como alvo diversos genes que promovem adaptações sob condições hipóxicas e tem sido amplamente estudado. Altos níveis de expressão dessa proteína está associado a um pior prognóstico em diversos tipos de neoplasias. Alterações epigenéticas têm se mostrado importantes no contexto das neoplasias de cabeça e pescoço. MiR-210 é miRNA induzido por hipóxia, regulado pelo HIF-1 α e exerce vários papéis na célula, como inibir a apoptose e aumentar a angiogênese. Estudos têm demonstrado grande potencial como biomarcador no diagnóstico e prognóstico de diversos tipos de neoplasias. A bioinformática é uma importante ferramenta para avaliação de diversos fenômenos. O presente estudo teve como objetivo testar duas hipóteses sob o impacto dos componentes genéticos e epigenéticos no CCEB e NGSs: A primeira hipótese foi analisar se os níveis de marcadores de hipóxia HIF-1 α e miR-210 em NGSs benignas e malignas estão altamente expressos e se estes marcadores hipóxicos estão envolvidos nos principais processos associados à quimioterapia em NGSs através de análise de bioinformática. A avaliação da expressão do HIF-1 α e do miR-210 ocorreu através de qRT-PCR em 21 amostras, incluindo 7 (33,33%) de NGSs malignas, 7 (33,33%) de NGSs benignas e 7 de tecido salivar não neoplásico. Análise bioinformática para identificar os principais processos biológicos envolvidos com a aplicação de quimioterapia em (NGSs), foi realizada. Não houve diferença entre os níveis de HIF-1 α e miR-210 em neoplasias benignas e malignas de glândulas salivares, em comparação com o grupo controle de glândula salivar normal. A análise de bioinformática demonstrou que processos relacionados com o DNA e divisão celular, são os mais importantes para NGSs.

A segunda hipótese foi analisar se o efeito da radioterapia diminui os níveis de HIF-1 α e miR-210 em pacientes com carcinoma de células escamosas de boca. Para isso foram utilizadas amostras de sangue de nove pacientes com CCEB e nove amostras de sangue de pacientes controle, que foram submetidas a análise da expressão do mRNA de HIF-1 α e miR-210. Além disso, a linhagem de células imortalizadas SCC9 foram submetidas ao tratamento hipóxico e de radiação, seguidas da análise de migração e expressão do HIF-1 α mRNA e miR-210. A radiação sob hipóxia não diminui os níveis de HIF-1 α e miR-210, mas aumenta a capacidade de migração das células neoplásicas.

Palavras-Chave: Carcinoma de células escamosas de boca. HIF-1 α . miR-210. Neoplasia de glândula salivar. Radiação ionizante.

ABSTRACT

Cancer is among the most common causes of morbidity and mortality in the world. Among malignant epithelial neoplasms is squamous cell carcinoma comprising more than 90% of cancers of the head and neck, being the sixth most common type of cancer in the world represented mostly by squamous cell carcinoma (HNSCC) and in part by salivary gland neoplasias (SGNs). Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is an important public health problem, being the most common type of oral malignancy. Tumor hypoxia is associated with increased resistance to ionizing radiation and various types of chemotherapy. The main protein of the hypoxia pathway is a factor induced by hypoxia-1 α (HIF-1 α), which is a transcription factor that targets several genes that promote adaptations under hypoxic conditions and has been extensively studied. High levels of expression of this protein are associated with a worse prognosis in several types of tumors. Epigenetic changes have been shown to be important in the context of head and neck neoplasms. MiR-210 is a hypoxia-induced gene, regulated by HIF-1 α and exerts several roles in the cell, such as inhibiting apoptosis and increasing angiogenesis. Studies have demonstrated great potential as a biomarker for the diagnosis and prognosis of various types of neoplasias. Epigenetic changes have been shown to be important in the context of head and neck neoplasms. MiR-210 is a hypoxia-induced gene, regulated by HIF-1 α and exerts several roles in the cell, such as inhibiting apoptosis and increasing angiogenesis. Studies have demonstrated great potential as a biomarker in the diagnosis and prognosis of various types of neoplasms. Bioinformatics is an important tool for the evaluation of several phenomena. The present study aimed to test two hypotheses under the impact of genetic and epigenetic components in oral squamous cell carcinoma (OSCC) and SGNs: The first hypothesis was to analyze whether the levels of HIF-1 α and miR-210 hypoxia markers in benign and malignant SGNs are highly expressed and whether these hypoxic markers are involved in the main processes associated with chemotherapy in SGNs through bioinformatics analysis. Evaluation of the expression of HIF-1 α and miR-210 occurred through qRT-PCR in 21 samples, including 7 (33.33%) of malignant SGNs, 7 (33.33%) benign SGNs and 7 of salivary tissue not neoplastic. Bioinformatics analysis to identify the major biological processes involved with the application of chemotherapy in (SGNs) was performed. There was no difference in HIF-1 α and miR-210 expression in either

benign or malignant neoplasias of salivary glands, as compared to control, non-neoplastic salivary glands. Finally, bioinformatic analyses revealed the most robust alterations in processes specifically related to DNA and cellular division in SGNs. The second hypothesis was to analyze whether the effect of radiotherapy reduces the levels of HIF-1 α and miR-210 in patients with oral squamous cell carcinoma. For this purpose, blood samples from nine patients with OSCC and nine blood samples from control patients were used, which were subjected to analysis of HIF-1 α and miR-210 mRNA expression. In addition, the immortalized SCC9 cell line was subjected to hypoxia and radiation treatment, followed by migration and expression analysis of HIF-1 α mRNA and miR-210. Hypoxia radiation does not decrease levels of HIF-1 α and miR-210, but increases the migration capacity of neoplastic cells.

Key-words: Oral squamous cell carcinoma. HIF-1 α . Mir-210. Salivary gland neoplasia. Ionizing radiation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 Mecanismo do HIF-1 α em condições de normóxia e hipóxia.
- Figura 2 Mecanismo do MiRNAs.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	23
2.1 Objetivo Geral.....	23
2.2 Objetivos Específicos.....	23
3 PRODUTOS	24
3.1 Artigo 1 Investigation of Hypoxia Markers in Benign and Malignant Salivary Neoplasms.....	25
3.2 Artigo 2 The effect of ionizing radiation on HIF-1 α and miR-210 under hypoxia in Oral Cancer.....	41
4 CONCLUSÕES.....	59
REFERÊNCIAS.....	60
APÊNDICES.....	66
ANEXOS.....	84

1. INTRODUÇÃO

1.1 Carcinoma de células escamosas de boca

O câncer está entre as causas mais comuns de morbidade e mortalidade no mundo, com cerca de 14 milhões de novos casos e 8 milhões de mortes em 2012 (1). Há previsão para um aumento de aproximadamente 20 milhões de novos casos em 2030 (2). Dentre as neoplasias malignas de epitélio, está o carcinoma de células escamosas que compreende mais de 90% dos cânceres de cabeça e pescoço e surge a partir do revestimento escamoso das superfícies da mucosa do trato aerodigestivo superior, incluindo a cavidade oral, faringe, laringe e trato sinusal. Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CECP) é o sexto tipo de câncer mais comum em todo o mundo, e apenas 50% a 60% dos pacientes estarão vivos em 5 anos após o diagnóstico (3, 4). O carcinoma de células escamosas orais (CCEB) é um importante problema de saúde pública, sendo o tipo mais comum de neoplasia maligna oral (1).

O tabagismo e o consumo de álcool, são os fatores de risco mais importantes descritos atualmente. Os dois fatores têm um efeito sinérgico (5). Porém, fatores intrínsecos individuais também exercem importante papel no desenvolvimento e prognóstico do câncer (6). Além disso, um subgrupo de CECP, particularmente aqueles da orofaringe, é causada por infecção com os tipos do papilomavírus humano (HPV) de alto risco (7).

O tratamento pode oferecer condições mórbidas, resultar em déficits funcionais, bem como danos estéticos significativos, tais como deficiência da fala, deglutição e deformidade facial (1). O insucesso do tratamento e recidiva loco-regional são comuns (2, 3) e são responsáveis pela maioria das mortes (4). A sobrevida em cinco anos é acima de 80% nos estágios iniciais, caindo para cerca de 40% na presença de metástases linfonodais e 20% na presença de metástase à distância (5, 6). Apesar do melhor conhecimento da biologia tumoral e do surgimento de novas drogas, a cirurgia continua sendo o tratamento padrão, estando a radioterapia, associada ou não à quimioterapia, indicada nos casos iniciais ou em adjuvância ao tratamento cirúrgico, sendo indicada ainda, nos casos irresssecáveis ou em protocolos para preservação de órgãos (5, 7, 8). A resistência ao tratamento e recidiva são comuns apesar da terapia multimodal, e têm sido associados a hipóxia (9, 10).

1.2 As neoplasias de glândulas salivares

As neoplasias de glândulas salivares (NGSs) consistem em um grupo de lesões heterogêneas com características clínico-patológicas complexas e comportamentos biológicos distintos (17, 18). As glândulas parótida, submandibular e sublingual são as glândulas maiores. As glândulas salivares menores estão presentes em muitos locais, tais como os lábios, gengiva, bochecha, palato, língua, orofaringe, seios paranasais e espaço parafaríngeo (19). As neoplasias de glândulas salivares são lesões relativamente raras, representando 3-10% de todas as neoplasias de cabeça e pescoço (17). A incidência global dessas neoplasias é de 0,4-13,5 por 100.000 pessoas por ano (19).

Existem inúmeros estudos epidemiológicos de NGSs em diferentes países, com resultados variados, provavelmente seja devido diferenças na origem do estudo (médica ou de centros odontológicos), divergências na classificação histológica, estudo de uma população específica, localização anatômica, ou o tipo da neoplasia (20). A maioria das neoplasias de glândulas salivares são localizadas na glândula parótida, seguido pela glândula submandibular e glândulas salivares menores. As neoplasias benignas são mais frequentes do que as malignas (19-21). Os estudos epidemiológicos mostram claramente que adenoma pleomórfico é a neoplasia da glândula salivar mais comum, seguido pelo tumor de warthin. O carcinoma mucoepidermóide é a neoplasia maligna mais comum seguido pelo adenocarcinoma sem outras especificações, carcinoma de células acinares e o carcinoma adenoidecístico (20).

O diagnóstico das neoplasias de glândulas salivares baseia-se no exame clínico e na punção aspirativa por agulha fina (PAAF). A PAAF auxilia na diferenciação entre neoplasias benignas e malignas, e entre tumores salivares e linfonodomegalias. Seu índice de positividade é alta, ajudando na escolha terapêutica adequada. A ultrasonografia tem sua importância principalmente na diferenciação entre tumores sólidos ou císticos, além de serem usados também para guiar a PAAF (22).

Embora o primeiro tratamento para NGSs malignas seja a cirurgia (23) a terapia adjuvante tem sido determinada com base em dados de estudos focados em carcinomas de células escamosas do trato aerodigestivo superior (24). A radioterapia está reservada para os tumores de comportamento mais agressivo, como os carcinomas de alto grau de malignidade, os estádios III e IV, presença de metástase cervical, paralisia facial e margens exíguas ou comprometidas. A radioterapia exclusiva pode ser indicada para pacientes inoperáveis, mas os resultados não são satisfatórios. Alguns estudos mostram

melhora na sobrevida em pacientes com câncer inoperável de glândulas salivares, com o uso de irradiação com nêutrons (25). Os resultados com o uso de quimioterapia em tumores de glândulas salivares são pobres, embora alguma resposta tem sido descrita com o uso de cisplatina, doxorrubicina, 5FU e ciclofosfamida (26, 27).

É importante notar que há relatos conflitantes quanto à relação entre hipóxia e comportamento clínico no tratamento de pacientes diagnosticados com NGSs (28, 29).

1.3 Hipóxia, HIF-1 α e miR-210

A hipóxia caracteriza-se pela condição do suprimento insuficiente de oxigênio para os tecidos, resultado da redução da disponibilidade de oxigênio, transporte de oxigênio ou a incapacidade dos tecidos de utilizarem o oxigênio. Em tecidos normais, a exposição em altitude e anemia induzem vias de resposta à hipóxia no corpo (30). Contudo, a hipóxia também é uma marca registrada das neoplasias, selecionando células que são capazes de sobreviver em ambientes extremamente desfavoráveis (31, 32). A principal proteína da via da hipóxia é o HIF-1 α , o qual é um fator de transcrição que tem como alvo diversos genes que promovem adaptações sob condições hipóxicas e tem sido amplamente estudado. Altos níveis de expressão dessa proteína está associado a um pior prognóstico em diversos tipos de neoplasias (6, 33, 34).

Sob condições de normóxia, um grupo de enzimas denominadas de prolin-hidroxilases (PHDs) e HIF-asparaginil hidroxilase, também chamada de fator inibidor de HIF (FIH) se liga e promove a degradação do HIF-1 α . hidroxilação de duas prolinas pelas enzimas PHD resulta na ligação do HIF-1 α à proteína mutada na doença de von Hippel Lindau (VHL), uma ubiquitina ligase, resultando na degradação maciça do HIF-1 α . Em condições de hipóxia a atividade enzimática dessas proteínas é reduzida, assim, VHL não se liga ao HIF-1 α permitindo assim sua acumulação conforme figura 1.

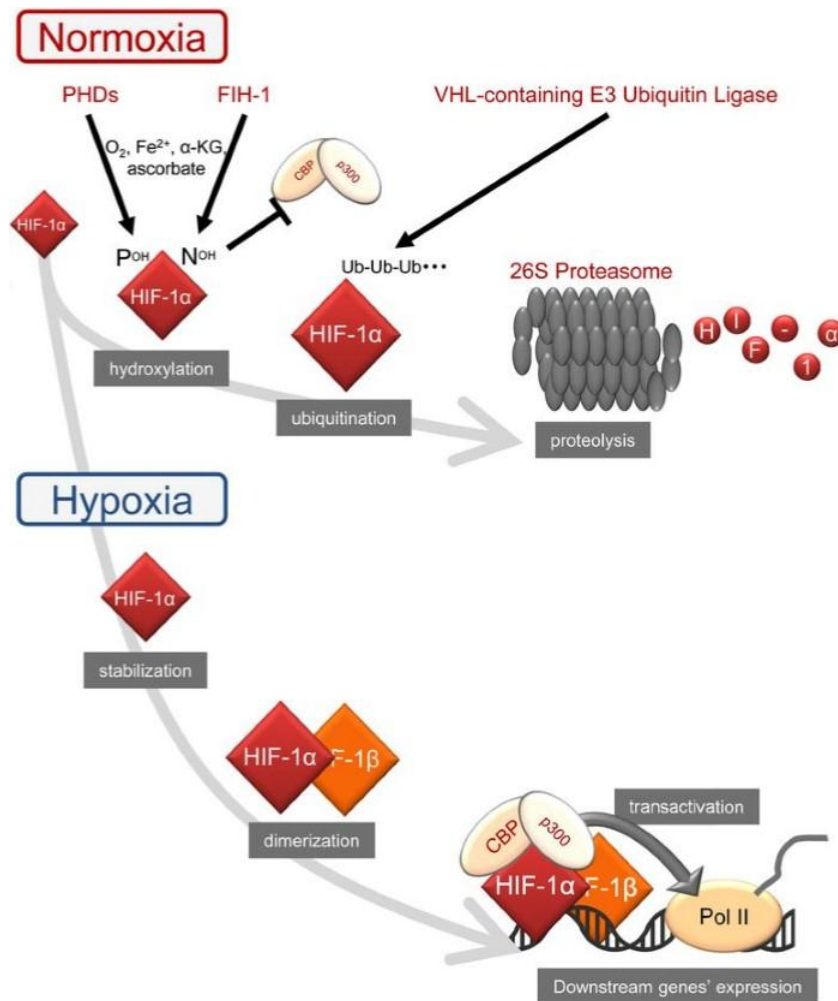


Figura 1: Mecanismo do HIF-1 α em condições de normóxia e hipóxia. Harada, 2016.

Em seguida, o HIF-1 α transloca-se para o núcleo e promove a transcrição de elementos responsivos à hipóxia (HREs) tais como, a liberação do hormônio eritropoietina (EPO) que promove a sobrevivência e proliferação de células tumorais. Logo, ocorre ativação do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) que promove a angiogênese no tumor, estimulando enzimas glicolíticas, o metabolismo anaeróbico de tumores para preservação de energia para atender suas demandas deixando um ambiente de tumor ácido após cada ciclo. BNIP3 (Bcl-2 e 19-quilodalton interagindo Proteína-3) conduz à instabilidade genômica por evasão da apoptose e o Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR) que está associada a um comportamento mais agressivo do tumor (35-37).

Todos estes fatores contribuem para um fenótipo tumoral mais agressivo e, finalmente, levam à resistência multifatorial contra o tratamento.

Os micro RNAs (miRNAs) foram descobertos em praticamente todas as espécies de plantas e animais (38). MiRBase distribui todos os miRNAs publicados, sequências para navegação e busca por sequência e palavras-chave, através de uma interface na web (<http://www.mirbase.org/>) (39). A última versão do miRNAs (MiRBase), lançado em Junho de 2014, contém 28.645 hairpin miRNAs precursores expressando 35.828 produtos de miRNAs maduros, em 223 espécies. Um micro RNA (miRNA) é definido como uma pequena molécula de RNA reguladora que consiste em pequenos RNAs não codificantes, com cerca de 22 nucleotídeos em comprimento. O miRNA liga-se às regiões 3' não traduzidas (3'-UTR) do gene alvo de uma forma complementar completa ou incompleta através da sua "sequência de origem" na região 5' e controla a expressão do gene alvo ao nível pós-transcricional. O gene de codificação miRNA é primeiramente transcrito em um pri-miRNA, com cerca de 300-1000 nucleotídeos de comprimento. No núcleo, estes transcritos primários são processados por uma RNA endonuclease Droscha tipo III em pré-miRNAs, que tem cerca de 70-90 nucleotídeos de comprimento (40).

A Exportin-5 promove a transferência de pré-miRNA através do núcleo para o citoplasma e, em seguida, no citoplasma, sofre a ação de outra RNA endonuclease, Dicer tipo III, gerando miRNAs maduros, com cerca de 22 nucleotídeos de comprimento. miRNA maduro, de cadeia simples forma com proteínas da família Argonata, um complexo RNA-proteína conhecido como complexo silenciador RNA-induzido (RISC) (41). Este complexo regula a expressão gênica através da inibição da tradução do RNA ou degradação de alvos específicos no RNA mensageiro (RNAm) como mostrado na figura 2. Para regular a expressão gênica ao nível pós-transcricional, que permite a tradução de genes alvo e posteriormente a expressão proteica (42).

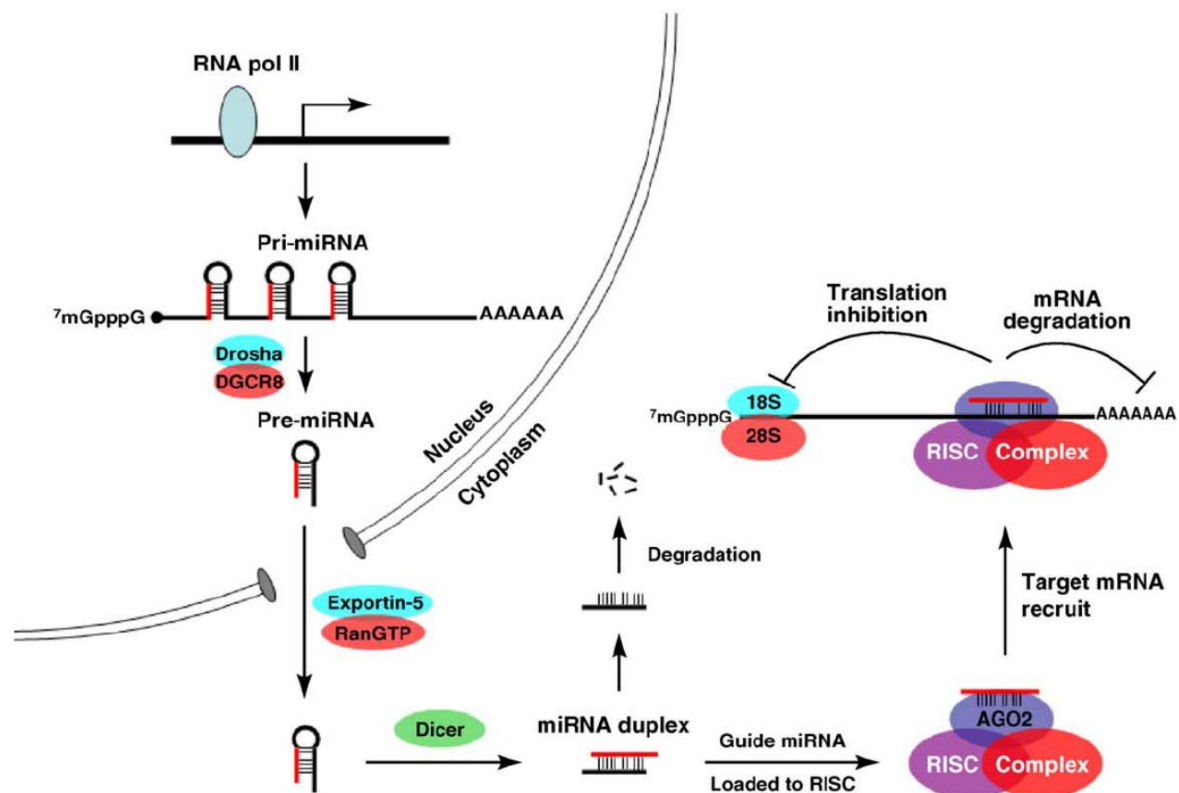


Figura 2: Mecanismo do MiRNAs. Xin Huang, *et al* 2010.

A resposta adaptativa de baixo teor de oxigênio engloba processos bioquímicos e celulares complexos, tais como o metabolismo de energia, sobrevivência e proliferação celular, angiogênese, adesão, motilidade, e a resistência ao estresse oxidativo. Está amplamente aceito que a hipóxia representa um fator prognóstico adverso independente em muitos tipos de neoplasias e contribui para o fracasso final da maioria das terapias antineoplásicas. miRNAs são reconhecidos como importantes reguladores em ambientes fisiológicos e patológicos, incluindo a carcinogênese. Um grande conjunto de miRNAs, incluindo o miR-210, 21, 23, 24, 26, 103/107, e 373, foram encontrados por serem induzidos sob condições hipóxicas (2).

Altos níveis de miR-210 participam na estabilização do HIF-1 α durante a hipóxia (43), e pode ser responsável por uma proporção significativa do total da proteína HIF-1 α expressa na hipóxia. Logo, este tem um forte envolvimento na sobrevivência da célula, migração, diferenciação e na angiogênese, favorecendo a formação vascular (44).

Níveis aumentados de miR-210 podem estar associados com o prognóstico desfavorável em doenças (45) tais como o infarto do miocárdio, progressão neoplásica e outros (45, 46). As limitações dos métodos existentes para avaliar a hipóxia levaram a um interesse no desenvolvimento de novos marcadores. MiRNAs são promissores como

biomarcadores estáveis em tecidos e no sangue, e têm o potencial de atuar sobre centenas de genes (47).

1.4 Hipóxia tumoral e radioterapia

A hipóxia existe em aproximadamente 60% das neoplasias humanas (48) e dois tipos de hipóxia podem ser distinguidos: a hipóxia aguda e crônica. A hipóxia aguda se desenvolve como resultado de um desligamento temporário da microvasculatura e de distúrbios locais na perfusão, resultantes de episódios periódicos de abertura e fechamento dos vasos sanguíneos, o que cria hipóxia dinâmica ou intermitente (49-51). Antagônico com a hipóxia aguda, a hipóxia crônica resulta de distâncias de difusão aumentadas entre os vasos sanguíneos e as células neoplásicas. Isto provoca baixos níveis de tensão de oxigênio na neoplasia levando ao início de vias de sinalização hipóxica e aumento da radiorresistência (50).

As células sob estresse em baixa concentração de oxigênio muitas vezes muda para glicólise aeróbica (produção de lactato), um estado de baixa geração de energia, a partir de fosforilação oxidativa, o que é denominado o efeito Warburg (52). A glicólise pode ser aumentada tanto quanto duas vezes em hipóxia aguda, e é geralmente associada com um aumento da expressão ou formas modificadas de transportadores de glicose (GLUT 1 e GLUT 3) e o aumento dos níveis de hexoquinase (53). Embora hipóxia tem sido geralmente reconhecido pelo seu impacto sobre o metabolismo da glicose, certas neoplasias hipóxicas demonstram aumentos marginais de captação de glicose e produção de lactato (52). Os padrões de oxigenação nas neoplasias podem ser heterogêneas. A quantidade de hipóxia presente nas neoplasias difere de paciente para paciente (54-57). Além disso, a distribuição da hipóxia no interior da neoplasia também pode depender do tipo histológico da neoplasia (58).

Pequenos depósitos neoplásicos de 1-3 mm têm nutrientes fornecidos por difusão a partir do tecido circundante; além disso, a neoplasia é dependente de angiogênese para suprir as suas necessidades (59). A formação dos vasos sanguíneos é estimulada tanto em contextos fisiológicos como na neoplasia pela secreção de diversos fatores, dentre os quais se destacam os membros da família de citocinas VEGF. A super expressão de VEGF mediada por HIF-1 α foi identificada em diversas neoplasias (60). Diversos estudos têm mostrado que a angiogênese tumoral está correlacionada com a progressão da neoplasia e agressividade em neoplasias humanas, incluindo carcinoma de células

escamosas de cabeça e pescoço (61). Hipóxia na neoplasia resulta de um desequilíbrio entre o suprimento e o consumo de oxigênio, devido a uma mudança anormal da estrutura e função dos microvasos que suprem a neoplasia (49, 51, 62). A expressão de VEGF foi maior em tecidos neoplásicos de CECP comparados com o epitélio oral normal (63-66).

A radioterapia é uma modalidade importante no tratamento combinacional de neoplasias e é utilizada no tratamento de múltiplas neoplasias com bons efeitos terapêuticos (67). Além disso, quando a radioterapia é combinada com quimioterapia, cirurgia ou outras terapias direcionadas, eficiência do tratamento é melhorada e a recorrência e as taxas de mortalidade por câncer são reduzidas (68). Entretanto, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a hipóxia na neoplasia está associada a uma maior resistência à radiação ionizante e a vários tipos de quimioterapia, com taxas subsequentemente mais elevadas de falha local e distante (49-51, 69).

Quando a radiação ionizante atinge as células neoplásicas, o oxigênio medeia danos do DNA através da formação de radicais livres de oxigênio, que é menos susceptível de ocorrer em estado hipóxico (49, 50). A Radiação ionizante (IR) exerce seu efeito através de ações diretas e indiretas. A ação indireta é atribuída por meio de radicais livres formados através da ionização de H₂O, enquanto que a ação direta significa lesão direta ao DNA. Assim, o dano ao DNA pode aparecer em diferentes formas, tais como quebras de cadeia simples (reparados através de excisão de bases) e quebras de cadeia dupla rupturas dos filamentos (LAP), reparados através de recombinação homóloga, que é preciso, ou não-homóloga que é propensa a erros. Várias células sofrem apoptose após IR, a morte celular pode também estar associada com lesão induzida por IR que estimula a inativação da célula e torna-se fatal após algumas divisões celulares (70). Regiões de hipóxia são mais resistentes a radioterapia (71). Assim, a hipóxia na neoplasia é um importante contribuinte para a radiorresistência. Isto tem sido demonstrado em várias tipos de neoplasias, tais como carcinoma de células escamosas, câncer de colo do útero e câncer de mama (72, 73). Vários estudos demonstraram o valor prognóstico da hipóxia na neoplasia em pacientes de câncer cervical e no carcinoma de cabeça e pescoço (71, 74).

Considerando controvérsias na literatura sobre a relação entre hipóxia e NGSs e o papel do HIF-1 α e miR-210 no carcinoma de células escamosas de boca submetidos à radiação, este estudo foi norteado pela busca de melhor compreensão da sinalização de marcadores de hipóxia em neoplasias bucais de células escamosas e neoplasias

glandulares, com um enfoque em seus mecanismos de regulação e expressão gênica, associação a mecanismos como migração celular e angiogênese tumoral e sua possível influência sobre o comportamento clínico-patológico de tais neoplasias. Assim, esse estudo está fundamentado na necessidade de investigação de novos eventos e comportamento de marcadores moleculares para caracterização de neoplasias malignas e benignas de cabeça e pescoço. Além disso, a investigação da associação dos aspectos moleculares envolvidos na sinalização de marcadores de hipóxia, características clínico-patológicas e comportamento dessas neoplasias antes e após tratamento radioterápico poderão apontar novos alvos para possíveis intervenções prognósticas e terapêuticas futuras.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Investigar marcadores de hipóxia em neoplasias benignas e malignas de glândulas salivares e o papel do HIF-1 α no carcinoma de células escamosas de boca sob radiação.

2.2 Objetivos Específicos

- Investigar a expressão de mRNA de HIF-1 α e miR-210 em neoplasias benignas e malignas de glândulas salivares.
- Investigar os principais processos biológicos, celulares e moleculares associados à quimioterapia em neoplasias de glândulas salivares através de análise de bioinformática.
- Investigar a expressão de mRNA de HIF-1 α e miR-210 e o comportamento migratório em linhagem celular de carcinoma de células escamosas de boca (SCC9) em condições de hipóxia sob efeito da radiação e em pacientes com carcinoma de células escamosas de boca submetidos à radioterapia.

3 PRODUTOS

3.1 Artigo científico, formatado segundo as normas para publicação do periódico *Journal of Oral Pathology & Medicine*, submetido em setembro de 2016 com o título "Investigation of Hypoxia Markers in Benign and Malignant Salivary Neoplasms."

3.2 Artigo científico, formatado segundo as normas para publicação do periódico *Oncology Letters*, com o título " The effect of ionizing radiation on HIF-1 α and miR-210 under hypoxia in Oral Cancer."

3.1 Artigo 1

Investigation of Hypoxia Markers in Benign and Malignant Salivary Neoplasms

Hypoxia Markers in Salivary Neoplasms

Claudio Marcelo Cardoso^{b, d#}, Sabrina Ferreira de Jesus^{a#}, Marcela Gonçalves de Souza^a, Eloa Mangabeira Santos^a, Cristiane Karine Cordeiro Santos^d, Christine Mendes Silveira^{b, d}, Sérgio Henrique Sousa Santos^c, Alfredo Maurício Batista de Paula^a, Lucyana Conceição Farias^a and André Luiz Sena Guimarães^{a, c}

^a Department of Dentistry, Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, Minas Gerais, Brazil.

^b Department of Medicine, Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, Minas Gerais, Brazil.

^c Institute of Agricultural Sciences. Food Engineering College; Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Montes Claros, Minas Gerais, Brazil.

^dDilson Godinho Hospital, Montes Claros, Minas Gerais, Brazil.

Authors contributed equally

Corresponding author:

André Luiz Sena Guimarães

Universidade Estadual de Montes Claros. Hospital Universitário Clemente Faria. Laboratório de Pesquisa em Saúde, 562 Av. Cula Mangabeira Santo Expedito. Montes Claros, MG. Brazil Zip code: 39401-001

E-mail: andreluizguimaraes@gmail.com

Abstract

Background

Salivary gland neoplasia (SGN) presents at low frequencies but is an aggressive form of head and neck neoplasia. SGNs exhibit a broad spectrum of phenotypic heterogeneity. Hypoxia is an important concurrent phenomenon that may be associated with SGN prognosis and valuable to determine to the choice of treatment regimen.

Objective

There is significant controversy in the literature regarding the relationship between hypoxia and SGNs. As such, the purpose of the current study is to investigate mRNA levels of hypoxia markers in both benign and malignant salivary neoplasms. Additionally, the present study aims to investigate, using bioinformatics, the main biological processes that are altered following chemotherapeutic treatment of SGNs.

Patients and Methods

Ethical approval and signed, informed consent was obtained from all patients. The current study sample is comprised of a total of 21 samples, including malignant neoplasms (n=7, 33.33%), benign neoplasms (n=7, 33.33%), and samples from normal salivary glands (n=7, 33.33%). miR-210 expression and HIF-1 α mRNA levels were evaluated using qRT-PCR. Bioinformatics analyses were also performed to identify the main biological processes altered in SGNs following chemotherapy.

Results

There was no difference in miR-210 expression between case and control groups. Similarly, HIF-1 α mRNA levels were similar between benign and malignant SGNs. The ontological analyses suggested that post-replication repair, error-prone translesion synthesis, translesion synthesis and error-free translesion synthesis were the most important biological processes related to chemotherapy in these patients. Additionally, the main biological processes altered with chemotherapy were related to the DNA metabolic process and strand elongation.

Conclusion

The angiogenic markers, miR-210 and HIF-1 α , do not appear to distinguish malignancy in salivary glands. Bioinformatic analyses demonstrated that biological processes related to DNA and cell division were the most important for SGNs. The current study suggests that salivary gland neoplasms do not exhibit increased expression of hypoxia markers.

Introduction

Salivary gland neoplasias (SGNs) are less common than other head and neck cancers, including oral squamous cell carcinoma (11-15). SGNs exhibit a broad spectrum of phenotypic heterogeneity and are divided into five categories, according to World Health Organization (WHO) (15). Prognosis of SGNs is also related to the anatomical location of the neoplasia (16, 17).

Recently, a large number of studies have attempted to evaluate the role of hypoxia in cancer development and prognosis (18-21). Hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF-1 α) is a marker of hypoxia and is activated under hypoxic conditions (22, 23). HIF-1 α has been shown to regulate the expression of several miRNAs, including miR-210. miRNAs are a class of single-stranded noncoding RNAs 21–22 nucleotides in length (24) which regulate gene expression through the inhibition of RNA translation or degradation of target messenger RNA (mRNA) (25). Recent evidence has suggested that miR-210 plays a crucial role in the cellular response to hypoxia (26). HIF-1 α can promote isoform-specific stabilization of miR-210 by binding to the Hypoxia Responsive Element (HRE) present in the proximal promoter of miR-210 (27). Similar to HIF-1 α , hypoxia induces miR-210 expression, which regulates cellular proliferation, DNA stability, mitochondrial metabolism, apoptosis and angiogenesis (26, 28). Furthermore, miR-210 expression is also significantly upregulated in other types of cancer, including non-small cell lung cancer (29).

Although first choice treatment for malignant SGNs is surgery (30), adjuvant therapy has historically been determined based on data from studies focused on squamous cell carcinomas of the upper aerodigestive tract (17). Importantly, there are conflicting reports with regards to the relationship between hypoxia and clinical behavior or treatment responsiveness in patients diagnosed with SGNs (31, 32). Recent studies have demonstrated that hypoxia might promote an increase in radioresistance (33-35), specifically via miRNA-mediated modulation of the hypoxic response (36). These data suggest that the use of chemoradiation might be a valuable alternative treatment option for patients presenting with radioresistant neoplasias (17). Considering the controversial literature regarding the relationship between hypoxia and SGNs, the current study aimed to investigate mRNA levels of hypoxia markers in both benign and malignant salivary neoplasms. Additionally, in the present study, we took advantage of bioinformatics to investigate the main biological processes associated with chemotherapy of SGNs.

Methods

Patients

Ethical approval for this study was obtained from the relevant Institutional Review Board (process number CAAE 52767316.6.0000.5146) and signed, informed consent was obtained from all patients. The current study population consisted of 21 total patient samples, including 7 with malignant neoplasms (33.33%), 7 with benign neoplasms (33.33%), and 7 with normal salivary glands (33.33%).

RNA isolation and real-time PCR

RNA was isolated using Trizol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), according to the manufacturer's protocol. Total RNA was treated with DNase I, Amplification Grade (Invitrogen, cat number 18068015, Carlsbad, CA, USA) and 1.5 µg of RNA was reversely transcribed with the SuperScript® First-Strand Synthesis System for qRT-PCR (Invitrogen, cat number 11904018, Carlsbad, CA, USA). Each reaction for SYBR green-based qRT-PCR (total volume 20 µl) contained 10 µl of SYBR Green master mix, 0.25 µl of both forward and reverse primers, 1 µl of cDNA (66 ng/reaction) and 8.5 µl H₂O. Non-Template Control (NTC) was included for each assay. The thermal cycling conditions were as follows: 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of the following steps: 95°C for 15 sec and 60°C for 1 minute. The specific primers/probes (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) were described previously (18). Specifically, the following primers were used for HIF1α: 5'-TCTGCAACATGGAAGGTATTGC-3' and 5'-CTGAGGTTGGTTACTGTTGGTATCA-3. Beta-Actin was used to normalize HIF1α gene expression and was amplified using the following primers: 5'-TGCCGACAGGATGCAGAAG-3' and 5'-CTCAGGAGGAGCAATGATCTTGA-3'. qPCR was performed on a StepOne Real-Time PCR System (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

For miR-210 (ID: Hs04231470_s1, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), a TaqMan assay was performed according to the manufacturer's protocol. RNU44 was used as an endogenous control for miR-210 analysis (ID: 001094, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), All reactions were done in triplicate. Samples of M were used as calibrator. The following reaction steps were used for amplification: 95°C for 10 min, 95°C for 15s and 60°C for 1 min. The Ct values of endogenous controls were subtracted from the Ct values of the respective targets to calculate the ΔCt. The ΔCt values from each experimental group were averaged and converted to log base 2 using the equation $2^{-\Delta\Delta Ct}$ in order to compare expression among different samples.

Bioinformatics and interaction network analysis

The bioinformatics approach utilized here has been described previously (18, 37). Briefly, 5FU, bevacizumab, carboplatin, cisplatin, CPT11, cyclophosphamide, doxorubicin, gemcitabine, hydroxyurea, paclitaxel, pirarubicin, trastuzumab, and Vp16 were used as chemicals, as suggested previously (17). All chemotherapy agents were taken together to build a

biological network in the open-source software, STITCH (version 4.0) (38). Only experimental studies with a high degree of confidence (0.9-0.99) were considered. The initial gene list was then expanded and STITCH was used to score each interaction in order to build an interaction map among the identified genes. To evaluate differences among classes with regards to the weighted number of links (WNL), the Markov Cluster Algorithm (MCL) were used. Topological analysis was carried out with Cytoscape (39), while ontological analysis was performed with BinGO (40). In order to confirm the STITCH results, STRING analyses were performed as previously described (18, 37). Briefly, the main targets of chemotherapeutic agents used to treat SGNs were used to build the network. P53, GAAD45, MDM2, ABL1, BAX, CASP3, CASP9, MLH1, MSH2, TOP2A, ERCC1, ERCC2, RRM1, TUBB2A, TOP2B, TOP2A and ERBB2 were included in STRING (version 10.0) (41). Only experimental studies with a high degree of confidence (0.9-0.99) were considered. The initial gene list was then expanded using STRING (version 10.0) (41), which was used to score each interaction and build an interaction map among the identified genes. In order to evaluate differences regarding a weighted number of links (WNL) among classes, the Markov Cluster Algorithm (MCL) were used. The topological analysis was carried out with Cytoscape (39), while ontological analysis was performed with BinGO (40).

Statistical analysis

Analyses were performed using GraphPad Prism software (Version 5.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). The Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk Tests were carried out to evaluate data distribution. These analyses revealed that the data were non-parametrically distributed; therefore, the Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests were performed. All data are given as means \pm S.D. $p < 0.05$ was considered statistically significant. .

Results

The individuals in the control group were 28.3 years of age, on average. All control samples were obtained from oral mucocoeles located in the inferior lip. As shown in Table 1, the majority of the samples were from male subjects (57.1%). All benign tumors were pleomorphic adenomas and the patients had an average age of 36.4 years. With regards to the location of the tumor, one (14.3%) was in the minor salivary glands (hard palate) while six (85.7%) were located in the parotid gland. In the patient population with malignant neoplasms, one patient presented with acinar cell carcinoma (14.3%), two with adenoid cystic carcinoma (28.6%) and two with myoepithelial carcinoma (n=2, 28.56%). The average age of patients with malignant neoplasias was 52.3 years.

No difference in miR-210 expression was observed between case and control groups (Fig 1A). Similarly, miR-210 levels were similar between malignant and benign SGNs (Fig 1A). Additionally, HIF-1 α mRNA levels did not differ between the case and control groups or between benign and malignant SGNs (Fig 1B).

A bioinformatics approach was utilized to evaluate the main pathways affected by chemotherapeutic agents. Bevacizumab and trastuzumab treatment did not appear to be related in STITCH and 16 proteins appeared in the network (Fig 2A and Supplementary material). Correlation and R-squared values were 0.767 and 0.630, respectively. Ontological analyses suggested that postreplication repair, error-prone translesion synthesis, translesion synthesis and error-free translesion synthesis were the biological processes most affected by chemotherapeutic drugs (Fig 2B). A second bioinformatics analysis was performed to evaluate STITCH results. STRING analyses revealed a total of 18 main targets (Supplementary material). After expansion, 66 proteins were used to built the network (Fig 2C). 357 interactions were observed (average of 10.8) and the clustering coefficient was 0.611. Correlation and R-squared values were 0.781 and 0.581, respectively. DNA metabolic process, DNA strand elongation, DNA strand elongation involved in DNA replication, leading strand elongation, DNA replication, DNA-dependent replication, mismatch repair, cellular response to stress and cellular response to a stimulus were the main biological processes observed to correlate with chemotherapy. The results reported in the current study demonstrate that salivary gland neoplasms do not increase markers of hypoxia.

Discussion

Previous reports have suggested that hypoxia is an important mechanism related to radioresistance in specific cancers (42). Due to the fact that the indirect actions of radiation depend on oxygen levels, hypoxia is believed to be the main mechanism leading to radioresistance (17, 33-36, 42, 43). Furthermore, it is important to highlight that vascular damage, which triggers an immune response, is a consequence of radiation-induced tumor hypoxia (44). However, fractionated radiation can induce subsequent tumor revascularization

via recruitment of bone marrow-derived cells (BMDCs) in a HIF1 α -dependent or -independent manner (45, 46).

Traditionally, SGNs were considered radioresistant (17). However, the main biological mechanism that contribute to the radioresistance observed in SGNs is still not well established. As such, recommendations for the management and treatment of malignant SGNs have changed in recent years (47, 48). The shift in the treatment of SGNs is due to an improvement in imaging technology, as well as the development of various treatment options, including external beam radiation, neutron beam therapy, and chemotherapy (47, 48). It has been shown that miR-210 expression is induced by both HIF-1 α (49, 50) as well as hypoxia (50). The current study was the first to investigate miR-210 expression in SGNs. This report suggests that there are not significant alterations in miR-210 expression in this specific tumor subtype. Specifically, no differences in miR-210 levels were observed between SGNs and normal, healthy salivary glands. In support of the miR-210 findings reported here, our results regarding HIF-1 α demonstrate that salivary gland neoplasms are not hypoxic. Rather, an elegant study has demonstrated that SGNs are well oxygenated, and it is unlikely that hypoxia is a relevant factor in the clinical progression and treatment responsiveness of these tumors (31). Moreover, repair of sublethal damage during the interval between fractionated radiotherapy doses is minimal in neutron therapy but plays a significant role in external-beam radiotherapy (51), thus suggesting that radioresistance of SGNs is independent of HIF1 α . This notion is supported by the fact that, even through the use of extensive bioinformatics, hypoxia processes were not observed to be significantly altered in SGNs. In fact, almost all chemotherapeutic agents currently target DNA damage to induce cell death (17).

Hypoxia is associated with both radioresistance and tumor progression (19, 23, 28, 33, 52). However, the importance of the hypoxic response appears to be specific to the tumor subtype. Specifically, a substantial positive correlation has been observed between adenoid cystic carcinomas and hypoxia (52). However, HIF-1 α levels do not appear to be altered in pleomorphic adenomas, when compared with control samples (52).

It is important to note that there are limitations to the current study, including a small sample size, which precluded our ability to perform comprehensive analyses on different specimens and histological types. Irrespective of these limitations, the current study is the first to evaluate RNA levels of hypoxia markers in SGNs. Furthermore, the present study validates previously published data as we observed no differences in hypoxia markers between control, benign and malignant neoplasias.

In conclusion our data suggest that salivary gland neoplasms do not display increased levels of hypoxia markers. Specifically, the angiogenic markers, miR-210 and HIF- α , do not seem to correlate with malignancy of salivary glands. Rather, bioinformatic analyses suggests that biological processes related to DNA repair and cell division are the most important in SGNs.

References

1. Speksnijder CM, van der Glas HW, van der Bilt A, van Es RJ, van der Rijt E, Koole R. Oral function after oncological intervention in the oral cavity: a retrospective study. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 2010 Jun;68(6):1231-7. PubMed PMID: 20303207. Epub 2010/03/23. eng.
2. De Felice F, Thomas C, Barrington S, Pathmanathan A, Lei M, Urbano TG. Analysis of loco-regional failures in head and neck cancer after radical radiation therapy. *Oral Oncol*. 2015 Nov;51(11):1051-5. PubMed PMID: 26506048. Epub 2015/10/28. eng.
3. Oksuz DC, Prestwich RJ, Carey B, Wilson S, Senocak MS, Choudhury A, et al. Recurrence patterns of locally advanced head and neck squamous cell carcinoma after 3D conformal (chemo)-radiotherapy. *Radiation Oncology (London, England)*. 2011 05/2403/01/received 05/24/accepted;6:54-. PubMed PMID: PMC3127781.
4. Leemans CR, Tiwari R, Nauta JJP, Waal IVD, Snow GB. Recurrence at the primary site in head and neck cancer and the significance of neck lymph node metastases as a prognostic factor. *Cancer*. 1994;73(1):187-90.
5. Kalavrezos N, Bhandari R. Current trends and future perspectives in the surgical management of oral cancer. *Oral Oncol*. 2010 Jun;46(6):429-32. PubMed PMID: 20381408. Epub 2010/04/13. eng.
6. Pignon JP, Bourhis J, Domenge C, Designé L. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. *The Lancet*. 2000;355(9208):949-55.
7. Corvo R. Evidence-based radiation oncology in head and neck squamous cell carcinoma. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2007 Oct;85(1):156-70. PubMed PMID: 17482300. Epub 2007/05/08. eng.
8. Mazon R, Tao Y, Lusinchi A, Bourhis J. Current concepts of management in radiotherapy for head and neck squamous-cell cancer. *Oral Oncol*. 2009 Apr-May;45(4-5):402-8. PubMed PMID: 19375379. Epub 2009/04/21. eng.
9. Nordmark M, Bentzen SM, Rudat V, Brizel D, Lartigau E, Stadler P, et al. Prognostic value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumors after primary radiation therapy. An international multi-center study. *Radiotherapy and Oncology*. 2005;77(1):18-24.
10. Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of Cancer Incidence, Mortality, and Prevalence Across Five Continents: Defining Priorities to Reduce Cancer Disparities in Different Geographic Regions of the World. *Journal of Clinical Oncology*. 2006;24(14):2137-50. PubMed PMID: 16682732.
11. Fonseca FP, Carvalho Mde V, de Almeida OP, Rangel AL, Takizawa MC, Bueno AG, et al. Clinicopathologic analysis of 493 cases of salivary gland tumors in a Southern Brazilian population. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*. 2012 Aug;114(2):230-9. PubMed PMID: 22769409.
12. de Oliveira FA, Duarte EC, Taveira CT, Maximo AA, de Aquino EC, Alencar Rde C, et al. Salivary gland tumor: a review of 599 cases in a Brazilian

population. *Head and neck pathology*. 2009 Dec;3(4):271-5. PubMed PMID: 20596844. Pubmed Central PMCID: 2811571.

13. De Paula AM, Souza LR, Farias LC, Correa GT, Fraga CA, Eleuterio NB, et al. Analysis of 724 cases of primary head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) with a focus on young patients and p53 immunolocalization. *Oral oncology*. 2009 Sep;45(9):777-82. PubMed PMID: 19359212.

14. Souza RL, Fonseca-Fonseca T, Oliveira-Santos CC, Correa GT, Santos FB, Cardoso CM, et al. Lip squamous cell carcinoma in a Brazilian population: epidemiological study and clinicopathological associations. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal*. 2011 Sep;16(6):e757-62. PubMed PMID: 21196879.

15. Eveson JW AP, Gnepp DR, El-Naggar AK. Tumours of the salivary glands. In: Barnes L EJ, Reichart P, Sidransky D, editor. *World Health Organization Classification of Tumours*. Lyon: World Health Organization Classification of Tumours; 2005. p. 209- 89.

16. Guzzo M, Locati LD, Prott FJ, Gatta G, McGurk M, Licitra L. Major and minor salivary gland tumors. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2010 May;74(2):134-48. PubMed PMID: 19939701.

17. Cerda T, Sun XS, Vignot S, Marcy PY, Baujat B, Baglin AC, et al. A rationale for chemoradiation (vs radiotherapy) in salivary gland cancers? On behalf of the REFCOR (French rare head and neck cancer network). *Critical reviews in oncology/hematology*. 2014 Aug;91(2):142-58. PubMed PMID: 24636481. Epub 2014/03/19. eng.

18. Guimaraes TA, Farias LC, Fraga CA, Feltenberger JD, Melo GA, Coletta RD, et al. Evaluation of the antineoplastic activity of gallic acid in oral squamous cell carcinoma under hypoxic conditions. *Anti-cancer drugs*. 2016 Jun;27(5):407-16. PubMed PMID: 26849170.

19. Fraga CA, de Oliveira MV, de Oliveira ES, Barros LO, Santos FB, Gomez RS, et al. A high HIF-1alpha expression genotype is associated with poor prognosis of upper aerodigestive tract carcinoma patients. *Oral oncology*. 2012 Feb;48(2):130-5. PubMed PMID: 21945343.

20. Wang X, Ren H, Zhao T, Ma W, Dong J, Zhang S, et al. Single nucleotide polymorphism in the microRNA-199a binding site of HIF1A gene is associated with pancreatic ductal adenocarcinoma risk and worse clinical outcomes. *Oncotarget*. 2016 Mar 22;7(12):13717-29. PubMed PMID: 26872370.

21. de Carvalho Fraga CA, Alves LR, Marques-Silva L, de Sousa AA, Jorge AS, de Jesus SF, et al. High HIF-1alpha expression genotypes in oral lichen planus. *Clinical oral investigations*. 2013 Dec;17(9):2011-5. PubMed PMID: 23334242.

22. Wang GL, Semenza GL. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993 May 1;90(9):4304-8. PubMed PMID: 8387214. Pubmed Central PMCID: 46495.

23. Xiang L, Gilkes DM, Hu H, Luo W, Bullen JW, Liang H, et al. HIF-1alpha and TAZ serve as reciprocal co-activators in human breast cancer cells. *Oncotarget*. 2015 May 20;6(14):11768-78. PubMed PMID: 26059435. Pubmed Central PMCID: 4494903.

24. Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO journal*. 2002 Sep 2;21(17):4663-70. PubMed PMID: 12198168. Pubmed Central PMCID: 126204.
25. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009 Jan 23;136(2):215-33. PubMed PMID: 19167326. Pubmed Central PMCID: 3794896.
26. Huang X, Le QT, Giaccia AJ. MiR-210--micromanager of the hypoxia pathway. *Trends in molecular medicine*. 2010 May;16(5):230-7. PubMed PMID: 20434954. Pubmed Central PMCID: 3408219.
27. Corn PG. Hypoxic regulation of miR-210: shrinking targets expand HIF-1's influence. *Cancer biology & therapy*. 2008 Feb;7(2):265-7. PubMed PMID: 18347426.
28. Dang K, Myers KA. The role of hypoxia-induced miR-210 in cancer progression. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(3):6353-72. PubMed PMID: 25809609. Pubmed Central PMCID: 4394536.
29. Zhu W, Zhou K, Zha Y, Chen D, He J, Ma H, et al. Diagnostic Value of Serum miR-182, miR-183, miR-210, and miR-126 Levels in Patients with Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer. *PloS one*. 2016;11(4):e0153046. PubMed PMID: 27093275. Pubmed Central PMCID: 4836744.
30. Green B, Rahimi S, Brennan PA. Current management of the neck in salivary gland carcinomas. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2016 May 27. PubMed PMID: 27230064.
31. Wijffels KI, Hoogsteen IJ, Lok J, Rijken PF, Marres HA, de Wilde PC, et al. No detectable hypoxia in malignant salivary gland tumors: preliminary results. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2009 Apr 1;73(5):1319-25. PubMed PMID: 18973979.
32. Swelam W, Ida-Yonemochi H, Maruyama S, Ohshiro K, Cheng J, Saku T. Vascular endothelial growth factor in salivary pleomorphic adenomas: one of the reasons for their poorly vascularized stroma. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2005 Jun;446(6):653-62. PubMed PMID: 15856293.
33. Koukourakis MI, Kakouratos C, Kalamida D, Bampali Z, Mavropoulou S, Sivridis E, et al. Hypoxia-inducible proteins HIF1alpha and lactate dehydrogenase LDH5, key markers of anaerobic metabolism, relate with stem cell markers and poor post-radiotherapy outcome in bladder cancer. *International journal of radiation biology*. 2016 Mar 24:1-11. PubMed PMID: 27010533.
34. Harada H. Hypoxia-inducible factor 1-mediated characteristic features of cancer cells for tumor radioresistance. *Journal of radiation research*. 2016 Mar 16. PubMed PMID: 26983985.
35. Sun JC, He F, Yi W, Wan MH, Li R, Wei X, et al. High expression of HIF-2alpha and its anti-radiotherapy effect in lung cancer stem cells. *Genetics and molecular research : GMR*. 2015;14(4):18110-20. PubMed PMID: 26782458.
36. Gu H, Liu M, Ding C, Wang X, Wang R, Wu X, et al. Hypoxia-responsive miR-124 and miR-144 reduce hypoxia-induced autophagy and enhance radiosensitivity of prostate cancer cells via suppressing PIM1. *Cancer medicine*. 2016 Jun;5(6):1174-82. PubMed PMID: 26990493.
37. Poswar Fde O, Farias LC, Fraga CA, Bambilra W, Jr., Brito-Junior M, Sousa-Neto MD, et al. Bioinformatics, interaction network analysis, and neural

- networks to characterize gene expression of radicular cyst and periapical granuloma. *Journal of endodontics*. 2015 Jun;41(6):877-83. PubMed PMID: 25873079.
38. Kuhn M, Szklarczyk D, Pletscher-Frankild S, Blicher TH, von Mering C, Jensen LJ, et al. STITCH 4: integration of protein-chemical interactions with user data. *Nucleic acids research*. 2014 Jan;42(Database issue):D401-7. PubMed PMID: 24293645. Pubmed Central PMCID: 3964996.
39. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research*. 2003 Nov;13(11):2498-504. PubMed PMID: 14597658. Pubmed Central PMCID: 403769.
40. Maere S, Heymans K, Kuiper M. BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics*. 2005 Aug 15;21(16):3448-9. PubMed PMID: 15972284.
41. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, et al. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic acids research*. 2015 Jan;43(Database issue):D447-52. PubMed PMID: 25352553. Pubmed Central PMCID: 4383874.
42. Barker HE, Paget JT, Khan AA, Harrington KJ. The tumour microenvironment after radiotherapy: mechanisms of resistance and recurrence. *Nature reviews Cancer*. 2015 Jul;15(7):409-25. PubMed PMID: 26105538. Pubmed Central PMCID: 4896389.
43. He WS, Dai XF, Jin M, Liu CW, Rent JH. Hypoxia-induced autophagy confers resistance of breast cancer cells to ionizing radiation. *Oncology research*. 2012;20(5-6):251-8. PubMed PMID: 23581232.
44. Karam SD, Bhatia S. The radiobiological targets of SBRT: tumor cells or endothelial cells? *Annals of translational medicine*. 2015 Nov;3(19):290. PubMed PMID: 26697450. Pubmed Central PMCID: 4671867.
45. Kioi M, Vogel H, Schultz G, Hoffman RM, Harsh GR, Brown JM. Inhibition of vasculogenesis, but not angiogenesis, prevents the recurrence of glioblastoma after irradiation in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2010 Mar;120(3):694-705. PubMed PMID: 20179352. Pubmed Central PMCID: 2827954.
46. Lerman OZ, Greives MR, Singh SP, Thanik VD, Chang CC, Seiser N, et al. Low-dose radiation augments vasculogenesis signaling through HIF-1-dependent and -independent SDF-1 induction. *Blood*. 2010 Nov 4;116(18):3669-76. PubMed PMID: 20631377.
47. Bell RB, Dierks EJ, Homer L, Potter BE. Management and outcome of patients with malignant salivary gland tumors. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 2005 Jul;63(7):917-28. PubMed PMID: 16003616.
48. Laramore GE, Krall JM, Griffin TW, Duncan W, Richter MP, Saroja KR, et al. Neutron versus photon irradiation for unresectable salivary gland tumors: final report of an RTOG-MRC randomized clinical trial. *Radiation Therapy Oncology Group. Medical Research Council. International journal of radiation oncology, biology, physics*. 1993 Sep 30;27(2):235-40. PubMed PMID: 8407397.
49. Wang H, Flach H, Onizawa M, Wei L, McManus MT, Weiss A. Negative regulation of Hif1a expression and TH17 differentiation by the hypoxia-regulated

microRNA miR-210. *Nature immunology*. 2014 Apr;15(4):393-401. PubMed PMID: 24608041. Pubmed Central PMCID: 3996831.

50. Kulshreshtha R, Ferracin M, Wojcik SE, Garzon R, Alder H, Agosto-Perez FJ, et al. A microRNA signature of hypoxia. *Molecular and cellular biology*. 2007 Mar;27(5):1859-67. PubMed PMID: 17194750. Pubmed Central PMCID: 1820461.

51. Hall EJ, Roizin-Towie L, Theus RB, August LS. Radiobiological properties of high-energy cyclotron-produced neutrons used for radiotherapy. *Radiology*. 1975 Oct;117(1):173-8. PubMed PMID: 808829.

52. Wang WM, Zhao ZL, Zhang WF, Zhao YF, Zhang L, Sun ZJ. Role of hypoxia-inducible factor-1alpha and CD146 in epidermal growth factor receptor-mediated angiogenesis in salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Molecular medicine reports*. 2015 Sep;12(3):3432-8. PubMed PMID: 25997612. Pubmed Central PMCID: 4526044.

53. Huang X, Ding L, Bennewith KL, Tong RT, Welford SM, Ang KK, et al. Hypoxia-Inducible mir-210 Regulates Normoxic Gene Expression Involved in Tumor Initiation. *Molecular Cell*. 2009;35(6):856-67.

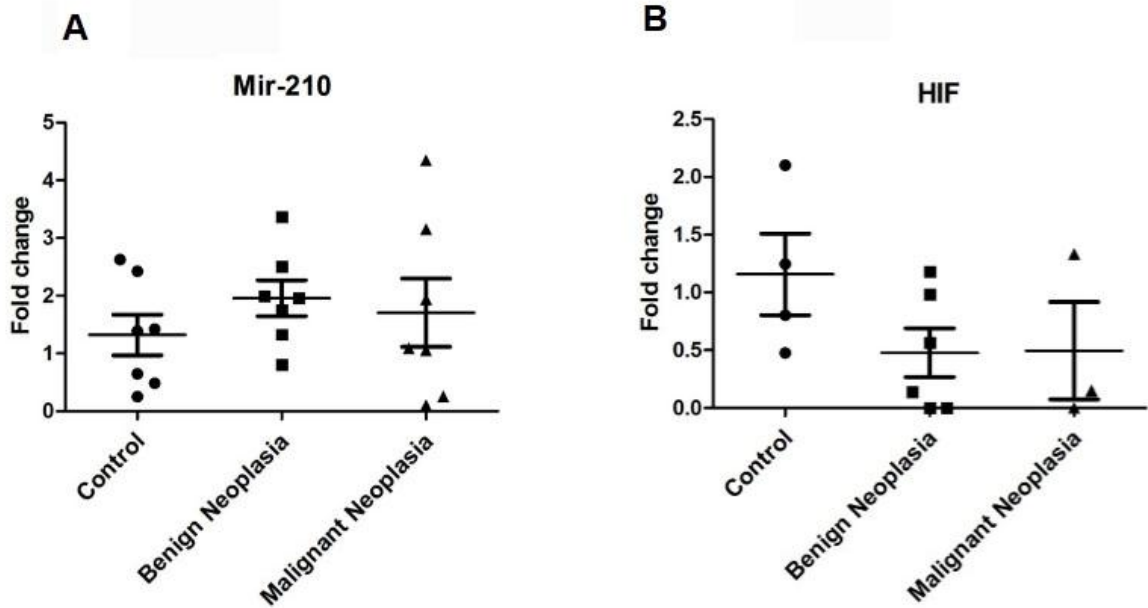


Figure 1: miR-210 or HIF-1 α mRNA levels in control, benign and malignant SGNs. (A) No difference in expression of miR-210 is observed between groups. (B) HIF-1 α expression is not altered in SGNs, compared with control samples.

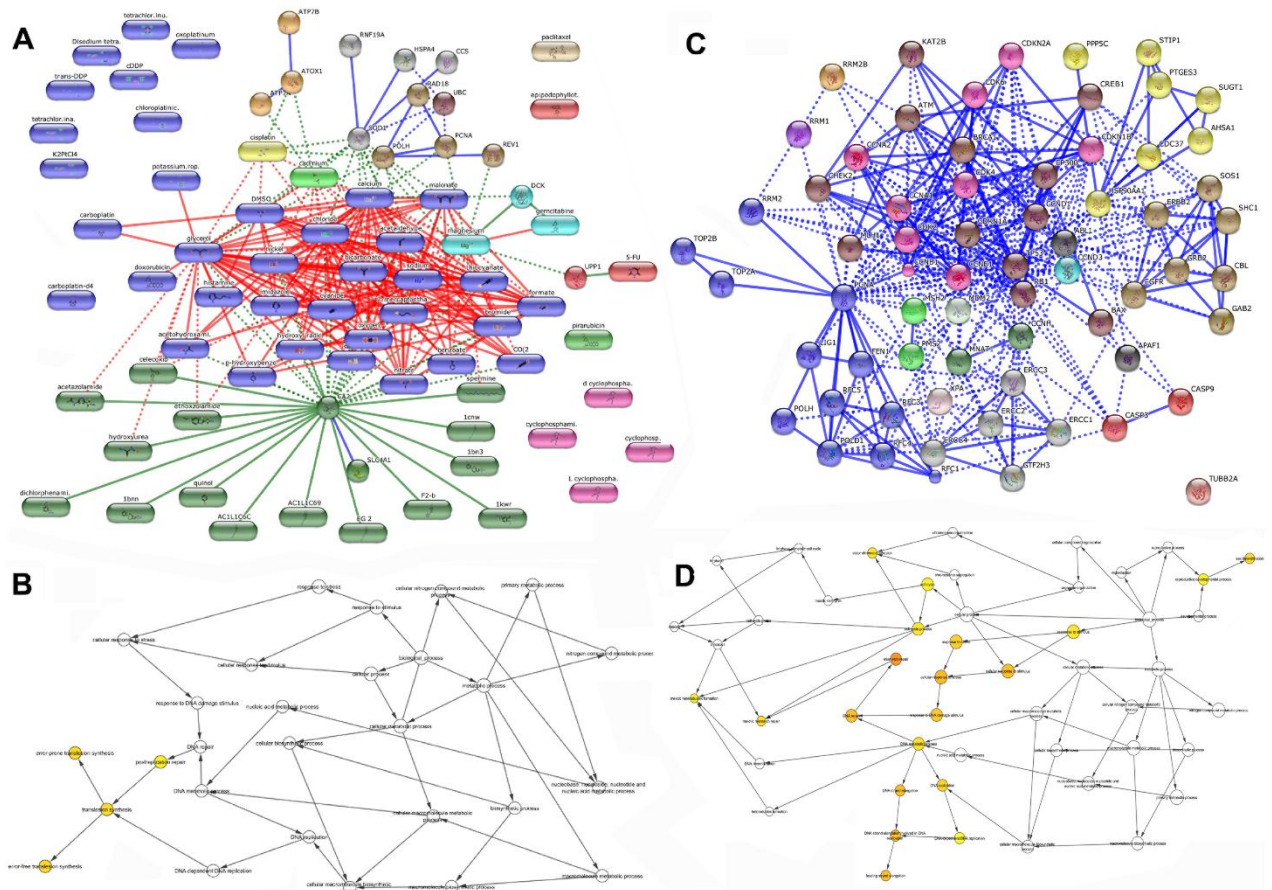


Figure 2: Bioinformatics Analyses of the main chemotherapeutic agents used for the treatment of salivary gland neoplasms. (A) STITCH confidence view of chemotherapeutic agents. Stronger associations are represented by thicker lines. Protein-protein interactions are shown in blue, chemical-protein interactions in green and interactions between chemicals in red. Links between chemicals are not used to extend the network results. (B) Ontological analyses of chemotherapy agents. The most important processes are shown in yellow. (C) STRING confidence view of main targets of chemotherapeutic agents used in SGNs. Thicker lines represent stronger protein-protein interactions and are shown in blue. (D) Ontological analyses of chemotherapeutic targets. The most important processes are shown in yellow.

Case	Anatomical Site	Diagnose	Age	Gender
Control 1	Lip	Mucocele	20	Female
Control 2	Lip	Mucocele	24	Female
Control 3	Lip	Mucocele	53	Male
Control 4	Lip	Mucocele	33	Male
Control 5	Lip	Mucocele	8	Male
Control 6	Lip	Mucocele	25	Male
Control 7	Lip	Mucocele	35	Male
Benign 1	Hard palate	Pleomorphic Adenoma	25	Male
Benign 2	Parotid	Pleomorphic Adenoma	20	Female
Benign 3	Parotid	Pleomorphic Adenoma	27	Female
Benign 4	Parotid	Pleomorphic Adenoma	32	Male
Benign 5	Parotid	Pleomorphic Adenoma	32	Female
Benign 6	Parotid	Pleomorphic Adenoma	52	Male
Benign 7	Parotid	Pleomorphic Adenoma	67	Female
Malignant 1	Parotid	Acinar Cell Carcinoma	53	Female
Malignant 2	Parotid	Adenoid Cyst Carcinoma	67	Male
Malignant 3	Submandibular gland	Adenoid Cyst Carcinoma	54	Female
Malignant 4	Parotid	Mucoepidermoid Carcinoma	11	Female
Malignant 5	Parotid	Mucoepidermoid Carcinoma	58	Male
Malignant 6	Submandibular gland	Myoepithelial Carcinoma	50	Male
Malignant 7	Submandibular gland	Myoepithelial Carcinoma	73	Male

Table 1: Descriptive data of the patient population

Acknowledgements

This study was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). Dr. Guimarães, Dr. Santos and Dr. de Paula are research fellows of the CNPq.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest: The authors deny any conflicts of interest related to this study.

3.2 Artigo 2

The effect of ionizing radiation on HIF-1 α and miR-210 under hypoxia in Oral Cancer

Sabrina Ferreira de Jesus^{1,*}, Marcela Gonçalves de Souza^{1,*}, Eloá Mangabeira Santos^{1,*}, Eliane Sobrinho Santos^{1,4}, Luiz Henrique da Silveira¹, Sérgio Henrique Sousa Santos³, Alfredo Maurício Batista de Paula^{1,2}, Lucyana Conceição Farias^{1,2} and André Luiz Sena Guimarães^{1,2}

1 Department of Dentistry, Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, Minas Gerais, Brazil.

2 Department of Clinical, Surgery and Oral Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

3 Institute of Agricultural Sciences. Food Engineering College; Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Montes Claros, Minas Gerais, Brazil.

4 Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Norte de Minas Gerais, Araçuaí, Minas Gerais, Brazil. (IFNMG).

*Authors equally contributed

Corresponding author:

André Luiz Sena Guimarães

Universidade Estadual de Montes Claros. Hospital Universitário Clemente Faria.

Laboratório de Pesquisa em Saúde, 562 Av. Cula Mangabeira Santo Expedito. Montes

Claros, MG. Brazil Zip code: 39401-001

E-mail: andreluizguimaraes@gmail.com

Cancer is among the most common causes of morbidity and mortality in the world. Among malignant epithelial neoplasms is squamous cell carcinoma comprising more than 90% of cancers of the head and neck. Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is an important public health problem and is the most common type of neoplasm. Tumor Hypoxia is associated with a higher resistance to ionizing radiation. The main protein of the hypoxia pathway is a hypoxia-1 α -induced factor (HIF-1 α). High levels of expression of this protein are associated with a worse prognosis in miR-210 is a hypoxia-induced gene, regulated by HIF-1 α and exerts several roles in the cell, such as inhibiting apoptosis and increasing angiogenesis. Our objective was to analyze whether the effect of radiotherapy changes the levels of HIF-1 α and miR-210 in patients with squamous cell carcinoma of the mouth. For this purpose, blood samples from nine patients with OSCC were used and nine blood samples from control patients were submitted to analysis of HIF-1 α mRNA and miR-210. In addition, the immortalized SCC9 cell line was subjected to hypoxia and radiation treatment, followed by migration and expression analysis of HIF-1 α mRNA and miR-210. Our results showed that radiation under hypoxia does not decrease levels of HIF-1 α and miR-210, but increases the migration capacity of neoplastic cells.

Keywords: Hypoxia. HIF-1 α . miR-210. Radiotherapy. Oral squamous cell carcinoma.

Introduction

Cancer is among the most common cause of morbidity and mortality worldwide, with about 8 million deaths and 14 million new cases reported in 2012 (1). By 2030, 20 million new cases of cancer are predicted (2). Squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC) is the sixth most common cancer worldwide, and only 50% to 60% of patients will be alive within 5 years after diagnosis (3, 4). Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most common type of oral malignancy, it is considered a major public health problem (1). Alcohol and smoking consumption are the most important risk factors currently described. These two factors have a synergistic effect (5). However, individual intrinsic factors also play an important role in the development and prognosis of cancer (6-9). Treatment may offer morbid conditions, including functional deficits, as well as significant aesthetic damages, such as speech deficiency, swallowing and facial deformity (10-12). Treatment failure and loco-regional recurrence are common (13, 14) and account for the majority of deaths (12). Treatment resistance and relapse are common despite the multimodal therapy commonly applied and have been associated with hypoxia (15). The main protein of the hypoxia pathway is HIF-1 α , which is a transcription factor that targets several genes that promote adaptations under hypoxic conditions and has been extensively studied. High expression levels of this protein are associated with a worse prognosis in different types of cancer (6, 16-19). High levels of miR-210 participate in the stabilization of HIF-1 α during hypoxia (20). HIF-1 α also regulates transcriptional expression of miR-210 under normoxia conditions (21). Overexpression of miR-210 was detected in patients with breast cancer and in head and neck cancer (22, 23) and was correlated with worse prognosis VEGF levels, hypoxia, and angiogenesis (24, 25). Moreover, miR-210 up-regulation is a crucial element of endothelial cell response to hypoxia, affecting cell survival, migration, and differentiation (26). MicroRNAs are promising as stable biomarkers in both tissues and blood (27). Previous studies investigating the role of HIF-1 α in tumor response to radiation therapy suggest that HIF-1 α may both promote radiation resistance and radiation sensitivity (28-30). HIF-1 α targets genes involved in drug resistance and processes such as extracellular matrix metabolism and cell adhesion, leading to invasion and metastasis. However, the exact mechanism that links HIF-1 α to these processes has not yet been elucidated.

Considering the conflicts in the literature on the relationship between ionizing radiation and hypoxia markers, the present study aimed to investigate the role of radiation in the expression of HIF-1 α and miR-210 and migratory behavior in OSCC cells under conditions of hypoxia.

Material and Methods

Patients

Ethical approval for this study was obtained from the relevant Institutional Review Board (process number CAAE 52760016.9.0000.5146) and signed informed consent form was obtained from all patients. Twenty-five tissue samples in patients with OSCC and normal mucosa lesions of individuals without OSCC. In addition, nine blood samples from patients with radiotherapy and individuals without OSCC. Of the nine blood samples from radiotherapy patients we evaluated the expression of the HIF-1 α mRNA and miR-210 markers at two times in each patient. In the first and last sections of the radiotherapeutic treatment. Patients presented OSCC with histological diagnoses and patients with were enrolled in the current study to measure differences in HIF-1 α mRNA levels and miR-210.

Cell culture and hypoxia

SCC9 cells (ATCC CRL-1629) were maintained in Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM/ F12, GIBCO, Billings, MT, USA), containing 10% fetal bovine serum (FBS, GIBCO, Billings, MT, USA), 400 ng/mL hydrocortisone, and antibiotic/antimycotic solution (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) at 37°C with 5% CO₂ in a humidified air atmosphere. To obtain synchronized cultures of SCC9 cells (1x10⁵), cells were seeded in a 12-well plate and synchronized for 24 hours by serum starvation and released with media containing without FBS. All treatments were performed in the absence of FBS. To simulate hypoxic conditions, SCC-9 cells were cultured in media with the addition of 100 μ M claret cobalt (CoCl₂, Sigma, St. Louis, MO, USA) for a period of 24 hours. The stock solutions of CoCl₂ were filter-sterilized (0.22 μ m). The resultant solutions were kept at 4 °C and used within 24 hours for the assay. All culture experiments were performed in triplicate.

Radiation assay and groups

X-rays beam from GAMMATRON-S80, source CO-60 GK 60T03 was used in this study. The cells were irradiated using isocentric technique with the linear accelerator positioned at the base of the adhered cell. Two vertical parallel opposed fields were used. The Source-axis distance (SAD) was 80cm. The field size of 10x10 cm² at the isocenter plane was the same for both fields. The cells were irradiated with doses of 6 Gy. To maintain the electronic equilibrium during X-rays irradiation, T25 tissue flasks were filled with DMEM/F12. The effect of radiation on SCC9 cells was evaluated in all assays after 24 hours of radiation. Comparisons were among the four groups, which included control, CoCl₂, Radiation, and CoCl₂+Radiation.

RNA isolation and qRT-PCR

RNA was isolated using the Trizol reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), according to the manufacturer. Total RNA was treated with DNase I, Amplification Grade (Invitrogen, cat number 18068015, Carlsbad, CA, USA) and then 1.5 µg of RNA was reverse transcribed with the SuperScript® First-Strand Synthesis System for RT-PCR. (Invitrogen, cat number 11904018, Carlsbad, CA, USA). For qRT-PCR, 66 ng of the cDNA was added to SYBER GREEN reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) with HIF-1α primers (31) and amplification was performed on a StepOne QRT-PCR System (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). All reactions were done in triplicate and Beta-Actin was used as an endogenous control for gene expression analysis. For experiments with patient tissues, the normal mucosa was used as a calibrator group. For *in vitro* studies, untreated cells (control group) were used as a calibrator. The results were quantified as Ct values, where Ct was defined as the threshold cycle of PCR at which the amplified product is first detected and defined as relative gene expression (the ratio of target/endogenous). qRT-PCR was analyzed by the 2^{-ΔΔCt} method.

For miR-210 (ID: Hs04231470_s1, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), a TaqMan assay was performed according to the manufacturer's protocol. RNU44 was used as an endogenous control for miR-210 analysis (ID: 001094, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), All reactions were done in triplicate. For experiments with patient tissues, samples of normal mucosa were used as calibrator. For *in vitro* studies, untreated cells (control group) were used as a calibrator. The following reaction steps were used for

amplification: 95°C for 10 min, 95°C for 15s and 60°C for 1min. The Ct values of endogenous controls were subtracted from the Ct values of the respective targets to calculate the ΔCt . The ΔCt values from each experimental group were averaged and converted to log base 2 using the equation $2^{-\Delta Ct}$ in order to compare expression among different samples.

Wound scratch assay

Cell migration was monitored in a wound scratch assay as described previously (32). Briefly, a scratch was made with a sterile pipette tip in a confluent cell layer, washed twice in PBS, and then $CoCl_2$ 100 μmol were added in serum-free medium. Wells were photographed at the beginning of the experiment and after 24 hours (SCC9 cells). Pictures were obtained with a camera SC30 (Olympus, Center Valley, PA, USA) in an IX81 inverted microscope (Olympus, Center Valley, PA, USA). ImageJ software was used for analysis (33). To calculate the wound healing ratio, the initial area (in pixels) was divided by the final cell-free area (in pixels).

Statistical analysis

Analyses were performed using SPSS (Version 18.0) and GraphPad Prism software (Version 5.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Kolmogorov-Smirnov and the Shapiro-Wilk Tests were performed to evaluate data distribution. As samples presented as a normal distribution, one-way ANOVA, followed by Tukey post test was conducted. All data are given as means \pm S.D. Statistical significance was accepted at $p < 0.05$.

Results

HIF-1 α and miR-210 expression in patients with OSCC primary lesion

In order to justify the in vitro investigation of the ionizing radiation role on HIF-1 α and mir-210 expression in OSCC cells, first we measured the mRNA levels of both transcripts in patients with OSCC primary lesion. qRT-PCR was performed to compare mRNA levels of HIF-1 α and mir-210 in patients with OSCC and individuals with normal mucosa. The HIF-1 α mRNA expression was increased in patients with OSCC compared to normal mucosa (Figure 1A). Similar levels of miR-210 were observed among patients with OSCC compared to normal mucosa (Figure 1B).

Effect of Radiation on cell migration under hypoxic conditions in cells SCC9

The wound scraping assay was performed to clarify the effect of radiation on SCC9 cells phenotype under a hypoxic environment. Radiation under hypoxic environment increased significantly migration of SCC9 cells compared to radiation without mimicking hypoxia. (Figure 2 A, B). Therefore, radiation was able to reduce cell migration under normoxia condition, but not under hypoxia.

Expression of HIF-1 α and miR-210 under hypoxia in irradiated SCC9 cells

Since hypoxia is a factor that increases the expression of HIF-1 α , we assessed the role of ionizing radiation on HIF-1 α and mir-210 expression in OSCC cells under hypoxia-mimicking. Radiation in hypoxia condition did not promote changes in HIF-1 α mRNA levels (Figure 3A). Similar results were observed in miR-210 expression levels (Figure 3B).

HIF-1 α and miR-210 expression systemic in patients with OSCC submitted to radiotherapy

Considering the conflicting role of HIF-1 α in OSCC we evaluated the blood mRNA expression of HIF-1 α and miR-210 in patients with OSCC undergoing radiotherapy. Similar levels of HIF-1 α (Figure 4 A) and miR-210 (Figure 4 B) were observed in patients with OSCC submitted to radiotherapy compared to control. Our in vitro assay results were consistent with the analysis of OSCC patients undergoing radiotherapy.

Discussion

HIF-1 α is one of the markers of hypoxia-activated under hypoxic conditions (7, 34, 35). The G1790A and C1772T polymorphisms of the HIF-1 α gene are associated with an increased expression of the HIF-1 α protein, thus suggesting its association with poor prognosis in patients with upper aerodigestive tract carcinoma (6). HIF-1 has overexpressed in patients with oropharyngeal squamous cell cancer and the degree of expression has a predictive value and prognostic value in individuals undergoing radiation therapy (19). Another study shows that high expression of HIF-1 α in patients treated with postoperative radiotherapy was associated with survival, thus being a new marker of prognosis in oral squamous cell carcinoma (36). The literature describes

conflicting views on the role of HIF-1 α under radiation in squamous cell carcinoma of the oral cavity. The angiogenic profile of the oral mucosa of oral cancer patients compared to samples compared with normal oral mucosa is significantly higher (37). In the present study, when we compared of HIF-1 α mRNA levels and Mir-210 in patients with OSCC and normal mucosa, HIF-1 α levels were higher in patients with OSCC. However, miR-210 did not show a significant difference between OSCC and normal mucosa. Studies show that suppression of HIF-1 α expression by anti-hypoxic therapy increases radiosensitivity to radiotherapy in the tumor (29, 38, 39). Through stimulation of endothelial cell survival, HIF-1 α promotes tumor resistance (29). The degree of oxygen sensitization is often cited as an oxygen enhancement ratio (OER), which is the proportion of doses required to obtain the same probability of control of the tumor tissue with normal oxygenation status (40). For ionizing radiation, such as X-rays and γ -rays, the high-dose OER has a value between 2.5 and 3.5. The oxygenation status of the tumor is very important for the effects of irradiation. Increased oxygen concentration produces free radicals. Accordingly, there is an increase in the target tissue damage (41). Depending on the capillary distance, solid tumors contain normoxic and hypoxic regions (42). In normoxic cells, a dose of radiation kills a larger population of cells than in hypoxic cells. Normal cells are radiosensitive (43). As a result, hypoxic tumors require a higher radiation dose to achieve the same local control rate (44). Increasing the dose is important to overcome tumor hypoxia. Thus, radiotherapy is an important modality in the combinational treatment of neoplasms and is used in the treatment of several neoplasms with good therapeutic effects (45). In the present study, radiation increased cell migration in SCC9 cells under hypoxic environment, whereas radiation under normoxia environment decreased the migration of SCC9 cells. Tumor hypoxia has an adverse impact on the outcome of radiotherapy inducing changes in the genome and proteome of neoplastic cells. There is an increase in survival and malignant progression, allowing the cells to overcome nutritional deprivation or escape from their hostile environment (46). Our results showed in the *in vitro* assay that the effect of radiation on of HIF-1 α mRNA levels and miR-210 was similar between hypoxic and non-hypoxic cells. Then, it was tested whether the radiation could decrease of HIF-1 α mRNA levels and miR-210 in patients with OSCC during the treatment of radiotherapy. Since the HIF-1 α mRNA levels and miR-210 were not shown to be decreased in the *in vitro* assay, we also showed that the blood levels of these markers were not controlled as compared to the control. Our results show that radiation did not decrease HIF-1 α

levels and miR-210. Studies show that miR-210 is HIF-1 α dependent and the expression of miR-210 may potentially serve as a surrogate marker for tumor hypoxia *in vivo* (21). MicroRNAs are promising as stable biomarkers in both tissues and blood. The miR-210 decrease proapoptotic signaling in a hypoxic environment, suggesting an impact of such carcinogenesis transcripts (27). Although hypoxia has generally been recognized for its impact on glucose metabolism, certain hypoxic tumors demonstrate marginal increases in glucose uptake and lactate production (47). miRNAs have the capacity to act as regulators of the expression of the gene that allows influencing the signaling pathways. Thus, it can modify several cellular processes involved in the response to irradiation (48, 49).

In conclusion, this study highlighted that radiation under hypoxia condition increased migratory behavior of OSCC cells, but it no interfered on mRNA levels of hypoxia and angiogenesis markers, HIF-1 α and miR-210. Thus, more investigations are needed to elucidate the molecular pathways involved in the OSCC cells migration exposed to the ionizing radiation and hypoxia environment.

Acknowledgements

This study was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Norte de Minas Gerais (IFNMG) and the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). Dr. Guimarães, Dr. Gomez, Dr. Santos and Dr. de Paula are research fellows of the CNPq.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest: The authors deny any conflicts of interest related to this study.

Grant Support: This study was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Norte de Minas Gerais (IFNMG- Araçuaí) and the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

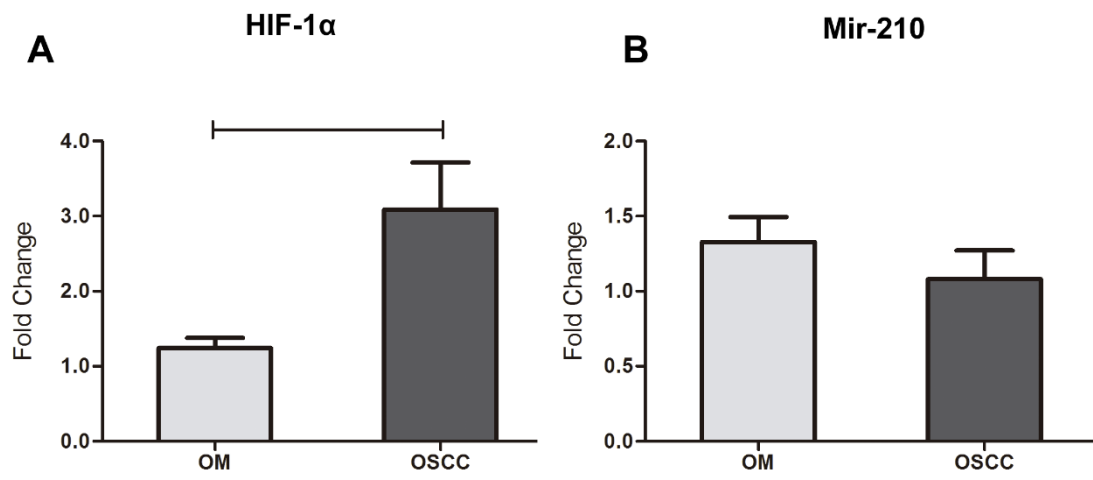
Figures

Figure 1: HIF-1 α and MiR-210 levels in patients OSSC and control

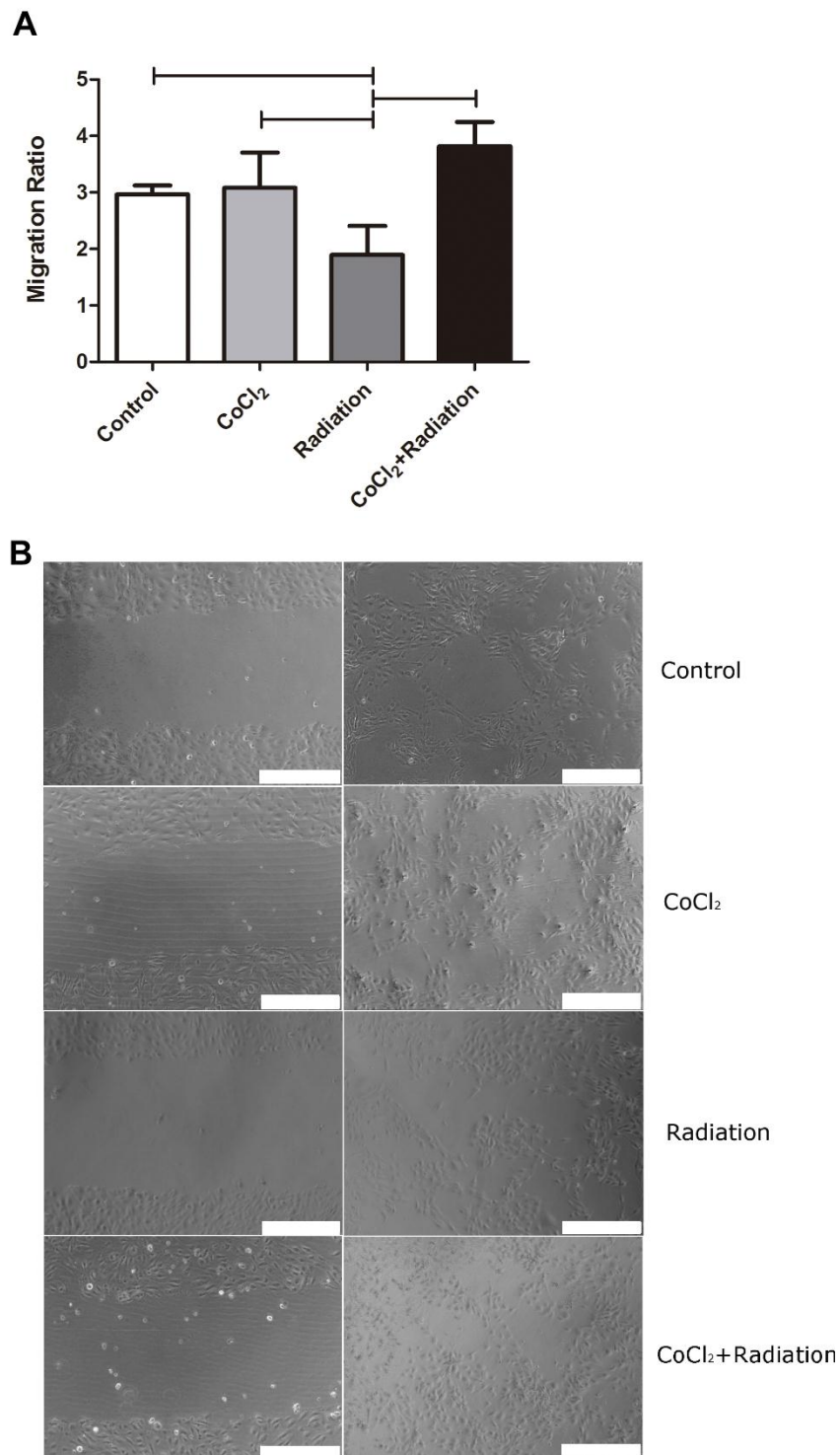


Figure 2: Effect of Radiation on cell migration under hypoxic conditions

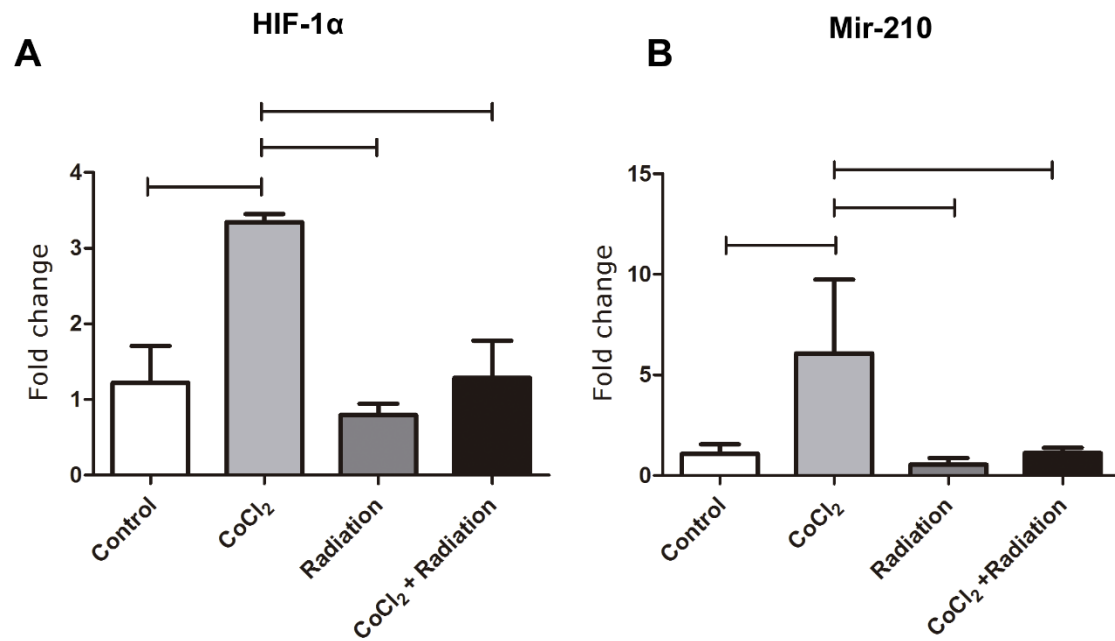


Figure 3: Effect of Radiation on HIF-1 α and miR-210 under hypoxic conditions

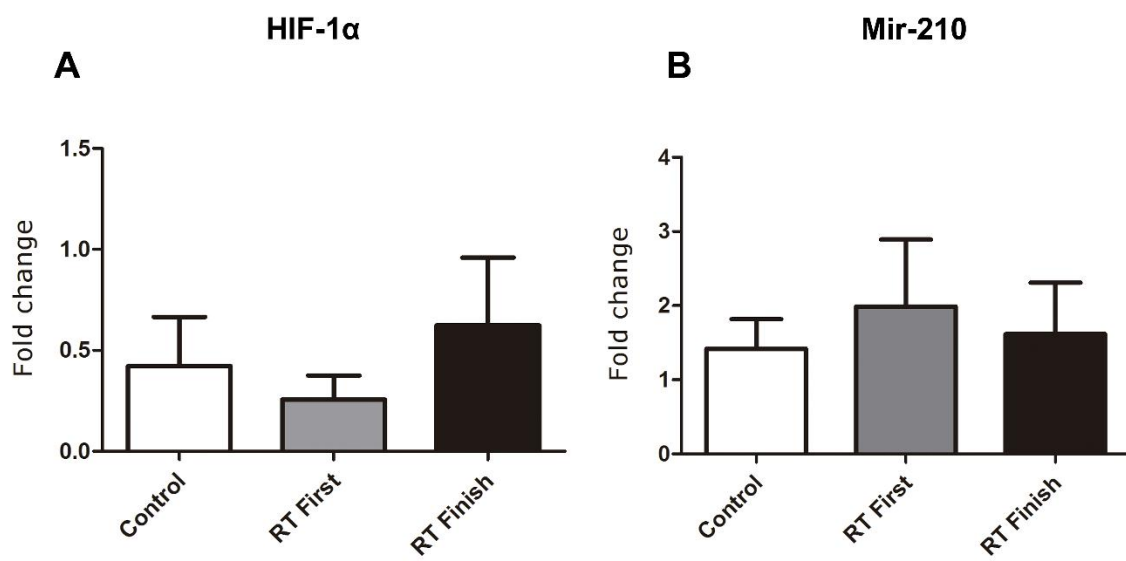


Figure 4: HIF-1 α and miR-210 expression systemic in patients with OSCC submitted to radiotherapy

Legends:**Figure 1:** HIF-1 α and MiR-210 levels in patients OSSC and control

In (A), the expression of HIF-1 α in patients with OSCC. HIF-1 α mRNA levels were increased in comparison to control. In (B), the expression of miR-210 in patients with OSCC. miR-210 levels were similar in comparison to control.

Figure 2: Effect of Radiation on cell migration under hypoxic conditions

In (A, B) after 24 hours CoCl₂+ radiation increases migration and the radiation decreases migration. The scale of 100 μ m.

Figure 3: Effect of Radiation on HIF-1 α and miR-210 under hypoxic conditions

After 24 hours radiation in hypoxia condition did not promote changes in HIF-1 α mRNA levels (A). Similar results were observed in miR-210 expression levels (B).

Figure 4: HIF-1 α and miR-210 expression systemic in patients with OSCC submitted to radiotherapy

In (A), the expression of HIF-1 α in patients with OSCC undergoing radiotherapy. HIF-1 α mRNA levels were similar after radiation in comparison to control. In (B) the expression of miR-210 in patients with OSCC undergoing radiotherapy. miR-210 levels were similar after radiation in comparison to control.

References

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*. 2015 Mar 01;136(5):E359-86.
2. Bray F, Jemal A, Grey N, Ferlay J, Forman D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. *The Lancet Oncology*. 2012 Aug;13(8):790-801.
3. Nordsmark M, Bentzen SM, Rudat V, Brizel D, Lartigau E, Stadler P, et al. Prognostic value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumors after primary radiation therapy. An international multi-center study. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2005 Oct;77(1):18-24.
4. Marur S, Forastiere AA. Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment. *Mayo Clinic proceedings*. 2008 Apr;83(4):489-501.
5. Gupta A, Baxi S, Hoyne C. Assessing feasibility, compliance and toxicity of concomitant chemo-radiotherapy in head and neck cancers in the Northern Territory: initial experience and challenges. *Journal of medical radiation sciences*. 2016 Jul 01.
6. Fraga CA, de Oliveira MV, de Oliveira ES, Barros LO, Santos FB, Gomez RS, et al. A high HIF-1alpha expression genotype is associated with poor prognosis of upper aerodigestive tract carcinoma patients. *Oral oncology*. 2012 Feb;48(2):130-5.
7. Gruber G, Greiner RH, Hlushchuk R, Aebbersold DM, Altermatt HJ, Berclaz G, et al. Hypoxia-inducible factor 1 alpha in high-risk breast cancer: an independent prognostic parameter? *Breast cancer research : BCR*. 2004;6(3):R191-8.
8. de Carvalho Fraga CA, Alves LR, Marques-Silva L, de Sousa AA, Jorge AS, de Jesus SF, et al. High HIF-1alpha expression genotypes in oral lichen planus. *Clinical oral investigations*. 2013 Dec;17(9):2011-5.
9. Thongchot S, Yongvanit P, Loilome W, Seubwai W, Phunicom K, Tassaneeyakul W, et al. High expression of HIF-1alpha, BNIP3 and PI3KC3: hypoxia-induced autophagy predicts cholangiocarcinoma survival and metastasis. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2014;15(14):5873-8.
10. Stelzle F, Knipfer C, Schuster M, Bocklet T, Nöth E, Adler W, et al. Factors influencing relative speech intelligibility in patients with oral squamous cell carcinoma: a prospective study using automatic, computer-based speech analysis. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2013;42(11):1377-84.
11. Speksnijder CM, van der Glas HW, van der Bilt A, van Es RJJ, van der Rijt E, Koole R. Oral Function After Oncological Intervention in the Oral Cavity: A Retrospective Study. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2010;68(6):1231-7.
12. Leemans CR, Tiwari R, Nauta JJ, van der Waal I, Snow GB. Recurrence at the primary site in head and neck cancer and the significance of neck lymph node metastases as a prognostic factor. *Cancer*. 1994 Jan 01;73(1):187-90.

13. De Felice F, Thomas C, Barrington S, Pathmanathan A, Lei M, Urbano TG. Analysis of loco-regional failures in head and neck cancer after radical radiation therapy. *Oral oncology*. 2015;51(11):1051-5.
14. Oksuz DC, Prestwich RJ, Carey B, Wilson S, Senocak MS, Choudhury A, et al. Recurrence patterns of locally advanced head and neck squamous cell carcinoma after 3D conformal (chemo)-radiotherapy. *Radiation oncology*. 2011;6(1):54.
15. Nordsmark M, Bentzen SM, Rudat V, Brizel D, Lartigau E, Stadler P, et al. Prognostic value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumors after primary radiation therapy. An international multi-center study. *Radiotherapy and Oncology*. 2005;77(1):18-24.
16. Hoffmann AC, Mori R, Vallbohmer D, Brabender J, Drebber U, Baldus SE, et al. High expression of heparanase is significantly associated with dedifferentiation and lymph node metastasis in patients with pancreatic ductal adenocarcinomas and correlated to PDGFA and via HIF1a to HB-EGF and bFGF. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*. 2008 Oct;12(10):1674-81; discussion 81-2.
17. Tuomisto A, Garcia-Solano J, Sirnio P, Vayrynen J, Perez-Guillermo M, Makinen MJ, et al. HIF-1alpha expression and high microvessel density are characteristic features in serrated colorectal cancer. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2016 Oct;469(4):395-404.
18. van der Groep P, Bouter A, Menko FH, van der Wall E, van Diest PJ. High frequency of HIF-1alpha overexpression in BRCA1 related breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2008 Oct;111(3):475-80.
19. Aebbersold DM, Burri P, Beer KT, Laissue J, Djonov V, Greiner RH, et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha: a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer. *Cancer research*. 2001 Apr 01;61(7):2911-6.
20. Puisségur MP, Mazure NM, Bertero T, Pradelli L, Grosso S, Robbe-Sermesant K, et al. miR-210 is overexpressed in late stages of lung cancer and mediates mitochondrial alterations associated with modulation of HIF-1 activity. *Cell Death and Differentiation*. 2011 10/0103/17/received08/12/revised 08/16/accepted;18(3):465-78.
21. Huang X, Ding L, Bennewith KL, Tong RT, Welford SM, Ang KK, et al. Hypoxia-Inducible mir-210 Regulates Normoxic Gene Expression Involved in Tumor Initiation. *Molecular Cell*. 2009;35(6):856-67.
22. Camps C, Buffa FM, Colella S, Moore J, Sotiriou C, Sheldon H, et al. hsa-miR-210 Is Induced by Hypoxia and Is an Independent Prognostic Factor in Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2008;14(5):1340-8.
23. Gee HE, Camps C, Buffa FM, Patiar S, Winter SC, Betts G, et al. hsa-miR-210 is a marker of tumor hypoxia and a prognostic factor in head and neck cancer. *Cancer*. 2010;116(9):2148-58.

24. Suzuki HI, Katsura A, Matsuyama H, Miyazono K. MicroRNA regulons in tumor microenvironment. *Oncogene*. 2015 08/1805/04/received06/04/revised 06/06/accepted;34(24):3085-94.
25. Liu SC, Chuang SM, Hsu CJ, Tsai CH, Wang SW, Tang CH. CTGF increases vascular endothelial growth factor-dependent angiogenesis in human synovial fibroblasts by increasing miR-210 expression. *Cell death & disease*. 2014 10/2305/23/received08/21/revised09/04/accepted;5(10):e1485
26. Fasanaro P, D'Alessandra Y, Di Stefano V, Melchionna R, Romani S, Pompilio G, et al. MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3. *The Journal of biological chemistry*. 2008 Jun 06;283(23):15878-83.
27. Kulshreshtha R, Ferracin M, Wojcik SE, Garzon R, Alder H, Agosto-Perez FJ, et al. A microRNA signature of hypoxia. *Molecular and cellular biology*. 2007 Mar;27(5):1859-67.
28. Yang X, Zhu H, Ge Y, Liu J, Cai J, Qin Q, et al. Melittin enhances radiosensitivity of hypoxic head and neck squamous cell carcinoma by suppressing HIF-1 α . *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2014 Oct;35(10):10443-8.
29. Moeller BJ, Dreher MR, Rabbani ZN, Schroeder T, Cao Y, Li CY, et al. Pleiotropic effects of HIF-1 blockade on tumor radiosensitivity. *Cancer cell*. 2005 Aug;8(2):99-110.
30. Liu J, Zhang J, Wang X, Li Y, Chen Y, Li K, et al. HIF-1 and NDRG2 contribute to hypoxia-induced radioresistance of cervical cancer Hela cells. *Experimental cell research*. 2010 Jul 15;316(12):1985-93.
31. Helman LJ, Gazdar AF, Park JG, Cohen PS, Cotelingam JD, Israel MA. Chromogranin A expression in normal and malignant human tissues. *The Journal of clinical investigation*. 1988 Aug;82(2):686-90.
32. Al Okail MS. Cobalt chloride, a chemical inducer of hypoxia-inducible factor-1 α in U251 human glioblastoma cell line. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2010 4//;14(2):197-201.
33. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Meth*. 2012 07//print;9(7):671-5.
34. Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends in molecular medicine*. 2002;8(4 Suppl):S62-7.
35. Na XI, Wu G, Ryan CK, Schoen SR, di'Santagnese PA, Messing EM. Overproduction of Vascular Endothelial Growth Factor Related to von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Gene Mutations and Hypoxia-Inducible Factor-1 α ; Expression in Renal Cell Carcinomas. *The Journal of urology*. 2003;170(2):588-92.

36. Santos Md, Mercante AMdC, Louro ID, Gonçalves AJ, Carvalho MBd, da Silva EHT, et al. HIF1-Alpha Expression Predicts Survival of Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity. *PloS one*. 2012;7(9):e45228.
37. El-Gazzar R, Macluskey M, Ogden GR. Evidence for a field change effect based on angiogenesis in the oral mucosa? A brief report. *Oral oncology*. 2005 Jan;41(1):25-30.
38. Harada H, Itasaka S, Zhu Y, Zeng L, Xie X, Morinibu A, et al. Treatment regimen determines whether an HIF-1 inhibitor enhances or inhibits the effect of radiation therapy. *British journal of cancer*. 2009 02/1701/20/revised01/22/accepted;100(5):747-57.
39. Moeller BJ, Cao Y, Li CY, Dewhirst MW. Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors. *Cancer cell*. 2004;5(5):429-41.
40. Dasu A, Denekamp J. New insights into factors influencing the clinically relevant oxygen enhancement ratio. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 1998 Mar;46(3):269-77.
41. Carlson DJ, Stewart RD, Semenenko VA. Effects of oxygen on intrinsic radiation sensitivity: A test of the relationship between aerobic and hypoxic linear-quadratic (LQ) model parameters. *Medical physics*. 2006 Sep;33(9):3105-15.
42. Cho WK, Seong YR, Lee YH, Kim MJ, Hwang KS, Yoo J, et al. Oncolytic effects of adenovirus mutant capable of replicating in hypoxic and normoxic regions of solid tumor. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2004 Nov;10(5):938-49.
43. Hockel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *Journal of the National Cancer Institute*. 2001 Feb 21;93(4):266-76.
44. Palcic B, Korbelik M, Trotter M, Revesz L. Oxygen enhancement ratio of fractionated regimens in vitro. *Radiation research*. 1989 Mar;117(3):409-18.
45. Chatterjee S, Willis N, Locks SM, Mott JH, Kelly CG. Dosimetric and radiobiological comparison of helical tomotherapy, forward-planned intensity-modulated radiotherapy and two-phase conformal plans for radical radiotherapy treatment of head and neck squamous cell carcinomas. *The British journal of radiology*. 2011 04/12/received08/20/revised08/24/accepted;84(1008):1083-90.
46. Vaupel P, Harrison L. Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. *The oncologist*. 2004;9 Suppl 5:4-9.
47. Rajendran JG, Mankoff DA, O'Sullivan F, Peterson LM, Schwartz DL, Conrad EU, et al. Hypoxia and glucose metabolism in malignant tumors: evaluation by [18F]fluoromisonidazole and [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004 Apr 01;10(7):2245-52.
48. Marta GN, Garicochea B, Carvalho AL, Real JM, Kowalski LP. MicroRNAs, cancer and ionizing radiation: Where are we? *Revista da Associação Médica Brasileira*. 2015;61:275-81.

49. Zhao L, Bode AM, Cao Y, Dong Z. Regulatory mechanisms and clinical perspectives of miRNA in tumor radiosensitivity. *Carcinogenesis*. 2012 07/0404/30/received06/27/revised07/12/accepted;33(11):2220-7.

4 CONCLUSÃO

Em conclusão, nas NGSs não houve diferenças estatisticamente significantes entre os níveis de miR-210 e HIF-1 α , comparado com o grupo controle de tecido salivar normal. A Análise de bioinformática demonstrou que processos relacionados com o DNA e divisão celular, são os alvos quimioterápicos mais importantes em NGSs. Adicionalmente, destacamos que a radiação sob condições de hipóxia aumentou o comportamento migratório das células OSCC, mas não interferiu nos níveis de m RNA dos marcadores de hipóxia e angiogênese, HIF-1 α e miR-210. Assim, são necessárias mais investigações para elucidar as vias moleculares envolvidas na migração das células OSCC expostas à radiação ionizante e ao ambiente hipóxico.

REFERÊNCIAS

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*. 2015;136(5):E359-E86.
2. Bray F, Jemal A, Grey N, Ferlay J, Forman D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study. *The Lancet Oncology*. 2012;13(8):790-801.
3. Nordmark M, Bentzen SM, Rudat V, Brizel D, Lartigau E, Stadler P, et al. Prognostic value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumors after primary radiation therapy. An international multi-center study. *Radiotherapy and Oncology*. 2005;77(1):18-24.
4. Marur S, Forastiere AA. Head and Neck Cancer: Changing Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings*. 2008;83(4):489-501.
5. Gupta A, Baxi S, Hoyne C. Assessing feasibility, compliance and toxicity of concomitant chemo-radiotherapy in head and neck cancers in the Northern Territory: initial experience and challenges. *Journal of medical radiation sciences*. 2016 Jul 01.
6. Fraga CAdC, de Oliveira MVM, de Oliveira ÉS, Barros LO, Santos FBG, Gomez RS, et al. A high HIF-1α expression genotype is associated with poor prognosis of upper aerodigestive tract carcinoma patients. *Oral Oncology*. 2012;48(2):130-5.
7. Ragin CCR, Modugno F, Gollin SM. The Epidemiology and Risk Factors of Head and Neck Cancer: a Focus on Human Papillomavirus. *Journal of dental research*. 2007 February 1, 2007;86(2):104-14.
8. Speksnijder CM, van der Glas HW, van der Bilt A, van Es RJ, van der Rijt E, Koole R. Oral function after oncological intervention in the oral cavity: a retrospective study. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 2010 Jun;68(6):1231-7.
9. De Felice F, Thomas C, Barrington S, Pathmanathan A, Lei M, Urbano TG. Analysis of loco-regional failures in head and neck cancer after radical radiation therapy. *Oral Oncol*. 2015 Nov;51(11):1051-5.
10. Oksuz DC, Prestwich RJ, Carey B, Wilson S, Senocak MS, Choudhury A, et al. Recurrence patterns of locally advanced head and neck squamous cell carcinoma after 3D conformal (chemo)-radiotherapy. *Radiation Oncology (London, England)*. 2011 05/2403/01/received 05/24/accepted;6:54.
11. Leemans CR, Tiwari R, Nauta JJP, Waal IVD, Snow GB. Recurrence at the primary site in head and neck cancer and the significance of neck lymph node metastases as a prognostic factor. *Cancer*. 1994;73(1):187-90.
12. Kalavrezos N, Bhandari R. Current trends and future perspectives in the surgical management of oral cancer. *Oral Oncol*. 2010 Jun;46(6):429-32.

13. Pignon JP, Bourhis J, Domenge C, Designé L. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. *The Lancet*. 2000;355(9208):949-55.
14. Corvo R. Evidence-based radiation oncology in head and neck squamous cell carcinoma. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2007 Oct;85(1):156-70.
15. Mazon R, Tao Y, Lusinchi A, Bourhis J. Current concepts of management in radiotherapy for head and neck squamous-cell cancer. *Oral Oncol*. 2009 Apr-May;45(4-5):402-8. PubMed PMID: 19375379. Epub 2009/04/21. eng.
16. Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of Cancer Incidence, Mortality, and Prevalence Across Five Continents: Defining Priorities to Reduce Cancer Disparities in Different Geographic Regions of the World. *Journal of Clinical Oncology*. 2006;24(14):2137-50.
17. de Oliveira FA, Duarte ECB, Taveira CT, Máximo AA, de Aquino ÉC, Alencar RdC, et al. Salivary Gland Tumor: A Review of 599 Cases in a Brazilian Population. *Head and Neck Pathology*. 2009 09/1604/24/received 08/25/accepted;3(4):271-5.
18. Tumors of the Salivary Glands, Atlas of Tumor Pathology: Third Series, Fascicle 17 G. L. Ellis and P. L. Auclair. Armed Forces Institute of Pathology, Washington D.C. ISBN: 1 881041 26 3 (Printed). 1996. Price: \$69.00. ISBN: 1 881041 41 7 (CD-ROM). 1998. Price: \$65.00. *The Journal of pathology*. 2000;192(4):564-5.
19. Shishegar M, Ashraf MJ, Azarpira N, Khademi B, Hashemi B, Ashrafi A. Salivary gland tumors in maxillofacial region: a retrospective study of 130 cases in a southern Iranian population. *Pathology research international*. 2011;2011:934350.
20. Fonseca FP, de Vasconcelos Carvalho M, de Almeida OP, Rangel ALCA, Takizawa MCH, Bueno AG, et al. Clinicopathologic analysis of 493 cases of salivary gland tumors in a Southern Brazilian population. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. 2012;114(2):230-9.
21. Tian Z, Li L, Wang L, Hu Y, Li J. Salivary gland neoplasms in oral and maxillofacial regions: a 23-year retrospective study of 6982 cases in an eastern Chinese population. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2010;39(3):235-42.
22. Ivanova S, Slobodnikova J, Janska E, Jozefakova J. Fine needle aspiration biopsy in a diagnostic workup algorithm of salivary gland tumors. *Neoplasma*. 2003;50(2):144-7.
23. Wijffels KIEM, Hoogsteen IJ, Lok J, Rijken PFJW, Marres HAM, de Wilde PCM, et al. No Detectable Hypoxia in Malignant Salivary Gland Tumors: Preliminary Results. *International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics*. 73(5):1319-25.
24. Cerda T, Sun XS, Vignot S, Marcy P-Y, Baujat B, Baglin A-C, et al. A rationale for chemoradiation (vs radiotherapy) in salivary gland cancers? On behalf of the REFCOR (French rare head and neck cancer network). *Critical Reviews in Oncology / Hematology*. 2014;91(2):142-58.

25. Terhaard CH, Lubsen H, Rasch CR, Levendag PC, Kaanders HH, Tjho-Heslinga RE, et al. The role of radiotherapy in the treatment of malignant salivary gland tumors. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2005 Jan 01;61(1):103-11.
26. Till BG, Martins RG. Response to paclitaxel in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *Head & neck*. 2008 Jun;30(6):810-4.
27. Cerda T, Sun XS, Vignot S, Marcy PY, Baujat B, Baglin AC, et al. A rationale for chemoradiation (vs radiotherapy) in salivary gland cancers? On behalf of the REFCOR (French rare head and neck cancer network). *Critical reviews in oncology/hematology*. 2014 Aug;91(2):142-58. PubMed PMID: 24636481. Epub 2014/03/19. eng.
28. Wijffels KIEM, Hoogsteen IJ, Lok J, Rijken PFJW, Marres HAM, de Wilde PCM, et al. No Detectable Hypoxia in Malignant Salivary Gland Tumors: Preliminary Results. *International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics*. 2009;73(5):1319-25.
29. Swelam W, Ida-Yonemochi H, Maruyama S, Ohshiro K, Cheng J, Saku T. Vascular endothelial growth factor in salivary pleomorphic adenomas: one of the reasons for their poorly vascularized stroma. *Virchows Archiv*. 2005;446(6):653-62.
30. Hagg M, Wennstrom S. Activation of hypoxia-induced transcription in normoxia. *Experimental cell research*. 2005 May 15;306(1):180-91.
31. Warburg O. On the Origin of Cancer Cells. *Science*. 1956;123(3191):309-14.
32. Kim J-w, Dang CV. Cancer's Molecular Sweet Tooth and the Warburg Effect. *Cancer Research*. 2006;66(18):8927-30.
33. Almeida CMd, Jesus SFd, Poswar FdO, Gomes ESB, Fraga CA dC, Farias LC, et al. Increasing demonstration of angiogenic markers in skin neoplastic lesions. *Pathology - Research and Practice*. 2016 2//;212(2):101-5.
34. de Carvalho Fraga CA, Alves LR, Marques-Silva L, de Sousa AA, Jorge ASB, de Jesus SF, et al. High HIF-1 α expression genotypes in oral lichen planus. *Clinical Oral Investigations*. 2013;17(9):2011-5.
35. Jaakkola P, Mole DR, Tian Y-M, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, et al. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau Ubiquitylation Complex by O₂-Regulated Prolyl Hydroxylation. *Science*. 2001;292(5516):468-72.
36. Ikeda Y, Taveira-DaSilva AM, Pacheco-Rodriguez G, Steagall WK, El-Chemaly S, Gochuico BR, et al. Erythropoietin-driven proliferation of cells with mutations in the tumor suppressor gene *TSC2*. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2011;300(1):L64-L72.
37. Halmos GB, Bruine de Bruin L, Langendijk JA, van der Laan BF, Pruijm J, Steenbakkers RJ. Head and neck tumor hypoxia imaging by 18F-fluoroazomycin-arabino-18F-FAZA)-PET: a review. *Clinical nuclear medicine*. 2014 Jan;39(1):44-8.

38. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Research*. 2013;42(D1):D68-D73.
39. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Research*. 2014 11/2510/11/received10/31/accepted;42(Database issue):D68-D73.
40. Janga SC, Vallabhaneni S. MicroRNAs as Post-Transcriptional Machines and their Interplay with Cellular Networks. In: Collins LJ, editor. *RNA Infrastructure and Networks*. New York, NY: Springer New York; 2011. p. 59-74.
41. Yang JS, Lai EC. Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants. *Molecular cell*. 2011 Sep 16;43(6):892-903. PubMed PMID: 21925378.
42. van Kouwenhove M, Kedde M, Agami R. MicroRNA regulation by RNA-binding proteins and its implications for cancer. *Nature reviews Cancer*. 2011 Aug 05;11(9):644-56.
43. Puisségur MP, Mazure NM, Bertero T, Pradelli L, Grosso S, Robbe-Sermesant K, et al. miR-210 is overexpressed in late stages of lung cancer and mediates mitochondrial alterations associated with modulation of HIF-1 activity. *Cell Death and Differentiation*. 2011 10/0103/17/received08/12/revised08/16/accepted;18(3):465-78.
44. Fasanaro P, D'Alessandra Y, Di Stefano V, Melchionna R, Romani S, Pompilio G, et al. MicroRNA-210 Modulates Endothelial Cell Response to Hypoxia and Inhibits the Receptor Tyrosine Kinase Ligand Ephrin-A3. *The Journal of Biological Chemistry*. 2008 01/28/received 04/15/revised;283(23):15878-83.
45. Merlo A, Quiros SBd, Secades P, Zambrano I, Balbín M, Astudillo A, et al. Identification of a Signaling Axis HIF-1 α /MicroRNA-210/ISCU Independent of SDH Mutation That Defines a Subgroup of Head and Neck Paragangliomas. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2012;97(11):E2194-E200.
46. Ellis L, Hammers H, Pili R. Targeting tumor angiogenesis with histone deacetylase inhibitors. *Cancer Lett*. 2009 Aug 08;280(2):145-53.
47. Kulshreshtha R, Ferracin M, Wojcik SE, Garzon R, Alder H, Agosto-Perez FJ, et al. A microRNA signature of hypoxia. *Molecular and cellular biology*. 2007 Mar;27(5):1859-67. PubMed PMID: 17194750.
48. Overgaard J. Hypoxic radiosensitization: adored and ignored. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007 Sep 10;25(26):4066-74.
49. Höckel M, Vaupel P. Tumor Hypoxia: Definitions and Current Clinical, Biologic, and Molecular Aspects. *Journal of the National Cancer Institute*. 2001 February 21, 2001;93(4):266-76.
50. Vaupel P, Harrison L. Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. *The oncologist*. 2004;9 Suppl 5:4-9.

51. Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2007;26(2):225-39.
52. Rajendran JG, Mankoff DA, O'Sullivan F, Peterson LM, Schwartz DL, Conrad EU, et al. Hypoxia and Glucose Metabolism in Malignant Tumors. Evaluation by [¹⁸F]Fluoromisonidazole and [¹⁸F]Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography Imaging. 2004;10(7):2245-52.
53. Burgman P, Odonoghue JA, Humm JL, Ling CC. Hypoxia-Induced increase in FDG uptake in MCF7 cells. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2001 Jan;42(1):170-5.
54. Bollineni VR, Wiegman EM, Pruijm J, Groen HJM, Langendijk JA. Hypoxia imaging using Positron Emission Tomography in non-small cell lung cancer: Implications for radiotherapy. *Cancer Treatment Reviews*. 2012;38(8):1027-32.
55. Mortensen LS, Johansen J, Kallehauge J, Primdahl H, Busk M, Lassen P, et al. FAZA PET/CT hypoxia imaging in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck treated with radiotherapy: Results from the DAHANCA 24 trial. *Radiotherapy and Oncology*. 2012;105(1):14-20.
56. Zips D, Zöphel K, Abolmaali N, Perrin R, Abramyuk A, Haase R, et al. Exploratory prospective trial of hypoxia-specific PET imaging during radiochemotherapy in patients with locally advanced head-and-neck cancer. *Radiotherapy and Oncology*. 2012;105(1):21-8.
57. Bittner M-I, Wiedenmann N, Bucher S, Hentschel M, Mix M, Weber WA, et al. Exploratory geographical analysis of hypoxic subvolumes using ¹⁸F-MISO-PET imaging in patients with head and neck cancer in the course of primary chemoradiotherapy. *Radiotherapy and Oncology*. 2013;108(3):511-6.
58. Lohith TG, Kudo T, Demura Y, Umeda Y, Kiyono Y, Fujibayashi Y, et al. Pathophysiologic Correlation Between ⁶²Cu-ATSM and ¹⁸F-FDG in Lung Cancer. *Journal of Nuclear Medicine*. 2009 December 1, 2009;50(12):1948-53.
59. Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol*. 2002 Dec;29(6 Suppl 16):15-8.
60. Gambichler T, Skrygan M, Hyun J, Bechara F, Tomi NS, Altmeyer P, et al. Cytokine mRNA expression in basal cell carcinoma. *Archives of dermatological research*. 2006 Aug;298(3):139-41.
61. Koontongkaew S. The Tumor Microenvironment Contribution to Development, Growth, Invasion and Metastasis of Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Journal of Cancer*. 2013 01/0111/16/received12/20/accepted;4(1):66-83.
62. Sedivy R, Beck-Mannagetta J, Haverkamp C, Battistutti W, Honigschnabl S. Expression of vascular endothelial growth factor-C correlates with the lymphatic microvessel density and the nodal status in oral squamous cell cancer. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2003 Sep;32(8):455-60.

63. El-Gazzar R, Macluskey M, Ogden GR. Evidence for a field change effect based on angiogenesis in the oral mucosa? A brief report. *Oral Oncology*. 2005;41(1):25-30.
64. El-Gazzar R, Macluskey M, Williams H, Ogden GR. Vascularity and expression of vascular endothelial growth factor in oral squamous cell carcinoma, resection margins, and nodal metastases. *The British journal of oral & maxillofacial surgery*. 2006 Jun;44(3):193-7.
65. Macluskey M, Chandrachud LM, Pazouki S, Green M, Chisholm DM, Ogden GR, et al. Apoptosis, proliferation, and angiogenesis in oral tissues. Possible relevance to tumour progression. *The Journal of pathology*. 2000 Aug;191(4):368-75.
66. Williams MD. Integration of Biomarkers Including Molecular Targeted Therapies in Head and Neck Cancer. *Head and Neck Pathology*. 2010;4(1):62-9.
67. Chatterjee S, Willis N, Locks SM, Mott JH, Kelly CG. Dosimetric and radiobiological comparison of helical tomotherapy, forward-planned intensity-modulated radiotherapy and two-phase conformal plans for radical radiotherapy treatment of head and neck squamous cell carcinomas. *The British Journal of Radiology*. 2011;84(1008):1083-90.
68. De Ruyscher D, van Baardwijk A, Steevens J, Botterweck A, Bosmans G, Reymen B, et al. Individualised isotoxic accelerated radiotherapy and chemotherapy are associated with improved long-term survival of patients with stage III NSCLC: a prospective population-based study. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2012 Feb;102(2):228-33.
69. Pérez-Sayáns M, Somoza-Martín JM, Barros-Angueira F, Diz PG, Rey JMG, García-García A. Multidrug resistance in oral squamous cell carcinoma: The role of vacuolar ATPases. *Cancer Letters*. 2010;295(2):135-43.
70. Li L, Story M, Legerski RJ. Cellular responses to ionizing radiation damage. *International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics*. 2015;49(4):1157-62.
71. Brizel DM, Sibley GS, Prosnitz LR, Scher RL, Dewhirst MW. Tumor hypoxia adversely affects the prognosis of carcinoma of the head and neck. *International Journal of Radiation Oncology*Biography*Physics*. 1997 1997/05/01;38(2):285-9.
72. Okunieff P, Hoeckel M, Dunphy EP, Schlenger K, Knoop C, Vaupel P. Oxygen tension distributions are sufficient to explain the local response of human breast tumors treated with radiation alone. *International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics*. 1993;26(4):631-6.
73. Gatenby RA, Kessler HB, Rosenblum JS, Coia LR, Moldofsky PJ, Hartz WH, et al. Oxygen distribution in squamous cell carcinoma metastases and its relationship to outcome of radiation therapy. *International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics*. 1988;14(5):831-8.
74. Nordmark M, Overgaard M, Overgaard J. Pretreatment oxygenation predicts radiation response in advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiotherapy and Oncology*. 1996;41(1):31-9.

APÊNDICES

APÊNDICES A- Supplementary material Artigo 1

Supplementary Table 1:

Number	Drug	Main Target	Effect
1	5FU	P53, GAAD45, MDM2, ABL1, BAX, CASP3, CASP9	DNA Damage
2	Bevacizumab	VEGF	Angiogenesis
3	Carboplatin	P53, GAAD45, MDM2, ABL1, BAX, CASP3, CASP9	DNA Damage
4	Cisplatin	P53, GAAD45, MDM2, ABL1, BAX, CASP3, CASP9	DNA Damage
5	CPT11	P53, GAAD45, MDM2, ABL1, BAX, CASP3, CASP9	DNA Damage
6	Cyclophosphamide	P53, GAAD45, MDM2, ABL1, BAX, CASP3, CASP9	DNA Damage
7	doxorubicin	P53, GAAD45, MDM2, ABL1, BAX, CASP3, CASP9, MLH1, MSH2, TOP2A, ERCC1, ERCC2	DNA Damage
8	Gemcitabine	P53, GAAD45, MDM2, ABL1, BAX, CASP3, CASP9	DNA Damage
9	Hydroxyurea	RRM1	DNA replication
10	Paclitaxel	TUBB2A	Cell replication
11	Pirarubicin	TOP2B, TOP2A,	DNA replication
12	Trastuzumab	ERBB2	Cell replication
13	Vp16	TOP2B, TOP2A,	DNA replication

Main chemotherapy agents used to treat SGNs according Cerda T, Sun XS, Vignot S, Marcy PY, Baujat B, Baglin AC, et al. A rationale for chemoradiation (vs radiotherapy) in salivary gland cancers? On behalf of the REFCOR (French rare head and neck cancer network). *Critical reviews in oncology/hematology*. 2014;91(2):142-58.

Supplementary Table 2 STITCH results

#node1	node2	combined_score
imidazole	sodium	0.900
DMSO	nickel	0.900
CA2	nickel	0.900
REV1	magnesium	0.900
thiocyanate	2-mercaptoetha.	0.900
cisplatin	chloroplatinic.	0.026
chloride	nickel	0.900
benzoate	bicarbonate	0.900
CO(2	chloride	0.900
CA2	histamine	0.900
acetaldehyde	oxygen	0.900
acetaldehyde	sodium	0.900
calcium	cisplatin	0.900
glycerol	oxygen	0.900
ATP7A	cadmium	0.900
nitrate	2-mercaptoetha.	0.900
CA2	imidazole	0.900
CA2	celecoxib	0.900
bromide	glycerol	0.900
cDDP	tetrachlor.ina.	0.026
cisplatin	oxoplatinum	0.026
CA2	sodium	0.900
DCK	gemcitabine	0.900
bicarbonate	nitrate	0.900
bicarbonate	imidazole	0.900
thiocyanate	nickel	0.900
CA2	sulfur	0.900
bicarbonate	sodium	0.900
chloride	2-mercaptoetha.	0.900
POLH	cisplatin	0.900
CA2	1bnn	0.900
sodium	nickel	0.900
SOD1	acetaldehyde	0.900
chloride	DMSO	0.900
potassium.rop.	chloroplatinic.	0.026
bromide	sodium	0.900
ATOX1	cisplatin	0.900
DMSO	2-mercaptoetha.	0.900
CA2	oxygen	0.900
CA2	1kwr	0.900

benzoate	magnesium	0.900
cisplatin	tetrachlor.ina.	0.026
cDDP	Disodium tetra.	0.026
benzoate	glycerol	0.900
bromide	calcium	0.900
cyclophosphami.	cyclophosp.de-	0.026
calcium	chloride	0.900
benzoate	malonate	0.900
DMSO	cadmium	0.900
PCNA	POLH	0.998
acetaldehyde	magnesium	0.900
benzoate	sodium	0.900
formate	nickel	0.900
potassium.rop.	K2PtCl4	0.026
p-hydroxybenzo.	bromide	0.900
formate	nitrate	0.900
SOD1	DMSO	0.900
acetaldehyde	2-mercaptoetha.	0.900
tetrachlor.inu.	trans-DDP	0.026
cyanide	thiocyanate	0.900
sulfur	magnesium	0.900
malonate	nickel	0.900
bicarbonate	2-mercaptoetha.	0.900
magnesium	nitrate	0.900
cyanide	sodium	0.900
glycerol	magnesium	0.900
d cyclophospha.	L cyclophospha.	0.026
CO(2	bicarbonate	0.900
trans-DDP	oxoplatinum	0.026
Disodium tetra.	K2PtCl4	0.026
calcium	cyanide	0.900
bromide	cyanide	0.900
tetrachlor.inu.	potassium.rop.	0.026
magnesium	gemcitabine	0.900
magnesium	nickel	0.900
CA2	AC1L1C6C	0.900
tetrachlor.inu.	tetrachlor.ina.	0.026
RNF19A	SOD1	0.937
chloride	cadmium	0.900
glycerol	malonate	0.900
bromide	chloride	0.900
CA2	spermine	0.900
CA2	SLC4A1	0.974
hydroxyl radic.	oxygen	0.900
CO(2	glycerol	0.900

sodium	cadmium	0.900
cDDP	tetrachlor.inu.	0.026
oxoplatinum	Disodium tetra.	0.026
chloride	oxygen	0.900
glycerol	histamine	0.900
chloride	cyanide	0.900
UPP1	5-FU	0.900
tetrachlor.inu.	K2PtCl4	0.026
bromide	thiocyanate	0.900
CA2	acetazolamide	0.900
nickel	nitrate	0.900
thiocyanate	oxygen	0.900
nickel	2-mercaptoetha.	0.900
SOD1	chloride	0.900
DMSO	magnesium	0.900
cisplatin	cDDP	0.026
magnesium	cadmium	0.900
SOD1	cadmium	0.900
DMSO	histamine	0.900
cyclophosphami.	d cyclophospha.	0.026
formate	magnesium	0.900
formate	glycerol	0.900
formate	imidazole	0.900
benzoate	chloride	0.900
bicarbonate	nickel	0.900
bicarbonate	cadmium	0.900
CA2	hydroxyurea	0.900
bromide	DMSO	0.900
DMSO	cisplatin	0.900
trans-DDP	Disodium tetra.	0.026
acetaldehyde	cyanide	0.900
calcium	hydroxyl radic.	0.900
calcium	formate	0.900
calcium	CO(2	0.900
DMSO	glycerol	0.900
carboplatin	carboplatin-d4	0.026
UBC	HSPA4	0.978
glycerol	thiocyanate	0.900
sulfur	glycerol	0.900
cDDP	potassium.rop.	0.026
chloride	imidazole	0.900
calcium	oxygen	0.900
glycerol	sodium	0.900
formate	thiocyanate	0.900
formate	malonate	0.900

imidazole	magnesium	0.900
cDDP	chloroplatinic.	0.026
SOD1	calcium	0.900
POLH	REV1	0.994
trans-DDP	tetrachlor.ina.	0.026
calcium	DMSO	0.900
chloride	glycerol	0.900
bicarbonate	celecoxib	0.900
glycerol	imidazole	0.900
calcium	nitrate	0.900
tetrachlor.ina.	K2PtCl4	0.026
sodium	hydroxyl radic.	0.900
bromide	malonate	0.900
DMSO	bicarbonate	0.900
POLH	magnesium	0.900
chloroplatinic.	tetrachlor.ina.	0.026
bromide	bicarbonate	0.900
cisplatin	potassium.rop.	0.026
ATP7A	ATOX1	0.992
trans-DDP	K2PtCl4	0.026
thiocyanate	sodium	0.900
POLH	sodium	0.900
magnesium	sodium	0.900
glycerol	celecoxib	0.900
magnesium	2-mercaptoetha.	0.900
cyanide	magnesium	0.900
glycerol	nickel	0.900
calcium	histamine	0.900
chloride	malonate	0.900
acetaldehyde	calcium	0.900
potassium.rop.	Disodium tetra.	0.026
sodium	2-mercaptoetha.	0.900
CA2	quinol	0.900
HSPA4	SOD1	0.937
nickel	oxygen	0.900
formate	hydroxyl radic.	0.900
CA2	ethoxzolamide	0.900
CA2	hydroxyl radic.	0.900
p-hydroxybenzo.	sodium	0.900
CA2	DMSO	0.900
bromide	magnesium	0.900
sulfur	bicarbonate	0.900
CA2	1bn3	0.900
glycerol	acetohydroxami.	0.900
hydroxyl radic.	cadmium	0.900

sulfur	nickel	0.900
SOD1	cisplatin	0.900
CA2	EG 2	0.900
formate	2-mercaptoetha.	0.900
tetrachlor.ina.	oxoplatinum	0.026
CA2	acetaldehyde	0.900
DMSO	imidazole	0.900
glycerol	acetazolamide	0.900
CO(2	sodium	0.900
acetaldehyde	formate	0.900
magnesium	oxygen	0.900
cyclophosp.de-	d cyclophospha.	0.026
bicarbonate	magnesium	0.900
cDDP	trans-DDP	0.026
CA2	formate	0.900
cyanide	cadmium	0.900
DCK	magnesium	0.900
bromide	nickel	0.900
SOD1	malonate	0.900
acetaldehyde	chloride	0.900
potassium.rop.	trans-DDP	0.026
UPP1	magnesium	0.900
UBC	SOD1	0.998
calcium	sodium	0.900
glycerol	bicarbonate	0.900
potassium.rop.	oxoplatinum	0.026
tetrachlor.inu.	chloroplatinic.	0.026
glycerol	doxorubicin	0.900
POLH	calcium	0.900
chloride	sodium	0.900
glycerol	2-mercaptoetha.	0.900
CA2	bromide	0.900
chloride	cisplatin	0.900
cDDP	oxoplatinum	0.026
CA2	chloride	0.900
magnesium	hydroxyl radic.	0.900
CA2	F2-b	0.900
benzoate	bromide	0.900
chloroplatinic.	K2PtCl4	0.026
cyanide	nickel	0.900
UBC	RAD18	0.988
cyclophosphami.	L cyclophospha.	0.026
cisplatin	Disodium tetra.	0.026
PCNA	RAD18	0.998
calcium	2-mercaptoetha.	0.900

acetaldehyde	sulfur	0.900
nickel	cadmium	0.900
CA2	AC1L1C69	0.900
acetaldehyde	nickel	0.900
p-hydroxybenzo.	2-mercaptoetha.	0.900
potassium.rop.	tetrachlor.ina.	0.026
CO(2	magnesium	0.900
DCK	calcium	0.900
CA2	2-mercaptoetha.	0.900
glycerol	cisplatin	0.900
formate	sodium	0.900
CA2	acetohydroxami.	0.900
calcium	malonate	0.900
p-hydroxybenzo.	glycerol	0.900
malonate	sodium	0.900
thiocyanate	imidazole	0.900
thiocyanate	nitrate	0.900
chloride	ethoxzolamide	0.900
CA2	thiocyanate	0.900
chloride	magnesium	0.900
CA2	CO(2	0.900
SOD1	glycerol	0.900
cisplatin	K2PtCl4	0.026
calcium	magnesium	0.900
acetaldehyde	DMSO	0.900
tetrachlor.inu.	Disodium tetra.	0.026
imidazole	oxygen	0.900
magnesium	spermine	0.900
ATOX1	cadmium	0.900
calcium	glycerol	0.900
CA2	glycerol	0.900
calcium	thiocyanate	0.900
PCNA	magnesium	0.900
calcium	nickel	0.900
acetaldehyde	cadmium	0.900
acetaldehyde	nitrate	0.900
acetaldehyde	bromide	0.900
calcium	bicarbonate	0.900
chloroplatinic.	Disodium tetra.	0.026
SOD1	sodium	0.900
DMSO	carboplatin	0.900
sodium	oxygen	0.900
PCNA	chloride	0.900
SOD1	bicarbonate	0.900
formate	chloride	0.900

DMSO	malonate	0.900
CA2	cyanide	0.900
glycerol	cadmium	0.900
CA2	bicarbonate	0.900
cisplatin	trans-DDP	0.026
glycerol	cyanide	0.900
POLH	RAD18	0.974
sodium	acetohydroxami.	0.900
DMSO	thiocyanate	0.900
chloride	sulfur	0.900
oxoplatinum	K2PtCl4	0.026
chloride	nitrate	0.900
chloroplatinic.	oxoplatinum	0.026
acetaldehyde	malonate	0.900
ATOX1	ATP7B	0.937
acetaldehyde	glycerol	0.900
p-hydroxybenzo.	calcium	0.900
chloride	bicarbonate	0.900
PCNA	UBC	0.998
thiocyanate	magnesium	0.900
glycerol	potassium.rop.	0.900
calcium	imidazole	0.900
CA2	benzoate	0.900
acetaldehyde	thiocyanate	0.900
malonate	2-mercaptoetha.	0.900
cisplatin	tetrachlor.inu.	0.026
glycerol	carboplatin	0.900
CA2	nitrate	0.900
calcium	acetohydroxami.	0.900
chloride	thiocyanate	0.900
CCS	SOD1	0.974
POLH	UBC	0.994
CA2	1cnw	0.900
glycerol	hydroxyurea	0.900
SOD1	thiocyanate	0.900
glycerol	hydroxyl radic.	0.900
bromide	formate	0.900
chloride	hydroxyl radic.	0.900
tetrachlor.ina.	Disodium tetra.	0.026
calcium	cadmium	0.900
cyclophosp.de-.	L cyclophospha.	0.026
imidazole	nickel	0.900
CA2	p-hydroxybenzo.	0.900
glycerol	ethoxzolamide	0.900
DMSO	sodium	0.900

CA2	dichlorphenami.	0.900
bicarbonate	thiocyanate	0.900
sodium	nitrate	0.900
imidazole	2-mercaptoetha.	0.900
POLH	glycerol	0.900
formate	DMSO	0.900
chloroplatinic.	trans-DDP	0.026
glycerol	nitrate	0.900
malonate	magnesium	0.900
cDDP	K ₂ PtCl ₄	0.026
tetrachlor.inu.	oxoplatinum	0.026
nickel	acetohydroxami.	0.900

Supplementary Table 3 STRING results

#node1	node2	combined_score
RFC3	PCNA	0.999
MDM2	CHEK2	0.999
ERCC2	MNAT1	0.999
TP53	RRM2B	0.999
CCND3	CDKN1A	0.999
RB1	CDK2	0.999
CDK6	CDKN1B	0.999
ERCC2	ERCC3	0.999
ERCC2	CCNH	0.999
POLD1	PCNA	0.999
RFC3	RFC4	0.999
CDK2	CDKN1A	0.999
CCNA2	CDKN1A	0.999
MDM2	TP53	0.999
APAF1	CASP9	0.999
RB1	CDK6	0.999
TP53	MSH2	0.999
CCNA1	CDKN1A	0.999
XPA	ERCC4	0.999
MNAT1	CCNH	0.999
BAX	TP53	0.999
CDK2	CCNB1	0.999
CDKN2A	CCND1	0.999
HSP90AA1	EGFR	0.999
RRM2	RRM1	0.999
CDK6	CCND1	0.999
TP53	CDK2	0.999
CCNB1	CDKN1A	0.999
RFC1	RFC3	0.999
GTF2H3	ERCC3	0.999
HSP90AA1	TP53	0.999
MDM2	CDKN2A	0.999
GTF2H3	ERCC2	0.999
CREB1	EP300	0.999
CCNA2	RB1	0.999
CCNA2	CDKN1B	0.999
SUGT1	HSP90AA1	0.999
GRB2	ERBB2	0.999
SHC1	CBL	0.999
SOS1	EGFR	0.999
CDK4	CDC37	0.999
PCNA	LIG1	0.999

PCNA	POLH	0.999
ABL1	RB1	0.999
MDM2	CDKN1A	0.999
SHC1	SOS1	0.999
RFC5	RFC4	0.999
RRM1	RRM2B	0.999
BRCA1	TP53	0.999
TP53	CDKN1A	0.999
CCND3	CDKN1B	0.999
RFC1	PCNA	0.999
PCNA	MSH2	0.999
MSH2	ERCC1	0.999
HSP90AA1	ERBB2	0.999
HSP90AA1	PTGES3	0.999
PCNA	RFC4	0.999
CDKN2A	CDK4	0.999
PCNA	CDK4	0.999
CCND3	CDK2	0.999
CCNE1	CDKN1A	0.999
CDK2	CCNH	0.999
CDK4	CCND1	0.999
CHEK2	ATM	0.999
PCNA	CDKN1A	0.999
CDKN2A	CDKN1A	0.999
RFC1	RFC4	0.999
EGFR	CBL	0.999
XPA	ERCC3	0.999
KAT2B	EP300	0.999
CDK4	CDKN1A	0.999
RFC5	RFC3	0.999
GRB2	CBL	0.999
ERCC3	MNAT1	0.999
RFC5	PCNA	0.999
CCNA2	CDK2	0.999
PCNA	CCND1	0.999
CCND3	CDK6	0.999
SHC1	GRB2	0.999
GTF2H3	MNAT1	0.999
SHC1	ERBB2	0.999
CASP9	CASP3	0.999
RB1	CCNE1	0.999
ABL1	GRB2	0.999
CDK4	CDKN1B	0.999
TP53	KAT2B	0.999
CDKN1A	CCND1	0.999

CCNE1	CDKN1B	0.999
SHC1	EGFR	0.999
CDK2	CCND1	0.999
HSP90AA1	PPP5C	0.999
CHEK2	TP53	0.999
MDM2	EP300	0.999
HSP90AA1	CDC37	0.999
GRB2	EGFR	0.999
BRCA1	CHEK2	0.999
ATM	TP53	0.999
ERCC4	ERCC1	0.999
CDK6	CDKN1A	0.999
BRCA1	ATM	0.999
CDKN1B	CCND1	0.999
EGFR	ERBB2	0.999
CDKN2A	CDK6	0.999
RFC5	RFC1	0.999
MSH2	MLH1	0.999
HSP90AA1	STIP1	0.999
CDK2	CDKN1B	0.999
SHC1	GAB2	0.999
RB1	CDK4	0.999
ABL1	CBL	0.999
GAB2	GRB2	0.999
TP53	EP300	0.999
ERCC3	CCNH	0.999
CDK2	CCNA1	0.999
ABL1	ATM	0.999
PMS2	MLH1	0.999
CCND3	CDK4	0.999
SOS1	GRB2	0.999
RB1	CCND1	0.999
CDKN2A	TP53	0.999
PCNA	CDK2	0.999
PCNA	FEN1	0.999
HSP90AA1	AHSA1	0.999
MDM2	RB1	0.999
XPA	ERCC1	0.999
CDK2	CCNE1	0.999
PMS2	MSH2	0.999
ERCC4	MSH2	0.998
CREB1	TP53	0.998
PCNA	TP53	0.998
TOP2A	TOP2B	0.998
MDM2	ATM	0.998

CCND3	RB1	0.998
TP53	RB1	0.998
CDK4	CCNH	0.997
HSP90AA1	CDK4	0.997
EGFR	TP53	0.997
APAF1	CASP3	0.997
GTF2H3	CCNH	0.997
CCNB1	CCNA1	0.997
CCNA1	CDKN1B	0.997
TP53	CCNB1	0.996
STIP1	AHSA1	0.996
CDKN2A	RB1	0.996
EP300	CDKN1A	0.996
BRCA1	CDK2	0.996
APAF1	TP53	0.996
PCNA	MLH1	0.996
ERCC2	XPA	0.995
CCNE1	CDK4	0.995
TP53	MLH1	0.995
KAT2B	CCND1	0.995
ERCC2	ERCC1	0.995
ABL1	HSP90AA1	0.995
BRCA1	CDK4	0.995
MDM2	CASP3	0.994
MDM2	KAT2B	0.994
MDM2	ABL1	0.994
CDKN1A	CDKN1B	0.993
ERCC2	ERCC4	0.993
CCND3	CCNH	0.993
CCNA2	CCNB1	0.993
POLD1	ERCC4	0.993
CREB1	CCND1	0.992
ERCC3	TP53	0.992
CDKN2A	CDKN1B	0.992
RB1	CCNA1	0.992
TOP2A	PCNA	0.992
ERCC4	ERCC3	0.992
RB1	CCNB1	0.992
CDK6	CCNE1	0.992
CDK4	CCNB1	0.992
CASP3	CDKN1A	0.992
EP300	CCND1	0.992
BRCA1	EP300	0.992
CDK2	CDK6	0.992
CREB1	ATM	0.991

APAF1	HSP90AA1	0.991
CDKN2A	ABL1	0.990
RB1	EP300	0.990
ERCC3	ERCC1	0.990
ABL1	CCND1	0.990
CDK6	CCNB1	0.990
XPA	POLH	0.989
CCNA2	CDK4	0.989
ABL1	TP53	0.988
TP53	CDK4	0.988
PCNA	RRM2	0.987
RB1	CDKN1A	0.986
POLD1	ERCC1	0.986
ERCC2	TP53	0.985
STIP1	PTGES3	0.985
CHEK2	MSH2	0.985
CDKN2A	CDK2	0.985
CDK6	CDK4	0.984
PCNA	CDK6	0.984
CASP3	RB1	0.984
PCNA	CCND3	0.984
SHC1	ABL1	0.983
ERBB2	CCND1	0.983
ATM	CDK2	0.983
CDK6	CDC37	0.983
EGFR	CDC37	0.983
BRCA1	MSH2	0.982
APAF1	BAX	0.981
PCNA	EP300	0.981
TP53	CCND1	0.979
SUGT1	PTGES3	0.978
ATM	MLH1	0.978
PCNA	CCNB1	0.976
CCNA2	TP53	0.976
GRB2	CDKN1B	0.976
SOS1	CBL	0.976
CCNH	CCNB1	0.975
SOS1	ABL1	0.975
ERBB2	TP53	0.974
ATM	CDKN1A	0.974
BRCA1	CCNE1	0.974
POLD1	ERCC2	0.973
SOS1	ERBB2	0.973
PCNA	PMS2	0.972
ATM	CDK4	0.971

POLD1	FEN1	0.971
CCNA2	CDK6	0.971
CCNH	CCND1	0.970
PCNA	XPA	0.969
EP300	CDK4	0.969
PCNA	CCNA1	0.969
CDKN2A	CCND3	0.968
POLD1	POLH	0.968
BRCA1	RB1	0.968
RB1	CDKN1B	0.967
ERBB2	CBL	0.964
BRCA1	PCNA	0.964
EGFR	CCND1	0.963
CDK2	EP300	0.962
CCNH	CCNA1	0.962
PCNA	CCNA2	0.961
RFC5	POLD1	0.961
PCNA	RRM1	0.961
POLD1	RFC4	0.960
XPA	MSH2	0.960
CDK2	MNAT1	0.960
PCNA	RB1	0.960
CCNA2	CCNE1	0.960
RB1	MNAT1	0.960
POLD1	RFC3	0.959
POLD1	MSH2	0.959
CCNE1	CCNA1	0.959
RFC1	CASP3	0.958
FEN1	LIG1	0.958
FEN1	ERCC3	0.957
CHEK2	KAT2B	0.957
TP53	PMS2	0.956
PCNA	CCNE1	0.955
HSP90AA1	ERCC3	0.955
MDM2	CDK2	0.954
SUGT1	AHSA1	0.953
CREB1	CDKN1A	0.952
CDK2	LIG1	0.951
BRCA1	MLH1	0.951
CCNE1	CCNH	0.951
XPA	CCNH	0.950
SHC1	HSP90AA1	0.950
MNAT1	ERCC1	0.950
SHC1	CREB1	0.950
TP53	CCNH	0.950

CREB1	GRB2	0.950
CCNE1	CCNB1	0.949
MDM2	HSP90AA1	0.949
BRCA1	CDKN1B	0.948
CCNH	CDKN1A	0.948
CHEK2	RB1	0.948
ERCC4	CCNH	0.948
PCNA	ABL1	0.947
GTF2H3	XPA	0.947
POLD1	LIG1	0.947
ERBB2	CDC37	0.947
POLD1	RFC1	0.945
ABL1	CDKN1B	0.945
XPA	MNAT1	0.945
RRM2	TP53	0.944
CCNH	CDKN1B	0.944
CCNH	ERCC1	0.943
CREB1	EGFR	0.943
GTF2H3	ERCC1	0.941
CDK4	MLH1	0.940
GTF2H3	ERCC4	0.939
RRM2	CDK2	0.939
CCNB1	CCND1	0.939
RB1	CCNH	0.939
SOS1	HSP90AA1	0.939
RRM2	CCNE1	0.937
CHEK2	CDKN1A	0.937
ABL1	CDK6	0.935
CDK4	CCNA1	0.934
CCNA1	CCND1	0.934
BAX	EP300	0.933
CCND3	CCNB1	0.933
CCND3	EP300	0.932
STIP1	CDC37	0.931
CDK2	MLH1	0.931
RRM2	CCNA1	0.931
BRCA1	CCND1	0.930
CDK2	RRM2B	0.930
CDK6	CCNA1	0.929
CCNE1	CCND1	0.928
ERCC4	PMS2	0.928
CCND3	CCNA1	0.928
MNAT1	CDK4	0.928
SOS1	GAB2	0.927
POLD1	XPA	0.927

HSP90AA1	RB1	0.927
ABL1	CCNA2	0.926
CCND3	CCNE1	0.925
ABL1	CDK4	0.924
ERCC2	MSH2	0.924
CREB1	SOS1	0.924
MDM2	PCNA	0.924
ABL1	CDK2	0.923
CCND3	GRB2	0.923
MNAT1	CCNB1	0.923
GAB2	EGFR	0.922
SUGT1	CDC37	0.921
ERCC4	MNAT1	0.921
MDM2	CCNA2	0.921
SHC1	CCND3	0.920
TP53	MNAT1	0.919
ATM	CCND1	0.919
CDK2	KAT2B	0.918
ATM	RRM2B	0.918
CDK2	CDK4	0.917
ABL1	CCNE1	0.916
ABL1	CASP9	0.914
ERBB2	CDKN1A	0.914
CASP3	TP53	0.914
ERCC4	FEN1	0.914
MDM2	RFC4	0.912
EGFR	ERCC1	0.912
BRCA1	CCNB1	0.912
CHEK2	CCNB1	0.910
SOS1	CDC37	0.907
CCND3	GAB2	0.907
TOP2B	PCNA	0.906
MNAT1	CCND1	0.905
CCND3	CCND1	0.904
BRCA1	ABL1	0.903
MNAT1	CDKN1A	0.903
SOS1	CCND3	0.901
SHC1	CDC37	0.901
CCNE1	MNAT1	0.900
CHEK2	PCNA	0.900
SHC1	TP53	0.900
MNAT1	CDKN1B	0.900
MDM2	RFC5	0.900
MDM2	RFC3	0.900
PTGES3	CDKN1B	0.900

APÊNDICES B - Justificativa para utilização de material biológico proveniente de biobanco do Institucional de Materiais biológicos humano/Universidade Estadual de Montes Claros - MG (Registro CONEP: B-013)

Eu, André Luiz Sena Guimarães, coordenador do projeto de pesquisa “Investigação de marcadores de hipóxia em neoplasias benignas e malignas de glândulas salivares e o papel do HIF-1 α no Carcinoma de células escamosas de boca sob radiação”, vinculado à Universidade Estadual de Montes Claros - UNIMONTES, venho, através deste documento, justificar a necessidade de requisitar ao Biobanco Institucional desta universidade, amostras biológicas e dados clínicos de indivíduos acometidos por lesões de neoplasia de glândula salivar e carcinoma de células escamosas de boca, além de amostras não neoplásicas originárias de mucocelos de glândulas salivar menor, sendo estes indivíduos assistidos nas redes públicas e privadas da cidade de Montes Claros-MG. Convém ressaltar que esta requisição é somente para aqueles indivíduos portadores de tal condição patológica que optaram no TCLE do referido biobanco institucional por “NÃO ser consultado da utilização dos meus dados ou material biológico em outra pesquisa, desde que a nova pesquisa seja aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa”.

O biobanco institucional da UNIMONTES encontra-se formalmente regulamentado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (registro CONEP: B-013), obedecendo normas e diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de Saúde.

A coleta de dados clínicos e materiais biológicos, realizada por este biobanco obedecem, criteriosamente, os preceitos éticos e normas de acondicionamento das amostras, além de já possuir, em seu arquivo, um número considerável de amostras dos grupos considerados nesse projeto. Assim, a utilização de tais amostras já acondicionadas no biobanco em questão irá favorecer o desenvolvimento do projeto de pesquisa por mim coordenado, especialmente pelo rigor utilizado para a coleta do material e número de amostras coletadas disponíveis.

Prof^a. Dr. André Luiz Sena Guimarães

Docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde/UNIMONTES

ANEXOS

ANEXO A- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido utilizado para coleta de materiais biológicos pelo Biobanco de Materiais Biológicos do Norte de Minas Gerais



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Código: _____

Esclarecimentos

Este é um convite para a doação de material biológico excedente, proveniente de sua cirurgia ou procedimento hospitalar que será realizado devido à necessidade já definida pelo médico para o diagnóstico de alguma doença ou tratamento.

A partir da sua autorização, o material será doado e arquivado no banco de materiais biológicos da Universidade Estadual de Montes Claros, destinado à realização de pesquisas científicas, sem fins lucrativos. Garantimos o sigilo dos seus dados. As pesquisas realizadas utilizando o material doado têm como objetivo o melhor entendimento das causas e mecanismos das doenças que nos acomete. Podem, ainda, ajudar na busca de novas formas de tratamento das doenças.

A coleta dos materiais biológicos doados obedece a documentos legais do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares. O biobanco onde será arquivado o seu material doado está sob a responsabilidade da UNIMONTES e encontra-se localizado no Hospital Universitário Clemente de Faria.

Sua participação é voluntária, o que significa que você poderá desistir a qualquer momento, retirando seu consentimento, sem que isso lhe traga nenhum prejuízo ou penalidade.

Caso decida aceitar doar o excedente de material biológico proveniente do procedimento médico, gostaríamos de esclarecer você mais alguns pontos importantes:

- O material coletado será o excedente do procedimento cirúrgico realizado pela equipe médica

- Os riscos quanto à doação do material estão relacionados ao tipo de procedimento realizado pela equipe médica, necessário para diagnóstico e tratamento que deverão ser claramente esclarecidos para você pela equipe. Sendo que a coleta de material para o Biobanco envolve apenas o excedente material biológico proveniente desse procedimento médico.
- Através da doação, você estará contribuindo cedendo o material biológico necessário para a realização de pesquisas para melhor entender as causas e mecanismos das doenças.
- Quanto aos benefícios, a doação do material poderá favorecer a realização de pesquisas que buscam um melhor entendimento e possibilidade de controle e tratamento das doenças.
- Você terá direito ao acesso, a qualquer momento, aos resultados obtidos a partir do seu material biológico armazenado e às orientações quanto às suas implicações, incluindo o aconselhamento genético, quando aplicável. Para isso, você deverá entrar em contato com a equipe do biobanco através do endereço ou telefone de contato abaixo, informando o código de cadastro que você recebeu no ato da doação e, também, está escrito no seu cartão de cadastro, que ficou guardado com você:

Biobanco de Materiais Biológicos do norte de Minas Gerais

Laboratório de Pesquisa em Saúde - Hospital Universitário Clemente Faria - UNIMONTES

Av. Cula Mangabeira, 562 - Bairro Santo Expedito, Montes Claros, MG - CEP: 39401-001

Telefone: (38) 3224-8327

- Todas as informações obtidas serão sigilosas e seu nome não será identificado em nenhum momento. Os dados serão guardados em local seguro e a divulgação dos resultados será feita de forma a não identificar os voluntários.
- Se você tiver algum gasto que seja devido à sua participação na pesquisa, você será ressarcido.

Em qualquer momento, se você sofrer algum dano comprovadamente decorrente desta pesquisa, você terá direito a indenização. Você ficará com uma cópia deste Termo e toda a dúvida que você tiver a respeito desta pesquisa, poderá perguntar diretamente a um dos membros do biobanco através do endereço ou telefone apresentado acima. Se houver dúvidas sobre a ética da pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UNIMONTES através do contato abaixo:

Comitê de Ética em Pesquisa

Campus Universitário Professor Darcy Ribeiro

Vila Mauricéia - Montes Claros – MG, Caixa Postal 126 - CEP 39401-089

Fone: (38) 3229-8000

Consentimento Livre e Esclarecido

Estou de acordo com a participação e doação de material biológico excedente, proveniente de minha cirurgia ou procedimento hospitalar que será realizado devido à necessidade já definida pelo médico para o diagnóstico de alguma doença ou tratamento.

Fui devidamente esclarecido quanto aos objetivos do biobanco, aos procedimentos aos quais serei submetido e dos possíveis riscos que possam advir de tal participação. Foram a mim garantidos esclarecimentos que venha a solicitar durante o curso da pesquisa e o direito de desistir da participação em qualquer momento, sem que minha desistência implique em qualquer prejuízo a minha pessoa ou de minha família. A minha participação na pesquisa não implicará em custos ou prejuízos adicionais, sejam esses custos ou prejuízos de caráter econômico, social, psicológico ou moral. Autorizo assim a publicação dos dados da pesquisa a qual me garante o anonimato e o sigilo dos dados referentes à minha identificação.

Reutilização dos dados ou material biológico:

O material biológico doado ficará armazenado no Banco de Materiais Biológicos Humano do Norte de Minas Gerais, localizado nas dependências do Hospital Universitário Clemente de Faria na cidade de Montes Claros/MG. Em relação à utilização deste material para a realização de pesquisas científicas:

() SIM, autorizo a utilização de dados ou material biológico _____(especificar o material) em todas as pesquisas vinculadas ao Biobanco da UNIMONTES.

() NÃO autorizo a utilização de dados ou material biológico _____(especificar o material) em mais de uma pesquisa. Então este material será descartado. (especificar a forma de descarte):

Para utilização dos meus dados e material coletado _____(especificar o material) em mais de uma pesquisa:

() NÃO preciso ser consultado da utilização dos meus dados ou material biológico em outra pesquisa, desde que a nova pesquisa seja aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa,

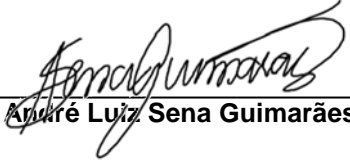
() SIM, quero ser consultado da utilização dos meus dados ou material biológico em outra pesquisa.

Em caso de óbito ou alguma outra condição em que eu não possa dar o consentimento para utilização dos meus dados em outro estudo, autorizo _____(especificar nome da pessoa) a consentirem a utilização ou descarte de meu material biológico armazenado.

Doador de material biológico ao Biobanco ou responsável legal:

Assinatura do doador ou responsável

Coordenador Geral do Biobanco:


Dr. André Luiz Sena Guimarães

Laboratório de Pesquisa em Saúde - Hospital Universitário Clemente Faria - UNIMONTES

Av. Cula Mangabeira , 562 - Bairro Santo Expedito, Montes Claros, MG - CEP: 39401-001

Telefone: (38) 3224-8327

Responsável técnico pela coleta e transporte do material coletado ao biobanco:

Data: _____



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS
BIOBANCO INSTITUCIONAL DE MATERIAIS
BIOLÓGICO HUMANO



O doador de material biológico humano e informações clínicas, através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, consentiu a doação legal de material biológico humano para a realização de pesquisas científicas, sem fins lucrativos, vinculadas ao Biobanco de Materiais Biológicos Humano da Universidade Estadual de Montes Claros.

Você tem direito a todas as informações de resultados de pesquisas realizadas com seu material doado. Caso tenha interesse em tais resultados, comunique no seguinte endereço ou telefone de contato, informando o seu código de doador apresentado abaixo:

Código do doador: _____

Data: _____

ANEXO B- Parecer CONEP - Biobanco Institucional de Materiais biológicos humano/Universidade Estadual de Montes Claros - MG



**CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE
COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA**

PARECER CONEP – BIOBANCO nº. 008/2013

Registro CONEP B-013 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este biobanco)

Processo nº 25000.001815/2013-60

Instituição responsável: Universidade Estadual de Montes Claros

Instituição participante: Universidade Estadual de Montes Claros.

Responsável(is) institucional: Dr. Andre Luz Sena Guimarães.

CEP de origem: Comitê de Ética da Universidade Estadual de Montes Claros.

Sumário geral do protocolo

Tipo de material biológico: amostras de material biológico criopreservadas e/ou emblocadas em parafina, amostras de RNA, DNA, proteína e cultivo celular de materiais biológicos humano, coletados de diferentes sítios anatómicos.

Documentos encaminhados para análise:

- 1- Protocolo de Desenvolvimento.
- 2- Regimento interno do Biobanco.
- 3- Declaração de gerenciamento institucional.
- 4- TCLE.

Apresentação do protocolo

Trata-se de solicitação de registro de Biobanco ligado à Universidade Estadual de Montes Claros. Destina-se à coleta, armazenamento e distribuição para pesquisa de amostras biológicas humanas obtidas de pacientes/sujeitos de pesquisa da região norte do Estado de Minas Gerais, para o estudo de neoplasias ou outras condições patológicas.

Protocolo de Desenvolvimento:

está estruturado da seguinte forma:

1 INTRODUÇÃO; 2 JUSTIFICATIVA; 3 OBJETIVOS; 4 PRINCÍPIOS DE ESTRUTURAÇÃO, FUNCIONAMENTO E MANUTENÇÃO E DO BIOBANCO; 5 REGIMENTO INTERNO DO BIOBANCO; 6 DECLARAÇÃO DE GERENCIAMENTO E RESPONSABILIDADE INSTITUCIONAL DO BIOBANCO; REFERÊNCIAS; APÊNDICES.

Em síntese, são abordados de forma detalhada a justificativa e objetivos do biobanco, os cenários previstos para entrada das amostras biológicas humanas, assim como as políticas e procedimentos operacionais padrão para coleta, armazenamento, processamento e distribuição das mesmas, assim como de informações associadas. É descrita a infra-estrutura e de pessoal atualmente disponível, assim como o financiamento da mesma, a cargo da Universidade Estadual de Montes Claros. Os Procedimentos Operacionais Padrão (POPs) enviados para análise estão de acordo com documentos de

Cont. Parecer CONEP nº.

melhores práticas internacionais que abordam a coleta, processamento, armazenamento e distribuição de material biológico humano com finalidade de pesquisa.

Um "Termo de concordância da instituição para o acesso à coleta de material biológico e informações associadas" prevê os critérios e condições pelos quais material biológico humano poderá ser coletado de sujeitos de pesquisa de instituições de saúde parceiras do Biobanco, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido utilizado como modelo.

Um "TERMO DE TRANSFERÊNCIA DE MATERIAL BIOLÓGICO REFERENTE À REMESSA DE AMOSTRA DE COMPONENTE DO PATRIMÔNIO GENÉTICO PARA FINS DE PESQUISA CIENTÍFICA SEM POTENCIAL ECONÔMICO", modelo do Anexo da RESOLUÇÃO CGEN Nº 20, DE 29 DE JUNHO DE 2006, detalha os critérios pelos quais o material armazenado pelo Biobanco será transferido a terceiros para utilização em pesquisa, notadamente a outras Instituições

Com relação à garantia dos direitos dos sujeitos de pesquisa, os documentos apresentados foram adequados às normativas vigentes. Ao sujeito de pesquisa será fornecida, além de uma via do TCLE, um cartão de participação com formas de contato com o Biobanco. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, além de informar as formas de contato com o Biobanco e o Comitê de Ética em Pesquisa Institucional, garante:

- a) A autonomia do sujeito de pesquisa quanto à necessidade de novo consentimento a cada nova pesquisa que venha a fazer uso de suas amostras biológicas, assim como da dispensa de tal necessidade.
- b) A autonomia do sujeito de pesquisa quanto à nomeação de terceiros para decisão quanto à utilização ou descarte do seu material biológico armazenado, em caso de óbito ou condição incapacitante.
- c) O acesso, a qualquer momento, aos resultados obtidos a partir do seu material biológico armazenado e às orientações quanto às suas implicações, incluindo o aconselhamento genético, quando aplicável
- d) O direito de desistir da participação em qualquer momento, sem qualquer prejuízo.
- e) A garantia ao anonimato.

Comentários/Considerações

1. Este parecer tem como base o disposto na Resolução CNS 441/11 e na Portaria MS 2201/11. Pelo que se depreende do exposto na documentação apresentada, trata-se do estabelecimento de um Biobanco institucional, dedicado à coleta, armazenamento e distribuição de amostras biológicas humanas com finalidade de pesquisa, com um responsável pelo gerenciamento apontado pela Instituição, assim como um comitê gestor, cujas funções adequadamente descritas.

2. No exame da documentação anexada ao Protocolo, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, utiliza-se inúmeras vezes as palavras "doador", "doação" e correlatas. Deve-se substituir tais termos (por exemplo, pelo termo "cessão"), retirando-os da documentação apresentada em concordância com a legislação nacional relativa a Biobanco e adicionando o termo "concessão" para substituir "cessão" e o verbo

Cont. Parecer CONEP nº.

"consentir" para substituir "cedir" (Res. CNS 441 de 2011 e Portaria MS 2201 de 2011). De acordo com as mesmas, as amostras biológicas armazenadas em biobanco são do sujeito de pesquisa (ou cedente), cabendo à Instituição a sua guarda. Solicita-se adequação.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto, devendo o CEP verificar o cumprimento das questões acima e encaminhar à CONEP as recomendações cumpridas antes do início do estudo.

Situação: Protocolo aprovado com recomendação.

Brasília, 25 de Abril de 2013


Gyselle Saddi Tannous
Coordenadora da CONEP/CNS/MS

ANEXO C- Declaração de aceite do Biobanco de Materiais Biológicos do Norte de Minas Gerais para a concessão das amostras e dados clínicos para a execução do projeto

Eu, Alfredo Maurício Batista De Paula, Coordenador do Banco de Materiais Humano do Norte do Estado de Minas Gerais (Registro CONEP: B-013: Parecer nº 008/2013), declaro, em nome do Comitê Gestor do biobanco institucional/UNIMONTES, a aceitação da cessão de materiais biológicos e dados clínicos para o projeto de pesquisa " Investigação de marcadores de hipóxia em neoplasias benignas e malignas de glândulas salivares e o papel do HIF-1 α no Carcinoma de células escamosas de boca sob radiação" coordenado pelo professor Dr. André Luiz Sena Guimarães.

A solicitação inclui amostras teciduais e dados clínicos de indivíduos, independente da faixa etária, com diagnóstico histopatológico confirmado de neoplasia de glândula salivar e carcinoma de células escamosas de boca, além de amostras não neoplásicas originárias de mucocelos de glândulas salivar menor. Conforme solicitado pelo pesquisador, as amostras biológicas cedidas, deverão ser, somente, daqueles indivíduos que optaram, no TCLE do biobanco institucional, por "NÃO ser consultado da utilização dos meus dados ou material biológico em outra pesquisa, desde que a nova pesquisa seja aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa".

Declaro ainda que a cessão de tais amostras está vinculada a entrega formal da aprovação do projeto do Comitê de Ética em Pesquisa.

Nessa ocasião, o coordenador do projeto deverá efetuar o aceite legal de cumprimento das normas do Regimento interno do Biobanco, através da assinatura de um " Termo de Compromisso para o Uso de Material Biológico e Informações Associadas". Nesse documento, o mesmo responsabilizar-se-á pelo uso e preservação dos materiais biológicos e informações associadas, resguardando os direitos dos sujeitos, especialmente, no que se refere à confidencialidade, ao sigilo, ao acesso a resultados das pesquisas e à proteção intelectual contra utilização comercial e qualquer forma de patenteamento com todo e qualquer material proveniente do biobanco.

Montes Claros, 1º de Setembro de 2015

Alfredo Maurício Batista De Paula

Coordenador do Banco de Materiais Biológicos Humano do Norte de Minas Gerais