

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 18/08/2019.

Flávia Alves Verza

*Social isolation stress increases the incidence and growth
of chemically induced oral cancer in rats*



Araçatuba- SP

2017

Flávia Alves Verza

*Social isolation stress increases the incidence and growth of
chemically induced oral cancer in rats*

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Mestre em Odontologia - Área de Concentração em Estomatologia.

Orientador: Professor Assistente Doutor Daniel Galera Bernabé.

Co-orientadora: Professora Adjunta Sandra Helena Penha de Oliveira.

Araçatuba- SP

2017

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

V574s Verza, Flávia Alves.
Social isolation stress increases the incidence and growth
of chemically induced oral cancer in rats / Flávia Alves
Verza. – Araçatuba, 2017
76 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual
Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Daniel Galera Bernabé
Coorientadora: Profa. Sandra Helena Penha de Oliveira

1. Neoplasias 2. Neoplasias de cabeça e pescoço 3. Neoplasias bucais 4. Estresse psicológico 5. Isolamento social 6. Carcinogênese 7. Depressão I. Título

Black D6
CDD 617.63

Dados Curriculares

Dados Pessoais

Flávia Alves Verza

Nascimento.....: 11 de Agosto de 1992

Araçatuba/SP

Filiação.....: Flávio Roberto Verza

Aparecida Alves Verza

Dados Curriculares

2011-2014 Curso de Graduação em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário católico Salesiano *Auxilium* de Araçatuba.

2015-2017 Curso de Pós-Graduação em Odontologia, na Área de Estomatologia, nível de Mestrado, pela Faculdade de Odontologia de Araçatuba Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FOA - UNESP).

Dedicatória

Dedicatória

À minha família

Espero merecer todo o amor que tem por mim.

“Quando as raízes são profundas, não há razão para temer o vento.”

Provérbio Chinês

Agradecimientos

Agradecimentos

A **Deus** por estar presente em minha vida a todo o momento, mesmo eu não merecendo tanto. Ao Seu amor e misericórdia, minha gratidão sem medidas. Por me colocar onde preciso estar mesmo não me encaixando ali a princípio, e sempre me acompanhar ao longo do caminho, me permitindo chegar onde estou. Agradeço todos os dias por iluminar meu caminho e guiar meus passos, por me abençoar com pessoas tão maravilhas em meu caminho e pela oportunidade de aprender tanto e me tornar uma pessoa melhor a cada dia.

A **Nossa Senhora Aparecida** por seu colo de mãe que sempre me acolhe. Por interceder por mim em todos os momentos de dificuldade em que me julguei incapaz de seguir adiante. Agradeço por não me deixar cair quando tropeço, por proteger as pessoas que fazem parte da minha vida, por me entender e me ajudar mesmo diante das minhas falhas. Minha eterna devoção.

Ao meu amado pai **Flávio Roberto Verza** que me incentiva e apoia em tudo, mesmo sem entender os caminhos que escolho. Meu maior exemplo na vida. Obrigada por ser meu amigo e companheiro em todos os momentos.

Minha querida mãe **Aparecida Alves Verza** que me educou da melhor forma possível, nenhuma outra mãe me faria ser o que sou hoje, sou grata para sempre. Muito obrigada pela educação preciosa, dedicação e apoio.

Meu irmão **Vinicius Alves Verza** por ser tão amigo e tão irmão. Obrigada por toda a atenção, apoio e alegria constante. Não poderia escolher irmão melhor.

A meus avós paternos **Zelino Verza** e **Adire Del'Ângelo Verza** (*in memorium*), por continuarem sendo exemplos para mim de caráter e honestidade.

Aos meus avós maternos **Justo Alves de Oliveira** (*in memorium*), a maior saudade de que me recordo e **Lourdes Alves de Oliveira** por seu exemplo de mulher, de mãe, de avó, de pessoa. Obrigada por cuidar tão bem de nós.

Vocês são meus primeiros professores, meu alicerce e maior orgulho.

Aos meus tios **Ademir Oliveira** e **Silvia Nubiato**, por me acolherem em sua casa de braços abertos sempre que preciso.

Ao meu namorado **Bruno Luiz Bailão dos Santos**, obrigada por ser tão amigo, por sempre estar ao meu lado nas horas de sorrisos e de lágrimas, nas horas em que me lamentei e nas horas de total alegria. Por compartilhar tantas coisas boas comigo, e por me permitir fazer parte da sua vida. Agradeço por sempre me acolher, me ouvir, tentar compreender e principalmente pelo incentivo e apoio incondicional.

Aos seus pais **Mara Rosana Bailão** e **José Luiz dos Santos**, por me receberem sempre que preciso, por todo o carinho e atenção dedicados a mim. Vocês são minha segunda casa.

Aos meus amigos de Vicentinópolis, **Nan, Fonso, Kito, Dani, Nega e Vane**, por todos os conselhos carregados de preocupação e cuidado. Vocês são parte das histórias que tenho para contar.

Agradeço a minha banca de julgamento de dissertação de mestrado, composta pelo **Dr. André Caroli Rocha** e pela **Prof.^a Adj. Ana Maria Pires Soubhia**. Por todos os questionamentos, opiniões, dicas e ensinamentos valiosos, direcionados ao meu trabalho a fim de melhorá-lo.

Agradeço ao **Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium – Araçatuba** universidade da minha graduação, por despertar em mim a vontade de ir mais longe.

Aos amigos que fiz lá, principalmente ao **Carlos Eduardo, Cássia, John Lennon, Natália Sato, Simone e Rose**. Por todos os momentos bons, de alegrias e aprendizado que a graduação nos concede. Obrigada por passarmos junto às preocupações das provas e por dividirem seu tempo e amizade comigo.

Agradeço **aos meus professores do Unisalesiano** pelo amor e dedicação que empregam no que fazem, preocupando-se em formar cidadãos de valor não somente pessoas com diploma.

Agradeço ao **Prof. Adj. Casimiro Cabrera Peralta** por despertar em mim a vontade de ajudar as pessoas e o mundo, conselho essencial para que eu me dedicasse à pesquisa.

A minha orientadora de Iniciação Científica do Unisalesiano, **Prof^ª. Dr^ª. Rossana Abud Cabreira Rosa** por seu amor em ensinar e aprender, e por todo o incentivo para que eu seguisse na pós-graduação.

A minha co-orientadora de Mestrado, **Prof^ª Adj. Sandra Helena Penha de Oliveira** que me recebeu em seu laboratório. A pessoa em quem me espelho. Exemplo de empenho, competência e dedicação. Muito obrigada pela oportunidade de aprender tanto, conhecer tantas pessoas e colecionar tantos momentos especiais. Obrigada por abrir as portas do seu laboratório para a realização deste trabalho e da sua sala para todos que a procuram. Guardarei para sempre os momentos vividos em seu laboratório.

Ao **Departamento de Ciências Básicas**, principalmente ao laboratório de **Farmacologia**, por se tornar minha casa. A todos os professores, funcionários e colegas de lá. Obrigada pela convivência.

Aos amigos do laboratório, que fizeram minha estadia na Farmacologia inesquecível e saudosa, **Murilo, Simone, Jéssica Troiano, Thamine, Carluci, Victor, Dayane, Letícia, Aline e Kellen**. Por todas as (muitas) horas juntos, na faculdade, no almoço, nos passeios. Obrigada por todo o auxílio e atenção dedicados a mim, por toda a preocupação. Por todas as risadas altas, que tornaram a rotina no laboratório mais divertida. Amigos que conheci quando ainda cursava a graduação, e que vou levar pra vida toda.

Ao **Prof. Ass. Dr. Antônio Hernandes Chaves Neto** que com competência, caráter e integridade, influenciou minha formação. Obrigada pelo carinho, preocupação, apoio e incentivo.

Ao **Prof. Tit. Glauco Issamu Miyahara** por acreditar na minha capacidade e enxergar além do que eu via. Obrigada por todo o auxílio, carinho, atenção, aprendizado e confiança empregados a mim. O senhor é um exemplo que quero seguir.

Ao **Prof. Adj. Éder Ricardo Biasoli** pelo convívio e pela disponibilidade sempre que possível.

Ao meu orientador, **Prof. Ass. Dr. Daniel Galera Bernabé** por me ensinar tanto, por me mostrar o que existe além da zona de conforto e me impulsionar além. Obrigada por me fazer compreender que um erro ensina mais que um acerto, por acreditar em mim quando nem mesmo eu acreditava. Que apesar das noites mal dormidas, do estresse exacerbado, dos prazos chegando ao fim, dos experimentos fora de hora, sempre estive comigo, e sempre foi paciente. Obrigada por acreditar com tanta paixão na pesquisa científica e ensinar isso aos seus alunos. Um exemplo de comprometimento profissional com a pesquisa e com os pacientes principalmente. Serei eternamente grata pela amizade, confiança, constante incentivo e apoio incondicional.

Ao **Centro de Oncologia Bucal (COB)** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP e a **todos os funcionários** tão competentes, sempre dispostos a

ajudar no que for preciso. Vocês são exemplos de carinho e bom atendimento aos pacientes. Obrigada pelo convívio e aprendizado.

Aos **professores** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP e a **minha turma de mestrado**. Obrigada por todo o aprendizado e pelas experiências compartilhadas.

Aos meus amigos da pós-graduação **Vitor Bonetti** (irmãozão que ganhei no mestrado), um dos meus maiores incentivadores que tanto me ajudou em todos os sentidos e em todos os momentos em que precisei, principalmente na fase final deste trabalho. Não teria conseguido sem sua ajuda. **Ingrid Santos** (irmãzinha manauara) a pessoa mais fofo do planeta, um exemplo de perseverança que quero seguir. **Bruna Serafim** que encarou o desafio de um mestrado em Odontologia mesmo sendo psicóloga, com tanta dedicação. **Lúgia Lavezzo** a pessoa mais falante e entusiasmada que existe! Sempre pronta a ouvir e incentivar. **Daniela Bastos** que saiu de Fortaleza sem saber o que a esperava pra dividir o mesmo objetivo. **Jéssica Figueira** um dos meus presentes no meu segundo ano de mestrado. **Saygo Tomo** uma das pessoas mais determinadas e decididas que já conheci, que sempre nos alegrava em meio ao estresse. **Giseli Kayahara** tão competente no que faz e que tanto me ajudou. Vocês são minha família. Obrigada por cada momento, pelo aprendizado, pelos sorrisos, lágrimas, abraços, incentivo. Obrigada por serem tão especiais, por toda a ajuda e preocupação. Por compreenderem o estresse e a responsabilidade que a pós-graduação nos impõe, e por sempre acreditarem que o dia da defesa vai fazer todo o esforço valer a pena.

Obrigada por virem de tão longe, passar por tantas dificuldades e dividir o mesmo sonho, pela troca de experiências e oportunidade de conhecer pessoas tão especiais. Desejo do fundo do meu coração, que consigam realizar seus sonhos, que não desistam quando o caminho ficar mais estreito, que sempre sigam em frente de cabeça erguida e encontrem ao longo da jornada pessoas tão especiais como eu encontrei vocês. Peço que Deus continue presente na caminhada de cada um e que nossos caminhos voltem a se cruzar.

Aos amigos da graduação, **Amanda, Camila, Isadora, Felipe, Lia, Heitor e Karla**, pela enorme ajuda nos experimentos por vezes exaustivos, pela convivência, amizade e oportunidade de me fazer uma pessoa melhor. Desejo todo o sucesso no caminho que cada um escolher. Aprendi muito com cada um de vocês e cresci demais com todas as experiências compartilhadas. Sem vocês nada disso seria possível.

Aos patologistas deste estudo, **Prof. Adj. Dr. Marcelo Macedo Crivelini e Prof^a. Adj. Dr^a. Cristiane Furuse**, pelo acesso ao laboratório de Patologia, aos materiais e equipamentos. Obrigada pela atenção e cuidado com este trabalho. Vocês são exemplos de competência.

Aos **funcionários do Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, **Dona Cidinha, Adriana, Marcelinho e Giseli**, agradeço por toda a colaboração na execução deste trabalho, pela amizade e atenção comigo. Vocês são exemplos de amor e competência pelo que fazem.

Ao Departamento de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, na pessoa do seu chefe **Prof. Ass. Dr. Luciano Tavares Ângelo Cintra** por disponibilizar o uso do microscópio para as análises histopatológicas deste estudo.

A **Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP**, na pessoa de seu diretor **Prof. Tit. Wilson Roberto Poi** pela oportunidade de aprendizado e crescimento pessoal e profissional.

Aos **funcionários do biotério central** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, **Sr. Camilo, Sr. João Batista e Alan**. Pela atenção e ajuda.

Aos **animais** que foram sacrificados para que este trabalho pudesse ser realizado.

Aos excelentes funcionários da seção de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, **Valéria, Cristiane e Lillian**, obrigada pelo suporte e auxílio.

Aos **funcionários da Biblioteca** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, obrigada por toda a atenção, eficiência e apoio sempre que precisei.

Aos **meus amigos e familiares** e a todos que contribuíram direta ou indiretamente para que esta conquista se tornasse possível, pelo apoio, carinho, preocupação e compreensão. **Gratidão.**

Επίγραφε

Epígrafe

Eu acredito em mim mesma. Nos meus ideais e sonhos.

Acredito nos que trabalham comigo.

Acredito nos meus amigos e acredito na minha família.

Creio que Deus me emprestará tudo que preciso para triunfar, contanto que eu me esforce para alcançar e ajude os que precisam quando eu puder.

Acredito em orações e nunca fecharei meus olhos para dormir, sem pedir antes paciência, tolerância e compreensão com os que não acreditam no que eu acredito.

Acredito que o triunfo é resultado de esforço e trabalho duro.

Acredito que tirarei da vida exatamente o que nela colocar.

Serei paciente quando tratar os outros, como quero que sejam comigo.

Prestarei o melhor serviço de que sou capaz, em qualquer lugar, porque quero triunfar na vida, e sei que o triunfo é sempre resultado de esforço e dedicação.

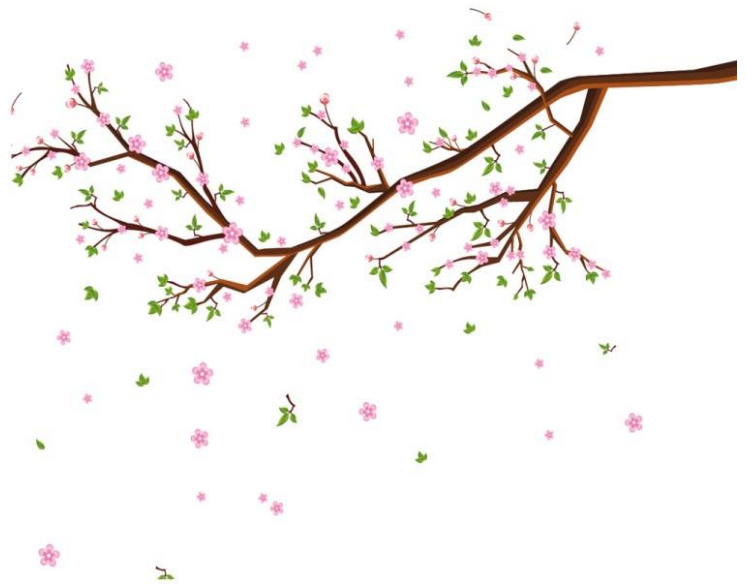
Perdoarei os que me ofendem, porque compreendo que às vezes ofendo os outros e necessito de perdão.

Serei dedicada sempre em qualquer situação.

Farei o meu melhor a cada dia.

Somos o resultado das nossas crenças e sonhos.

Epígrafe



É exatamente disso que a vida é feita, de momentos.

Momentos que temos que passar, sendo bons ou ruins, para o nosso próprio aprendizado.

Nunca esquecendo do mais importante: **Nada nessa vida é por acaso.**

Absolutamente nada.

Por isso, temos que nos preocupar em fazer a nossa parte, da melhor forma possível.

A vida nem sempre segue a nossa vontade, mas ela é perfeita naquilo que tem que ser.

Chico Xavier

Resumo

Verza FA. Estresse por isolamento social aumenta a ocorrência e a progressão do câncer de boca induzido quimicamente em ratos. [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2017.

Resumo

Estudos têm mostrado que o estresse crônico pode influenciar a progressão do câncer, porém sua influência sobre o início da doença é pouco compreendida. Dentre os eventos estressores, o estresse por isolamento social (EIS) afeta grande número de indivíduos, podendo induzir alterações neuro-hormonais e desordens emocionais. Embora estudos mostrem que o EIS pode aumentar a progressão de alguns tipos de neoplasias malignas, sua influência sobre o início e progressão do câncer de cabeça e pescoço é desconhecida. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do EIS sobre a incidência e progressão do carcinoma espinocelular (CEC) de boca induzido por 4-nitroquinolina 1-óxido (4NQO), bem como seus efeitos sobre o comportamento depressivo e a expressão de genes envolvidos na progressão do tumor. Sessenta ratos Wistar machos foram divididos em dois grupos de 30 animais: grupo isolado (ratos isolados socialmente desde os 21 dias de idade) e grupo controle (ratos mantidos em grupo). Ao atingirem 90 dias de idade, os animais de ambos os grupos foram submetidos à avaliação do comportamento depressivo pelos testes de suspensão pela cauda (TSC) e natação forçada (TNF). Logo em seguida, os animais foram submetidos à indução carcinogênica por meio da ingestão de 4NQO diluído na água de beber. Após 20 semanas, os animais foram avaliados quanto ao comportamento depressivo e posteriormente eutanasiados para análise histopatológica das lesões induzidas em língua. PCR em tempo real foi realizada para avaliar a expressão de RNAm para os genes TNF- α , IL-6, VEGF, MMP-2 e MMP-9 nos tumores de ambos os grupos. Os resultados mostraram que EIS aumentou a ocorrência de CEC de boca em 20.4% em relação ao grupo de ratos não estressados ($p=0.002$). Os tumores dos animais isolados apresentaram volume tumoral cerca de duas vezes maior ($p=0.0366$) em relação aos tumores dos animais do grupo controle. Os ratos estressados perderam mais peso corporal ($p=0.006$) e apresentaram menor peso do baço ($p=0.0121$) em relação aos ratos não estressados. EIS induziu aumento da expressão de RNAm para os genes TNF- α , IL-6, VEGF, MMP-2 e MMP-9, porém os resultados não atingiram significância estatística ($p>0.05$). O EIS induzido precocemente não induziu alterações significativas no comportamento depressivo mensurado pelo TSC e TNF antes e após a indução carcinogênica ($p>0.05$). Este estudo fornece as primeiras evidências de que o estresse crônico por isolamento social pode influenciar a incidência e progressão do CEC de boca induzido quimicamente em animais.

Palavras-Chave: Neoplasias; Neoplasias de cabeça e pescoço; Neoplasias bucais; Estresse psicológico; Isolamento social; Carcinogênese; Depressão.

Abstract

Verza FA. Social isolation stress increases onset and growth of chemically induced oral cancer in rats. [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2017.

Abstract

Clinical and preclinical studies have shown that chronic stress may influence cancer progression, but its influence on the onset of the disease is poorly understood. Among the stressful events, social isolation stress (SIS) affects a large number of individuals, and may induce neurohormonal dysregulation and emotional disorders. Although investigations show that SIS may increase the progression of some types of malignancies, its influence on the onset and progression of head and neck cancer is unknown. In this study, we have evaluated the SIS effects on the occurrence and progression of induced oral squamous cell carcinoma (OSCC), as well as its effects on depression-like behavior and expression of genes involved in tumor progression. Sixty male Wistar rats were divided into two groups of 30 animals: isolated group (rats submitted to SIS) and grouped (rats non-stressed). In the SIS group, the animals remained individually isolated after completing 21 days of life, while in the control group the rats were kept in group. At 90 days of age, both groups were tested for depression-like behavior by the tail suspension (TST) and forced swimming (FST) tests. Afterwards, the animals were submitted to oral carcinogenesis induction with 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) carcinogen diluted in drinking water. After 20 weeks, the animals were again tested for depressive behavior and euthanized for histopathological analysis in the tongue specimens. Real-time PCR was performed to evaluate mRNA expression for TNF-alpha, IL-6, VEGF, MMP-2 and MMP-9 genes in tumors from the both groups. The results showed that SIS increased OSCC occurrence by 20.4% in relation to control group ($p=0.002$). Isolated rats displayed tumor volume two-fold higher than grouped rats ($p=0.0366$). Stressed rats lost more body weight ($p=0.006$) and showed lower spleen weight ($p = 0.0121$) compared to non-stressed rats. SIS induced increase of mRNA expression for TNF-alpha, IL-6, VEGF, MMP-2 and MMP-9 genes, but these results did not reach statistical significance ($p>0.05$). SIS did not induce significant changes in depression-like behavior measured by TST and FST before and post-carcinogenesis induction ($p>0.05$). This study provides the first evidence that chronic stress by social isolation may influence the chemically induced OSCC occurrence and progression in animals.

Keywords: Neoplasms; Head and neck neoplasms; Oral neoplasms; Psychological stress; Social isolation; Carcinogenesis; Depression.

Lista de Figuras

Lista de Figuras

Page 50

Fig. 1. Clinical features of chemically induced OSCC (grouped rats, A and B vs isolated rats, C and D). (A) White plate with erosive areas. (B) Extensive white plate with a small ulcer. (C) Heterogeneous white plate. (D) Large ulcerated lesion. **Histopathological features (H&E staining, original magnification x100).** Histopathological examination revealed OSCCs with well-differentiated cells arranged in islands of varying size, keratin pearls and chronic inflammatory infiltrate in the tumor stroma.

Page 51

Fig. 2. Incidence of OSCC and oral leukoplakia. Chi-square analysis showed that socially isolated animals had a higher incidence of OSCC than group-housed animals ($p < 0.05$). Nevertheless, there was no significant difference between the groups regarding oral leukoplakia incidence ($p > 0.05$). Bar graphs represent the percentage of OSCC and oral leukoplakia for both groups.

Page 52

Fig. 3. Tumor volume. Student's test-*t* revealed that socially isolated rats had increased tumor volume compared to group-housed rats ($p = 0.0366$). Bar graphs represent mean with labeled error bars (\pm SEM).

Page 53

Fig. 4. Body weight variation and spleen weight. (A) Socially isolated rats showed weight loss while group-housed rats exhibited body weight gain during carcinogen

treatment. **(B)** After carcinogenic induction, isolated rats showed lower spleen weight than grouped animals. Student's test-*t*; bar graphs represent mean with labeled error bars (\pm SEM).

Page 57

Fig. 5. Analysis of depressive behavior. **(A and D)** One-week pre-carcinogenic induction. **(B and E)** Ten weeks of carcinogenic induction. **(C and F)** Twenty weeks of carcinogenic induction. In all moments, there were no significant differences regarding the depressive-like behavior between groups ($p > 0.05$). Student's test-*t*; bar graphs represent mean with labeled error bars (\pm SEM).

Page 59

Fig. 6. Gene expression of TNF-alpha, IL-6, MMP-2, MMP-9 and VEGF in the OSCCs. **(A)** TNF-alpha, **(B)** IL-6, **(C)** MMP-2, **(D)** MMP-9 and **(E)** VEGF. There were no significant differences regarding the expression of tumor progression-related genes between groups ($p > 0.05$). Student's test-*t*; bar graphs represent mean with labeled error bars (\pm SEM).

Lista de Tabelas

Lista de Tabelas

Page 55

Table 1. OSCC microscopic features according to the Bryne's criteria.

Page 55

Table 2. Malignancy risk of the leukoplakia tissues according to the Binary Grading System (Kujan's criteria).

Lista de Abreviaturas

Lista de Abreviaturas

4NQO – 4-nitroquinoline-1-oxide

ACTH – adrenocorticotropin

ADRs - adrenergic receptors

AKT – preotein kinase A

ANS - autonomic nervous system

BDNF – brain-derived neutrophic factor

cAMP – adenosine 3',5'-monofosfato cíclic

cDNA - complementary DNA

CEC – carcinoma espinocelular

CNS – central nervous system

CRH - corticotropin releasing hormone

CT - comparative threshold

CV – coefficient of variation

DNA – deoxyribonucleic acid

E - epinephrine

ECM – extracellular matrix

eg. – exemple

EIS – estresse por isolamento social

FST – forced swimming test

H&E – hematoxylin and eosin

HPA – hypothalamic-pituitary-adrenal

IL-6 – interleukin-6

Ltd. - Limitada

MAPK – mitogen-activated protein kinase

MMP-2 – matrix metalloproteinase 2

MMP-9 – matrix metalloproteinase 9

mRNA – messenger ribonucleic acid

NE – norepinephrine

NK – natural killer

OSCC – oral squamous cell carcinoma

PKA – protein kinase A

PND – Postnatal day

RNA – ribonucleic acid

RNAse – ribonuclease

RQ - relative quantity

RT – room temperature

rt-PCR – reverse transcription polymerase chain reaction

SEM - standard error of the mean

SIS – social isolation stress

SNS – sympathetic nervous system

SP – São Paulo

TST – tail suspension test

UNESP – University Estadual Paulista

USA – United States of America

VEGF – vascular endothelial growth factor

vs - versus

WHO - World Health Organization

Sumário

1. Introduction	37
2. Materials and Methods	41
3. Results.....	48
4. Discussion.....	60
5. Conclusion	65
6. References	68
6. Anexo A.....	74
7. Anexo B.....	76

Social isolation stress increases the incidence and growth of chemically induced oral cancer in rats

Flávia Alves Verza^a, Vitor Bonetti Valente^a, Lia Kobayashi Oliveira^a, Marcelo Macedo Crivelini^b, Cristiane Furuse^b, Éder Ricardo Biasoli^a, Glauco Issamu Mihayara^a, Sandra Helena Penha de Oliveira^c, Daniel Galera Bernabé^{a*}

^aPsychoneuroimmunology Research Center, Oral Oncology Center, São Paulo State University (Unesp), School of Dentistry, 1193 José Bonifácio St, SP 15050-015, Araçatuba, São Paulo, Brazil

^bDepartment of Pathology and Clinical Propedeutics, São Paulo State University (Unesp), School of Dentistry, 1193 José Bonifácio St, SP 15050-015, Araçatuba, São Paulo, Brazil

^cImmunopharmacology Laboratory, Department of Basic Sciences, São Paulo State University (Unesp), School of Dentistry, 1193 José Bonifácio St, SP 15050-015, Araçatuba, São Paulo, Brazil

Keywords: Neoplasms; Head and neck neoplasms; Oral neoplasms; Psychological stress; Social isolation; Carcinogenesis; Depression.

Conflicts of interest: None.

***Address correspondence and reprint requests to:**

Dr. Daniel Galera Bernabé

Assistant Professor; Psychoneuroimmunology Research Center, Oral Oncology Center, Department of Pathology and Clinical Propedeutics, São Paulo State University (Unesp), School of Dentistry, 1193 José Bonifácio St, SP 15050-015, Araçatuba, São Paulo, Brazil

Telephone number: +55 18 36363268 / 36363275

E-mail address: danielbernabe@foa.unesp.br

Normalização segundo a revista *Brain, Behavior, and Immunity* (ANEXO B)

Verza FA. Social isolation stress increases onset and growth of chemically induced oral cancer in rats. [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2017.

Abstract

Clinical and preclinical studies have shown that chronic stress may influence cancer progression, however its influence on the onset of the disease is poorly understood. Amongst the stressful events, social isolation stress (SIS) affects a large number of individuals, and may induce neurohormonal dysregulation and emotional disorders. Although investigations show that SIS may increase the progression of some types of malignancies, its influence on the onset and progression of head and neck cancer is unknown. In this study we have evaluated the SIS effects on the occurrence and progression of induced oral squamous cell carcinoma (OSCC), as well as its effects on depression-like behavior and expression of genes involved in tumor progression. Sixty male Wistar rats were divided into two groups of 30 animals: isolated group (rats submitted to SIS) and grouped (rats non-stressed). In the SIS group, the animals remained individually isolated after completing 21 days of life, while in the control group the rats were kept in group. At 90 days of age, both groups were tested for depression-like behavior by the tail suspension (TST) and forced swimming (FST) tests. Afterwards, the animals were submitted to oral carcinogenic induction with carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) diluted in drinking water. After 20 weeks, the animals were again tested for depressive behavior and euthanized for histopathological analysis in the tongue specimens. Real-time PCR was performed to evaluate mRNA expression for TNF-alpha, IL-6, VEGF, MMP-2 and MMP-9 genes in tumors from the both groups. The results showed that SIS increased OSCC occurrence by 20.4% in relation to control group ($p = 0.002$). Isolated rats displayed tumor volume two-fold higher than grouped rats ($p = 0.0366$). Stressed rats lost more weight ($p = 0.006$) and showed lower spleen volume ($p = 0.0121$) compared to non-stressed rats. SIS induced increase of mRNA expression for TNF-alpha, IL-6, VEGF, MMP-2 and MMP-9 genes, but these results did not reach statistical significance ($p > 0.05$). SIS did not induce significant changes in depression-like behavior measured by TST and FST before and after oral carcinogenesis induction ($p > 0.05$). This study provides the first evidence that chronic stress by social isolation may influence the chemically induced OSCC occurrence and progression in animals.

Keywords: Neoplasms; Head and neck neoplasms; Oral neoplasms; Psychological stress; Social isolation; Carcinogenesis; Depression.

Introduction

1. Introduction*

In the last decade, there has been a growing number of studies investigating the association between emotional disorders and cancer progression (Al-Azri et al., 2014; Capoccia et al., 2015; Madden et al., 2013; Rana et al., 2015; Shi et al., 2015; Smith et al. 2017; Xie et al., 2015). The responses to stress begin in the brain with the activation of the Central Nervous System (CNS) and secretion of several stress-related mediators via hypothalamic-pituitary-adrenocortical (HPA) axis and Sympathetic Nervous System (SNS) (Armaiz-Pena et al., 2008). The activation of the HPA axis due to stress occurs when neurons of the paraventricular nucleus of the hypothalamus secrete corticotropin releasing hormone (CRH) (Shin et al., 2016) This molecule is released into the bloodstream and reaches the anterior pituitary gland, which responds by releasing hormones such as adrenocorticotropin (ACTH) (Shin et al., 2016). The hormone ACTH is transported through the peripheral circulation to the adrenal glands, which synthesize and release cortisol into the tissue (Katz et al., 2003; Rana et al., 2015).

Chronic stress can induce a deregulated production of catecholamines such as norepinephrine (NE) and epinephrine (E) by the CNS and adrenal gland (Gunnar et al., 2007). These stress-related mediators may affect cancer progression by modulating cellular functions through adrenergic receptors (ADRs), which are found in many types of gastric (Shin et al., 2007), ovarian (Thaker et al., 2006), breast (Madden et al., 2013; Qin et al., 2015), and oral (Bernabé et al., 2011; Xie et al., 2015) cancers, and stromal cells in the tumor microenvironment (Cole et al., 2008; Eng et al., 2014). Activated adrenergic signaling may modifies the activity of cancer cells influencing tumor angiogenesis, DNA repair system and inhibition of apoptosis (Antoni et al., 2006). For example, stress-related catecholamines NE and E increase the expression of genes involved in tumor angiogenesis and cell proliferation, such as vascular endothelial growth factor (VEGF), tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and interleukin-6 (IL-6), as well as deregulate the production of matrix metalloproteinases (MMPs) types 2

* Normalização segundo a revista *Brain, Behavior, and Immunity* (Anexo B).

and 9; proteins that increase the potential for tumor invasion and metastasis (Lutgendorf et al., 2003; Lutgendorf et al., 2008a; Lutgendorf et al., 2008b; Yang et al., 2008; Sood et al., 2006; Yang et al., 2009).

Several stimuli in animals and humans may induce acute and chronic stress (Cacioppo et al., 2003; Dayas et al., 2001; Evans et al., 2012; Fone et al. 2008; Hermes et al; 2009; Lutgendorf et al., 2003; Sood et al., 2006). In general, these stressful events promote physical and psychological responses to the threat of an adverse condition. For example, stress responses may be triggered by physical stimulus (eg. pain, foot shock, immobilization), stressors that challenge cardiovascular homeostasis (eg. hemorrhage, exercise, heat exposure) and social stressors such as break interactions among individuals (eg. marital separation, death of partner, unemployment and social isolation) (Dayas et al., 2001). Investigations in the last decades have explored the effects of social isolation stress (SIS) in healthy people and individuals with illness (Al-Azri et al., 2014; Friedler et al., 2015; Holt-Lunstad et al., 2010; Karelina et al., 2011; Kroenke et al., 2003; Rana et al., 2015; Shi et al., 2015; Smith et al., 2017). Emotional stress due to social isolation does not affect only people who live alone. The breakup of relationships or even the feeling of loneliness can affect any individual, including those who reside with other people. Chronic stress by social isolation has direct impact on human health through Autonomous Nervous System (ANS) dysregulation, immune system and inflammatory markers (Campos et al., 2013; Rivera et al., 2011). Studies have shown that social isolation may increase mortality rates in humans (Al-Azri et al., 2014; House et al., 1988). In a meta-analysis investigation, researchers analyzed 148 surveys including more than 300 participants and found that people with strong "social relationships" survival rate were 50% higher than in isolated individuals (Holt-Lunstad et al., 2010).

Studies have shown that SIS can influence cancer progression (Capoccia et al., 2015; Hermes et al., 2009; Liu et al., 2005; Madden et al., 2013; Wu et al., 2000). For example, investigations revealed that SIS induced higher tumor growth in preclinical models of breast (Capoccia et al., 2015; Madden et al., 2013) and liver cancer (Liu et al., 2005). Increased cancer progression related to social isolation also has been seen in humans (Sprehn et al., 2009). SIS may affect tumor growth by altering the expression of genes associated with disease progression and affecting immune responses against the tumor cells (Liu et al., 2005; Williams et al., 2009). These effects of social isolation on

cancer progression are usually accompanied by alterations in the SNS with increased catecholamines levels found in the blood or tumor tissue (Capoccia et al., 2015; Liu et al., 2005). In addition to being able to influence the cancer progression, SIS may be predictive for emotional disorders such as depression (Reiche et al., 2004; Cacioppo et al., 2015; Wang et al., 2017). Although cancer patients display a higher occurrence of depressive symptoms after disease diagnosis (Raison & Miller, 2003; Shi et al., 2015; Smith et al., 2017) and evidences show that depressive phenotype may affect cancer progression (Penninx et al., 1998; Pyter et al., 2013), the relationships among SIS, depression and tumor occurrence in preclinical carcinogenesis models are poorly known

Oral cancer is the most common type of head and neck cancer and occurs more frequently in elderly men with a peak incidence in the fifth and sixth decades (Ferlay et al., 2010; Rettig & D'Souza, 2015). Squamous cell carcinomas (SCCs) constitute the majority of oral cancers, and the main risk factors for oral SCCs (OSCCs) are long-term tobacco and alcohol consumption (Zavras et al., 2001; Rettig & D'Souza, 2015). Few studies have analyzed the impact of chronic stress and its neurohormones on OSCC progression (Bernabé et al., 2011; Rana et al., 2015; Xie et al., 2015). Our previous study demonstrated that stress levels of norepinephrine increased cell proliferation and IL-6 secretion by the OSCC cell lines *in vitro* (Bernabé et al., 2011). This event occur through beta-adrenergic receptors activation. Recently, Xie et al. (2015) using an OSCC orthotopic model in rats showed that restraint stress accelerated tumor growth. However, Rivera et al. (2011) showed that chronic restraint stress did not influence the incidence and severity of chemically induced OSCC by 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO) carcinogen. Until now, there are no studies, which have analyzed the effects of SIS on oral cancer occurrence and progression.

We hypothesized that social isolation could act as a cofactor of carcinogenic substances affecting oral carcinogenesis and increasing OSCC progression. In the present study, we have used an oral carcinogenesis preclinical model to investigate the impact of SIS on the occurrence of chemically induced OSCC in rats, as well as its role on depression-like behavior and tumor progression-related genes.

Conclusion

5. Conclusion

This study demonstrate for the first time that social isolation stress may increase OSCC occurrence and progression in a rat oral carcinogenesis model. Socially isolated rats display higher OSCC incidence and larger tumors than group-housed rats. Together, our results demonstrate that emotional disorders such as SIS can influence the onset and progression of OSCC. Future studies are needed to investigate the neurohormonal, inflammatory and immune mechanisms involved in social isolation-induced oral carcinogenesis and tumor progression.

References

6. References *

Aizer AA, Chen MH, McCarthy EP, Mendu ML, Koo S, Wilhite TJ, Graham PL, Choueiri TK, Hoffman KE, Martin NE, Hu JC, Nguyen PL. 2013. Marital status and survival in patients with cancer. *J Clin Oncol.* 1;31(31):3869-76.

Antoni MH, Lutgendorf SK, Cole SW, Dhabhar FS, Sephton SE, McDonald PG, Stefanek M, Sood AK. 2006. The influence of bio-behavioural factors on tumour biology: pathways and mechanisms. *Nat Rev Cancer.* 6(3):240-8.

Al-Azri M, Al-Awisi H, Al-Rasbi S, El-Shafie K, Al-Hinai M, Al-Habsi H, Al-Moundhri M. 2014. Psychosocial impact of breast cancer diagnosis among omani women. *Oman Med J.* 29(6):437-44. 6(3):240-8. Review.

Arakawa H. 2003. The effects of isolation rearing on open-field behavior in male rats depends on developmental stages. *Dev Psychobiol.* 43(1):11-9.

Armaiz-Pena GN, Lutgendorf SK, Cole SW, Sood AK. 2009. Neuroendocrine modulation of cancer progression. *Brain Behav Immun.* 23(1):10-5. Review.

Bernabé DG, Tamae AC, Biasoli ÉR, Oliveira SH. 2011. Stress hormones increase cell proliferation and regulates interleukin-6 secretion in human oral squamous cell carcinoma cells. *Brain Behav Immun.* 25(3):574-83.

Bryne M, Nielsen K, Koppang HS, Dabelsteen E. 1991. Reproducibility of two malignancy grading systems with reportedly prognostic value for oral cancer patients. *J Oral Pathol Med.* 20(8):369-72.

Cacioppo JT, Hawkley LC. 2003. Social isolation and health, with an emphasis on underlying mechanisms. *Perspect Biol Med.* 46(3 Suppl):S39-52.

Campos AC, Fogaça MV, Aguiar DC, Guimarães FS. 2013. Animal models of anxiety disorders and stress. *Rev Bras Psiquiatr.* 2:S101-11.

Capoccia S, Berry A, Bellisario V, Panetta P, Raggi C, Ortona E, Aricò E, Proietti E, Giorgio M, Pelicci PG, Cirulli F. 2015. Isolation stress affects tumor progression through a BDNF-neuroendocrine axis in a mouse model of breast cancer. *Psychoneuroendocrinology.* 61:50.

Cole SW, Sood AK. 2012. Molecular pathways: beta-adrenergic signaling in cancer. *Clin Cancer Res.* 1;18(5):1201-6. Review.

* Normalização segundo a revista *Brain, Behavior, and Immunity* (Anexo B).

- Dayas CV, Buller KM, Crane JW, Xu Y, Day TA. 2001. Stressor categorization: acute physical and psychological stressors elicit distinctive recruitment patterns in the amygdala and in medullary noradrenergic cell groups. *Eur J Neurosci.* 14(7):1143-52.
- Eng JW, Kokolus KM, Reed CB, Hylander BL, Ma WW, Repasky EA. 2014. A nervous tumor microenvironment: the impact of adrenergic stress on cancer cells, immunosuppression, and immunotherapeutic response. *Cancer Immunol Immunother.* 63(11):1115-28.
- Evans J, Sun Y, McGregor A, Connor B. 2012. Allopregnanolone regulates neurogenesis and depressive/anxiety-like behaviour in a social isolation rodent model of chronic stress. *Neuropharmacology.* 63(8):1315-26.
- Ferdman N, Murmu RP, Bock J, Braun K, Leshem M. 2007. Weaning age, social isolation, and gender, interact to determine adult explorative and social behavior, and dendritic and spine morphology in prefrontal cortex of rats. *Behav Brain Res.* 18;180(2):174-82.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer.* 15; 127(12):2893-917.
- Fone KC, Porkess MV. 2008. Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents-relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neurosci Biobehav Rev.* 32(6):1087-102.
- Friedler B, Crapser J, McCullough L. 2015. One is the deadliest number: the detrimental effects of social isolation on cerebrovascular diseases and cognition. *Acta Neuropathol.* 129(4):493-509.
- Gunnar M, Quevedo K. 2007. The neurobiology of stress and development. *Annu Rev Psychol.* 58:145-73.
- Inverso G, Mahal BA, Aizer AA, Donoff RB, Chau NG, Haddad RI. 2015. Marital status and head and neck cancer outcomes. *Cancer.* 15;121(8):1273-8.
- Hermes GL, Delgado B, Tretiakova M, Cavigelli SA, Krausz T, Conzen SD, McClintock, MK. 2009. Social isolation dysregulates endocrine and behavioral stress while increasing malignant burden of spontaneous mammary tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 106(52), 22393–22398.
- Holt-Lunstad J, Smith TB, Layton JB. 2010. Social relationships and mortality risk: a meta-analytic review. *PLoS Med.* 27;7(7).
- House JS, Landis KR, Umberson D. 1988. Social relationships and health. *Science.* 29;241(4865):540-5.
- Karelina K, DeVries AC. 2011. Modeling social influences on human health. *Psychosom Med.* 73(1):67-74.
- Katz HC, Shear M, Altini M. 1985. A critical evaluation of epithelial dysplasia in oral mucosal lesions using the Smith-Pindborg method of standardization. *J Oral Pathol.* 14(6):476-82.
- Katz MR, Irish JC, Devins GM, Rodin GM. 2003. Psychosocial adjustment in head and neck cancer: the impact of disfigurement, gender and social support. *Head Neck.* 25(2):103–112.
- Kroenke CH, Kubzansky LD, Schernhammer ES, Holmes MD, Kawachi I. 2006. Social networks, social support, and survival after breast cancer diagnosis. *J Clin Oncol.* 1;24(7):1105-11.

- Kujan O, Oliver RJ, Khattab A, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. 2006. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Oncol.* 42(10):987-93.
- Lamkin DM, Lutgendorf SK, Lubaroff D, Sood AK, Beltz TG, Johnson AK. 2011. Cancer induces inflammation and depressive-like behavior in the mouse: modulation by social housing. *Brain Behav Immun.* 25(3):555-64.
- Leng A, Feldon J, Ferger B. 2004. Long-term social isolation and medial prefrontal cortex: dopaminergic and cholinergic neurotransmission. *Pharmacol Biochem Behav.* 77(2):371-9.
- Liu H, Wang Z. 2005. Effects of social isolation stress on immune response and survival time of mouse with liver cancer. *World J Gastroenterol.* 7;11(37):5902-4.
- Lutgendorf SK, Cole S, Costanzo E, Bradley S, Coffin J, Jabbari S, Rainwater K, Ritchie JM, Yang M, Sood AK. 2003. Stress-related mediators stimulate vascular endothelial growth factor secretion by two ovarian cancer cell lines. *Clin Cancer Res.* 1;9(12):4514-21.
- Lutgendorf SK, Johnsen EL, Cooper B, Anderson B, Sorosky JI, Buller RE, Sood AK. 2002. Vascular endothelial growth factor and social support in patients with ovarian carcinoma. *Cancer.* 15;95(4):808-15.
- Lutgendorf SK, Lamkin DM, Jennings NB, Arevalo JM, Penedo F, DeGeest K, Langley RR, Lucci JA 3rd, Cole SW, Lubaroff DM, Sood AK. 2008a. Biobehavioral influences on matrix metalloproteinase expression in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res.* 1;14(21):6839-46.
- Lutgendorf SK, Sood AK, Anderson B, McGinn S, Maiseri H, Dao M, Sorosky JI, De Geest K, Ritchie J, Lubaroff DM. 2005. Social support, psychological distress, and natural killer cell activity in ovarian cancer. *J Clin Oncol.* 1;23(28):7105-13.
- Lutgendorf SK, Weinrib AZ, Penedo F, Russell D, DeGeest K, Costanzo ES, Henderson PJ, Sephton SE, Rohleder N, Lucci JA 3rd, Cole S, Sood AK, Lubaroff DM. 2008b. Interleukin-6, cortisol, and depressive symptoms in ovarian cancer patients. *J Clin Oncol.* 10;26(29):4820.
- Ma J, Wu CF, Wang F, Yang JY, Dong YX, Su GY, Zhang K, Wang ZQ, Xu LW, Pan X, Zhou TS, Ma P, Song SJ. 2016. Neurological mechanism of Xiaochaihutang's antidepressant-like effects to socially isolated adult rats. *J Pharm Pharmacol.* 68(10):1340-9.
- Madden KS, Szpunar MJ, Brown EB. 2013. Early impact of social isolation and breast tumor progression in mice. *Brain Behav Immun.* 30:S135-41.
- Qin JF, Jin FJ, Li N, Guan HT, Lan L, Ni H, Wang Y. 2015. Adrenergic receptor β_2 activation by stress promotes breast cancer progression through macrophages M2 polarization in tumor microenvironment. *BMB Rep.* 48(5):295-300.
- Penninx BW, Guralnik JM, Pahor M, Ferrucci L, Cerhan JR, Wallace RB, Havlik RJ. 1998. Chronically depressed mood and cancer risk in older persons. *J Natl Cancer Inst.* 16;90(24):1888-93.
- Pisu MG, Dore R, Mostallino MC, Loi M, Pibiri F, Mameli R, Cadeddu R, Secci PP, Serra M. 2011. Down-regulation of hippocampal BDNF and Arc associated with improvement in aversive spatial memory performance in socially isolated rats. *Behav Brain Res.* 12;222(1):73-80.

- Popovic M, Popovic N, Eric-Jovicic M, Jovanova-Nesic K. 1999. Immune Responses in Nucleus Basalis Magnocellularis-Lesioned Rats Exposed to Chronic Isolation Stress. *Int J Neurosci.* 100(1-4):125-131.
- Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. 1977. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 229(2):327-36.
- Pyter LM, Prendergast BJ. 2013. Individual differences in pre-carcinogen cytokine and corticosterone concentrations and depressive-like behavior predict tumor onset in rats exposed to a carcinogen. *Psychoneuroendocrinology.* 38(6):800-7.
- Rana M, Kanatas A, Herzberg PY, Khoschdel M, Kokemueller H, Gellrich NC, Rana M. 2015. Prospective study of the influence of psychological and medical factors on quality of life and severity of symptoms among patients with oral squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 53(4):364-70.
- Raison CL, Miller AH. 2003. Depression in cancer: new developments regarding diagnosis and treatment. *Biol Psychiatry.* 1;54(3):283-94.
- Reiche EM, Nunes SO, Morimoto HK. 2004. Stress, depression, the immune system, and cancer. *Lancet Oncol.* 5(10):617-25. Review.
- Rettig EM, D'Souza G. 2015. Epidemiology of Head and Neck Cancer. *Surg Oncol Clin N Am.* 24(3):379-396
- Ribeiro DA, Fávero Salvadori DM, da Silva RN, Ribeiro Darros B, Alencar Marques ME. 2004. Genomic instability in non-neoplastic oral mucosa cells can predict risk during 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. *Oral Oncol.* 40(9):910-5.
- Rivera CA, Droguett DA, Kemmerling U, Venegas BA. 2011. Chronic restraint stress in oral squamous cell carcinoma. *J Dent Res.* 90(6):799-803.
- Shi X, Zhang TT, Hu WP, Ji QH. 2017. Marital status and survival of patients with oral cavity squamous cell carcinoma: a population-based study. *Oncotarget.* 25;8(17):28526-28543.
- Shi Y, Gu F, Hou LL, Hu YQ. 2015. Self-reported depression among patients with non-small cell lung cancer. *Thorac Cancer.* 6(3):334-7.
- Shin KJ, Lee YJ, Yang YR, Park S, Suh PG, Follo MY, Cocco L, Ryu SH. 2016. Molecular Mechanisms Underlying Psychological Stress and Cancer. *Curr Pharm Des.* 22(16):2389-402.
- Shin VY, Wu WK, Chu KM, Koo MW, Wong HP, Lam EK, Tai EK, Cho CH. 2007. Functional role of beta-adrenergic receptors in the mitogenic action of nicotine on gastric cancer cells. *Toxicol Sci.* 96(1):21-9.
- Smith JD, Shuman AG, Riba MB. 2017. Psychosocial Issues in Patients with Head and Neck Cancer: an Updated Review with a Focus on Clinical Interventions. *Curr Psychiatry Rep.* 19(9):56.
- Sood AK, Bhatti R, Kamat AA, Landen CN, Han L, Thaker PH, Li Y, Gershenson DM, Lutgendorf S, Cole SW. 2006. Stress hormone-mediated invasion of ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res.* 15;12(2):369-75.

Sprehn GC, Chambers JE, Saykin AJ, Konski A, Johnstone PAS. 2009. Decreased Cancer Survival in Individuals Separated at Time of Diagnosis: Critical Period for Cancer Pathophysiology? *Cancer*, 115(21), 5108–5116.

Sun Y, Evans J, Russell B, Kydd R, Connor B. 2013. A benzodiazepine impairs the neurogenic and behavioural effects of fluoxetine in a rodent model of chronic stress. *Neuropharmacology*. 72:20-8.

Thaker PH, Han LY, Kamat AA, Arevalo JM, Takahashi R, Lu C, Jennings NB, Armaiz-Pena G, Bankson JA, Ravoori M, Merritt WM, Lin YG, Mangala LS, Kim TJ, Coleman RL, Landen CN, Li Y, Felix E, Sanguino AM, Newman RA, Lloyd M, Gershenson DM, Kundra V, Lopez-Berestein G, Lutgendorf SK, Cole SW, Sood AK. 2006. Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. *Nat Med*. 12(8):939-44.

van der Waal I, Schepman KP, van der Meij EH, Smeele LE. 1997. Oral leukoplakia: a clinicopathological review. *Oral Oncol*. 33(5):291-301. Review.

Wang HT, Huang FL, Hu ZL, Zhang WJ, Qiao XQ, Huang YQ, Dai RP, Li F, Li CQ. 2017. Early-Life Social Isolation-Induced Depressive-Like Behavior in Rats Results in Microglial Activation and Neuronal Histone Methylation that Are Mitigated by Minocycline. *Neurotox Res*. 31(4):505-520.

Warnakulasuriya S, Johnson NW, van der Waal I. 2007. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med*. 36(10):575-80.

Weiss IC, Pryce CR, Jongen-Rêlo AL, Nanz-Bahr NI, Feldon J. 2004. Effect of social isolation on stress-related behavioural and neuroendocrine state in the rat. *Behav Brain Res*. 9;152(2):279-95.

Williams JB, Pang D, Delgado B, Kocherginsky M, Tretiakova M, Krausz T, Pan D, He J, McClintock MK, Conzen SD. 2009. A model of gene-environment interaction reveals altered mammary gland gene expression and increased tumor growth following social isolation. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2(10):850-61.

Wu W, Murata J, Murakami K, Yamaura T, Hayashi K, Saiki I. 2000. Social isolation stress augments angiogenesis induced by colon 26-L5 carcinoma cells in mice. *Clin Exp Metastasis*. 18(1):1-10.

Xie H, Li C, He Y, Griffin R, Ye Q, Li L. 2015. Chronic stress promotes oral cancer growth and angiogenesis with increased circulating catecholamine and glucocorticoid levels in a mouse model. *Oral Oncol*. 51(11):991-7.

Yang EV, Donovan EL, Benson DM, Glaser R. 2008. VEGF is differentially regulated in multiple myeloma-derived cell lines by norepinephrine. *Brain Behav Immun*. 22(3):318-23.

Yang EV, Kim SJ, Donovan EL, Chen M, Gross AC, Webster Marketon JI, Barsky SH, Glaser R. 2009. Norepinephrine upregulates VEGF, IL-8, and IL-6 expression in human melanoma tumor cell lines: implications for stress-related enhancement of tumor progression. *Brain Behav Immun*. 23(2):267-75.

Zavras AI, Douglass CW, Joshipura K, Wu T, Laskaris G, Petridou E, Dokianakis G, Segas J, Lefantzis D, Nomikos P, Wang YF, Diehl SR. 2001. Smoking and alcohol in the etiology of oral cancer: gender-specific risk profiles in the south of Greece. *Oral Oncol*. 37(1):28-35.