

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 31/01/2020.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA



“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Área de Concentração Estomatologia
Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP

JÉSSICA ARAÚJO FIGUEIRA

Early life stress by maternal separation increases tumor onset and progression in a chemically induced oral cancer model

Dissertação de Mestrado

Araçatuba – SP

2018

JÉSSICA ARAÚJO FIGUEIRA

Early life stress by maternal separation increases tumor onset and progression in a chemically induced oral cancer model

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

Orientador: Professor Assistente Doutor Daniel Galera Bernabé.

Coorientadores: Professora Adjunta Sandra Helena de Oliveira Penha;

Professor Adjunto Roelf Justino Cruz Rizzolo.

Araçatuba – SP

2018

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Figueira, Jéssica Araújo.

F475e Early life stress by maternal separation increases tumor onset and progression in a chemically induced oral cancer model / Jéssica Araújo Figueira. – Araçatuba, 2018
51 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientador: Prof. Daniel Galera Bernabé

Coorientador: Prof. Roelf Justino Cruz Rizzolo

Coorientadora: Profa. Sandra Helena de Oliveira Penha

1. Estresse psicológico 2. Neoplasias 3. Neoplasias bucais
4. Carcinoma de células escamosas 5. Carcinogênese I. T.

Black D6
CDD 617.63

Claudio Hideo Matsumoto
CRB-8/5550

Dedicatória

Dedico esta dissertação de mestrado à Dona Ana Cândida Pereira da Silva, exemplo de avó amorosa, dedicada, paciente e atenciosa, vencida pelo câncer muito cedo e um dos principais motivos da minha dedicação a este objetivo.

Agradecimentos

Agradeço à **Deus**, por sua infinita bondade e misericórdia, que apesar de mim tem me sustentado e permitido a conquista deste sonho.

Agradeço aos meus pais, **Heldo** e **Luzinete**, pela dedicação e amor incondicional, por investirem em minha formação, por sempre acreditarem em mim e por muitas vezes sacrificarem seus sonhos em favor dos meus. Obrigada pelo exemplo de amor, caráter, respeito, gratidão e fé. Amo vocês!

Ao meu irmão **Heldo Jr.**, por ser meu exemplo desde criança. Por sempre me desafiar a fazer mais, a ser melhor e conquistar os meus objetivos pelos meus próprios esforços. Agradeço por “do seu jeito” ter estado presente ajudando, apoiando e torcendo por mim.

Ao **Fábio**, por todo amor, carinho, paciência e parceria em todos os momentos; pelos conselhos, ajudas, puxões de orelha e palavras de incentivo; e por muitas vezes não ter me deixado desanimar. Sou grata à Deus por ter permitido que estivéssemos juntos nessa caminhada.

À família **de Souza Batista**, que tão bem me acolheu desde o primeiro momento, e que nestes últimos dois anos permitiram que finais de semana e almoços de domingo fossem menos solitários e mais divertidos. Obrigada por todo carinho. Estendo este agradecimento à minha “cunhadinha” **Chris**, por quem desenvolvi um enorme carinho e admiração.

À **Juliana** e ao **Bruno**, meus amigos-irmãos, que sempre se fizeram presentes mesmo com a distância. Por me aturarem já por bem mais de uma década, por toda parceria e bons momentos.

Aos meus colegas de faculdade que também se tornaram colegas de mestrado, **Letícia, Nayara e Breno**, pela excelente companhia e boas conversas durante as idas e vindas de Maringá.

À **Letícia**, minha eterna dupla, pela parceria de sempre, pelos longos períodos que me acompanhou e me ajudou com o uso do “microscópio da endo” e por toda a torcida. Fico feliz por compartilharmos mais este sonho juntas.

Às **professoras Vanessa, Ellen e Neli** da Universidade Estadual de Maringá - UEM, que me apresentaram ao mundo da estomatologia e me

inspiraram a seguir neste caminho, assim como muitos outros professores da UEM. Agradeço especialmente à **Profª Vanessa**, pela orientação e todos os ensinamentos durante a graduação e por continuarmos com a nossa parceria.

À Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FOA – UNESP), representada pelos Professores, diretor Dr. **Wilson Roberto Poi** e vice-diretor Dr. **João Eduardo Gomes Filho**. Ao programa de pós-graduação stricto sensu em Odontologia, coordenado pelo Prof. **Dr. André Luiz Fraga Briso**, pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado nesta Instituição.

Ao meu orientador, Profº Dr. **Daniel Galera Bernabé**, agradeço primeiro por ter me aceitado como orientada, ter me confiado esta pesquisa e por tantas outras oportunidades. Agradeço pela confiança e expectativa depositadas em mim, que por muitas vezes achei que não merecia. O senhor é um exemplo de professor, que realmente deseja ensinar, custe o que custar e demore o tempo que for, desde que o aprendizado seja atingido, valeu a pena. Exemplo de pesquisador, que tem um objetivo certo a ser alcançado, e que não mede esforços para atingi-lo. Obrigada por todo conhecimento compartilhado durante as clínicas, projetos de extensão, experimentos no laboratório e nas longas reuniões. Obrigada por esta grande oportunidade. Sou grata por tê-lo tido como mestre. Foi uma honra!

Ao Profº Dr. **Glauco Issamu Miyahara**, pela oportunidade de fazer parte desta equipe de pós-graduação, por todo conhecimento compartilhado e por sempre estar disposto a ajudar. O senhor é um exemplo de professor, pesquisador e gestor. Agradeço por ter me mostrado, no momento certo, que sempre vamos colher o que estamos plantando, mesmo que não seja no momento que desejamos, mas que temos que continuar persistentes que uma hora o retorno vai chegar. As suas palavras naquela reunião para me dar a notícia que mais uma vez eu não havia conseguido a bolsa foram extremamente importantes, me fizeram continuar firme e com mais garra. Obrigada por torcer por mim e acreditar no meu potencial!

Ao Profº Dr. **Éder Ricardo Biasoli**, por sua contribuição na minha formação clínica e por mostrar a importância de desenvolver um senso crítico.

À Prof^a Dra. **Kellen Cristine Tjioe**, por sua maneira descontraída de ensinar. Obrigada por me mostrar que para ser uma excelente professora não é preciso ser “seriona”. Além de ser uma excelente profissional e de ter uma inteligência fora do comum, você é exemplo de pessoa humilde, dedicada, comprometida e alto-astral. Obrigada por todos os ensinamentos compartilhados e paciência, tenho muita admiração por você!

À Prof^a Dra. **Cristiane Furuse**, por ter aceitado ser a patologista desta pesquisa, ter realizado as análises histopatológicas de forma idônea e por ter se esforçado para concluí-las dentro do curto período de tempo que tínhamos disponível. Obrigada professora pela dedicação e pela paciência em ensinar. Agradeço também pelas conversas descontraídas e pela forma leve de levar as coisas. Admiro a profissional e a pessoa que a senhora é!

À minha coorientadora, Prof^a Dra. **Sandra Helena Penha de Oliveira**, por ter aberto as portas de seu laboratório para que esta pesquisa fosse realizada. Agradeço pela sua generosidade e pela oportunidade de aprender com a senhora e seus alunos dentro do seu laboratório. Obrigada por sua forma irreverente e ao mesmo tempo carinhosa de ser. A senhora é um tremendo exemplo de pessoa, professora e pesquisadora! Estendo meu agradecimento aos seus alunos, principalmente à **Aline Takamiya** e ao **Victor Balera**, que sempre foram muito prestativos e atenciosos.

Ao meu coorientador Prof^o Dr. **Roelf Justino Cruz Rizollo**, por sempre estar disponível a ensinar, com muita paciência, as técnicas laboratoriais que foram realizadas para a obtenção e análises futuras dos cérebros dos animais. Agradeço também por seu excelente gosto musical e repertório durante os experimentos. O senhor tem uma visão científica única e admirável!

Ao Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica, representado pela Prof.^a **Ana Claudia Okamoto** e Prof.^a **Cristiane Furuse**, e seus demais docentes, Prof.^a **Ana Maria Soubhia**, Prof.^a **Leda Maria Salzedas**, Prof.^a **Renata Callestini Felipini** e Prof. **Marcelo Crivelini** pelos conhecimentos transmitidos. À assessora administrativa **Adriana de Paula e Silva Rahal Leal**, por quem tenho um carinho enorme, obrigada por toda ajuda, suporte, cuidado e palavras de incentivo.

A toda equipe do Centro de Oncologia Bucal (COB) da FOA-UNESP. **Jane Fátima, Suzy Elaine Freitas, Janaína Zavitoski, Anne Cocato, Daniene Ribeiro, Regiane Nogueira, Gabrielle Duarte, Francisco Collado, Sebastião Conrado**, agradeço pelo acolhimento e convívio diário. Em especial gostaria de agradecer à **Jane** e à **Suzy** por todo auxílio, preocupação e carinho.

Às funcionárias da Seção de Pós-Graduação da FOA - UNESP, **Valéria Zagatto, Cristiane Lui e Lilian Mada** por toda a disponibilidade, paciência e auxílio prestado em todas as etapas deste curso.

Aos alunos da graduação da FOA-UNESP e de outras instituições que auxiliaram no desenvolvimento desta pesquisa: **Felipe, Heitor, Karla, Lia, Karyne, Mayra, Bruna, Maria Clara, José, Ana Carolina, Letícia, Rosane e Laura**. Obrigada por toda ajuda, parceria e amizade. Vocês foram essências para que esta pesquisa fosse realizada!

Aos meus companheiros e amigos de Pós-graduação: **Saygo, Ingrid, Bruna, Flávia, Giseli, Vitor, Lígia, Stephanye, Daniela, Ketelin e Aneliza**. Obrigada pelo convívio diário, por todo auxílio, apoio e pelos bons momentos durante estes dois anos. **Saygo**, obrigada por ser meu parceiro desde o início dessa caminhada, por sempre me ajudar no que fosse preciso, por me apoiar, ouvir minhas reclamações e histórias, me acompanhar na comilança e tudo mais... Você se tornou um amigo-irmão pelo qual tenho um carinho e uma admiração absurda! **Ingrid**, como você mesma disse “engana-se quem acha que pessoas de comportamentos diferentes não podem ser amigas”, muito pelo contrário, somos prova disso. Obrigada por todo apoio, amizade e bons momentos. Com seu jeitinho meigo de ser que conquista a todos, me conquistou também e se tornou uma amiga muito especial! **Bruna**, agradeço pelo ouvido amigo e por estar sempre disposta a ajudar. Obrigada pelo convívio e amizade! **Flávia**, agradeço por todos os ensinamentos dentro do laboratório, pela disponibilidade em ajudar sempre que preciso e pelo apoio nas horas do aperto. Obrigada por todo auxílio e amizade! **Giseli**, agradeço pela paciência em ensinar, pela parceria e ajuda nos experimentos, mesmo nos finais de semana e feriados, e claro pela amizade! **Vitor**, agradeço pela disponibilidade e ajuda sempre que preciso, até nas noites de PCR, e também pela amizade!

Aos **pacientes** que tive a oportunidade de conhecer e atender durante esses dois anos. Obrigada pela confiança e a experiência de aprender e crescer com vocês!

Aos **animais** utilizados neste estudo, meu agradecimento e respeito!

Figueira JA. Estresse precoce de vida por separação maternal aumenta a incidência e progressão de tumor num modelo de câncer bucal quimicamente induzido em ratos [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2018.

Resumo

A ocorrência de eventos estressores nas fases iniciais de vida (estresse precoce de vida – EPV) pode afetar negativamente funções fisiológicas e psicológicas na fase adulta. Apesar de investigações pré-clínicas terem mostrado que o estresse crônico pode afetar a progressão do câncer, não há estudos que investigaram os efeitos do EPV na progressão do câncer bucal. No presente estudo, utilizamos um modelo animal de carcinogênese bucal induzida pelo carcinógeno 4-Nitroquinolona-1-Óxido (4NQO) para avaliar o impacto do EPV induzido por separação materna (SM) sobre a incidência e progressão do carcinoma espinocelular (CEC) de boca. As ninhadas submetidas ao protocolo de SM foram separadas de suas mães durante 3 horas por dia, do dia pós-natal 1 ao 21. Após os animais atingirem a idade adulta (90 dias), os grupos SM e controle foram tratados com 4NQO durante 120 dias. Análise histopatológica foi realizada para avaliar a incidência de CEC de boca e grau de malignidade do tumor entre os animais estressados e não estressados. Também foram avaliados o volume e espessura tumoral e o peso do baço e das glândulas adrenais. Os níveis plasmáticos de norepinefrina foram analisados por ELISA e a expressão de RNAm para os genes relacionados à progressão do CEC de boca (IL-6, TNF-alpha, VEGF, p53 e CDKN2A) foram analisados por PCR em tempo real. A SM no período pós-natal aumentou em aproximadamente 60% a ocorrência de CEC de boca na idade adulta. Os ratos submetidos à SM desenvolveram tumores mais espessos ($p=0.02$) e de maior volume ($p=0.03$) comparado ao grupo controle. Análise microscópica das características de malignidade dos CECs de boca mostraram pior padrão de invasão ($p=0.004$) e maior invasão perineural ($p=0.04$) nos tumores dos ratos estressados. O EPV no período neonatal diminuiu significativamente o peso do baço ($p=0.003$) e das glândulas adrenais ($p=0.03$) nos animais com câncer. Porém, não foi observada diferença nos níveis plasmáticos de norepinefrina. Os CECs dos ratos submetidos ao EPV apresentaram maior expressão de IL-6 ($p=0.04$) e menor expressão de p53 ($p=0.02$) em relação aos tumores dos ratos não estressados. Nossos achados fornecem a primeira evidência de que o EPV pode aumentar a incidência e progressão do câncer de boca quimicamente induzido, e sugerem que estes efeitos podem estar associados à uma desregulação da expressão de IL-6 e p53.

Palavras-chave: Estresse psicológico; câncer; câncer de boca; carcinoma espinocelular; carcinogênese.

Figueira JA. Early life stress by maternal separation increases tumor onset and progression in a chemically induced oral cancer model [dissertation]. São Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araçatuba, Brazil; 2018.

Abstract

Early life stress (ELS) may negatively affect the behavior and physiological functions in adulthood. Despite pre-clinical investigation have shown that chronic stress may affect cancer progression, there are no studies which have investigated ELS effects on oral cancer progression. In the present study, we used an oral carcinogenesis animal model induced by carcinogen 4-Nitroquinoline-1-oxide (4NQO) to assess the impact of ELS induced by maternal separation (MS) on the oral squamous cell carcinoma (OSCC) occurrence and progression. The litters underwent MS protocol were separated from their dam for 3 hours daily, during postnatal day 1-21. After animals reach adulthood (90 days), MS and control groups were treated with 4NQO during 120 days. Histopathological analysis was performed to evaluate the OSCC incidence and malignant degree between stressed and non-stressed rats. The volume and tumor thickness and the spleen and adrenal glands weight were also evaluated. Plasma norepinephrine levels were analyzed by ELISA and mRNA expression for OSCC progression-related genes (IL-6, TNF- α , VEGF, p53 and CDKN2A) were analyzed by real-time PCR. MS in neonatal period increased in almost 60% chemically induced OSCC occurrence in adulthood. Rats exposed to MS developed thicker ($p=0.02$) and larger tumors ($p=0.03$) compared to non-stressed rats. OSCCs from ELS rats showed worst pattern of invasion ($p=0.004$) and more perineural invasion ($p=0.04$) ELS also significantly reduced spleen ($p=0.003$) and adrenal glands ($p=0.03$) weight in cancer rats. ELS induced overexpression of IL-6 ($p=0.04$) and attenuated p53 expression ($p=0.04$) in OSCCs. Our results provides the first evidences that ELS may increase oral cancer onset and progression, and suggest that this effect can be associated with altered expression of IL-6 and p53.

Key-words: Psychological stress; cancer; mouth cancer; squamous cell carcinoma; carcinogenesis.

Lista de Figuras

- Figure 1. Clinical and histopathological features of chemically induced OSCC in control rats (A and B) and MS rats (C and D).** (A) White plate with erosive and ulcerative areas. (B) Extensive deep ulcer. (C) Heterogeneous white plate and vegetative ulcer. (D) Large ulcerated lesion. Microscopic examination revealed OSCCs with well-differentiated cells arranged in islands of varying size, keratin pearls and chronic inflammatory infiltrate in the tumor stroma (H&E staining, original magnification x100)..... 25
- Figure 2. Incidence of OSCC and OL.** Rats exposed to maternal separation displayed higher OSCC incidence compared with controls (MS, 59% vs control, 37%) ($p=0.0450$). Bar graphs represent the percentage of OSCC and OL occurrence for both groups..... 26
- Figure 3. Body weight variation and spleen weight.** (A) There were no differences in body weight variation between both groups. (B) Oral cancer rats who had been exposed to MS ($n=23$) showed lower spleen weight than non-stressed control animals with OSCC ($n=15$). Student's test- t ; bar graphs represent mean with labeled error bars (\pm SEM). $**p<0.05$ 27
- Figure 4. Adrenal gland weight and plasma norepinephrine levels.** (A) Oral cancer rats exposed to MS ($n=23$) showed lower adrenal gland weight than non-stressed oral cancer rats ($n=15$). (B) Plasma from MS oral cancer rats ($n=23$.) and non-stressed oral cancer rats ($n=15$) were tested for norepinephrine levels by ELISA. There was no significant difference in the plasma norepinephrine levels between both groups. Student's test- t ; bar graphs represent mean with labeled error bars (\pm SEM). $*p<0.05$... 28
- Figure 5. Tumor thickness and volume.** (A) Student's test- t revealed that animals submitted to maternal separation had thicker tumors compared to control animals. (B) MS group also displayed large tumors than control group. Bar graphs represent mean \pm SEM. $*p<0.05$ 28
- Figure 6. MS promoted upregulation of IL-6 mRNA and downregulation of p53 mRNA in the OSCCs.** Rt-PCR assay was performed to evaluate the MS effects on the expression of OSCC progression-related genes IL-6 (A), TNF-alpha (B), VEGF (C), p53 (D) e CDKN2A (E) (MS, $n=10$ vs control, $n=10$). Student's test- t ; bar graphs represent mean of increase percentage of mRNA expression compared to control (\pm SEM). $*p<0.05$ 34

Lista de Tabelas

Table 1.	OSCC and OL incidence in MS and control groups.....	26
Table 2.	OSCC microscopic features according to Bryne's Multifactorial Grading System.....	30
Table 3.	OSCC microscopic features according to the Brandwein-Gensler's histologic risk assessment.....	32

Lista de Abreviações

SNS = Sympathetic nervous system

HPA = Hypothalamic-pituitary-adrenal

VEGF = Vascular endothelial growth factor

TNF-alpha = Tumor necrosis factor-alpha

IL-6 = Interleukin-6

MMPs = Matrix metalloproteinases

ELS = Early life stress

MS = Maternal separation

NK= Natural killer

HNC = Head and neck cancer

OSCC = oral squamous cell carcinoma

4NQO = 4-nitroquinolone-1-oxide

OL = Oral leukoplakia

WHO = World health organization

RT-PCR = Reverse transcription-polimerase chain reaction

ELISA = Enzyme-linked immunosorbent assay

RNA = Ribonucleic acid

miRNA = Micro ribonucleic acid

mRNA = Messenger ribonucleic acid

DNA = Deoxyribonucleic acid

cDNA = Complementary deoxyribonucleic acid

CT = Threshold cycle

SEM = Standard error of the mean

Sumário

1 Introduction	15
2 Materials and Methods	19
2.1 Animals and experimental conditions.....	19
2.2 Experimental design.....	19
2.3 Maternal separation.....	19
2.4 Oral carcinogenesis model.....	20
2.5 Histopathological analysis.....	20
2.6 Thickness and tumor volume.....	21
2.7 Body weight variation, spleen and adrenal gland weight.....	22
2.8 Measurement of plasma norepinephrine levels.....	22
2.9 Analysis of tumor progression-related genes expression by RT-PCR.....	22
2.10 Statistical analysis.....	23
3 Results	24
3.1 Early life stress by maternal separation increases chemically induced OSCC incidence.....	24
3.2 Early life stress induces reduction of spleen weight in oral cancer rats.....	26
3.3 Adrenal gland weight and plasma norepinephrine levels.....	27
3.4 Rats submitted to maternal separation displayed thicker and larger tumors.....	28
3.5 Effects of maternal separation on the microscopic features of malignancy in OSCCs.....	29
3.5.1 Bryne's Multifactorial Grading System.....	29
3.5.2 Brandwein-Gensler's histologic risk assessment.....	31
3.6 Maternal separation increased IL-6 and reduced p53 gene expression in OSCC	33
4. Discussion	35
5. Conclusion	40
6. References	41
Anexo A	49
Anexo B	50

Early life stress by maternal separation increases tumor onset and progression in a chemically induced oral cancer model

Jéssica Araújo Figueira¹, Cristiane Furuse², Sandra Helena Penha de Oliveira³, Éder Ricardo Biasoli¹, Glauco Issamu Miyahara¹, Daniel Galera Bernabé^{1*}.

Affiliations

¹Psychoneuroimmunology Research Center, Oral Oncology Center, São Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araçatuba, São Paulo, Brazil.

²Department of Pathology and Clinical Propedeutics, São Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araçatuba, São Paulo, Brazil.

³Department of Basic Sciences, São Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araçatuba, São Paulo, Brazil.

Key-words: Psychological stress; cancer; mouth cancer; squamous cell carcinoma; carcinogenesis.

Conflicts of interest: None.

Funding sources: None

Correspondence to:

Prof. Daniel Galera Bernabé (danielbernabe@foa.unesp.br)

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

Early life stress by maternal separation increases tumor onset and progression in a chemically induced oral cancer model

1. Introduction*

Psychological stress has been associated to cancer initiation, growth and metastasis [Soung et al., 2015; Shin et al., 2016; Cole et al., 2015; Antoni et al., 2006]. Most of *in-vitro* and pre-clinical studies have shown that stress and its neurohormones can accelerate cancer cell proliferation [Soung et al., 2015; Shin et al., 2016; Cole et al., 2015; Antoni et al., 2006; Al-Azri et al., 2014; Capoccia et al., 2015; Madden et al., 2013; Shi et al., 2015; Smith et al., 2017; Xie et al., 2015], while their effects on tumor onset are still poorly understood. Stressful events induce increased secretion of hormones which have been implicated in cancer progression (eg. catecholamines and cortisol) through activation of the sympathetic nervous system (SNS) and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) [Armaiz-Pena et al., 2008; Shin et al., 2016].

Stress can suppress immune functions against cancer (presentation of tumor antigens, proliferation of T lymphocytes, and humoral and cell-mediated immune response) [Dhabhar et al., 1997; Elenkov et al., 2002; Glaser et al., 2001], and promotes resistance to apoptosis through the activation of anti-apoptotic genes [Herr et al., 2003; Pasquier et al., 2013]. Stress hormones (eg. epinephrine and norepinephrine) may also induce cancer progression by modulating the expression of tumor angiogenesis-related genes (eg. vascular endothelial growth factor – VEGF) and cell proliferation (tumor necrosis factor-alpha – TNF-alpha and interleukin-6 – IL-6), as well as overexpression of proteins involved in tumor invasion and metastasis (matrix metalloproteinases – MMPs,

* Formatado de acordo com as normas da revista Brain Behavior and Immunity

types 2 and 9) [Lutgendorf et al., 2003; Lutgendorf et al., 2008a; Yang et al., 2008; Sood et al., 2006; Yang et al., 2009].

There are several pre-clinical models to investigate the effects of stress on different biological conditions. For example, chronic stress can be induced by physical restraint [Rasmussen et al., 1957], agglomeration [Edwards et al., 1977], presence of predator (cat-rat) [Hamilton et al., 1964], shock [Borysenko et al., 1980], confrontation with intruders [Olivier et al., 1992] and social isolation [Krishnan et al., 2011]. When stress events occur during early life (eg. postnatal period and childhood), they can affect behavior and physiological functions, such as growth, metabolism, reproduction, besides inflammatory and immune responses in adulthood [Nishi et al., 2013; Silberman et al., 2016]. Early life stress (ELS) may induce permanent effects on organism [Nish et al., 2013; Silberman et al., 2016] and increases the risk for developing diseases like neuropsychiatric disorders, type 2 diabetes and cardiovascular disease [Kendler et al., 2002; Eriksson et al., 2014].

Maternal Separation (MS) is the main model among rodents for investigating the ELS impact on neuroendocrine stress-induced responses and psychiatric disorders (eg. depressive and anxiety like behaviors) [Andersen et al., 2015; Millstein and Holmes, 2007; Romeo et al., 2003; Schmidt et al., 2011; Vetulani et al., 2013]. Evidences show that MS during the postnatal period increases the activity of neurohormonal stress pathways (SNS and HPA axis) [Holmes et al., 2005; Lippmann et al., 2007], altering the levels of catecholamines and corticosterone [Gogberashvili et al., 2007; Esquivel et al., 2009; Sterley et al., 2013; Aisa et al., 2007; Marais et al., 2008; Daniels et al., 2009]. Past studies explored the effects of MS-induced ELS on cancer onset and progression. La

Barba et al. in 1969, 1971 and 1972 carried out initial investigations on the effects of MS on cancer progression through inoculation of Ehrlich ascites carcinoma cells in Balb/c mice [La Barba et al., 1969; 1971; 1972]. However, they did not find significant effects of MS on the survival and mortality rates [La Barba et al., 1969; 1971; 1972]. More recently, one study showed that MS followed by chronic restraint stress reduced the natural killer (NK) cells cytotoxicity and increased tumor metastases in a breast cancer pre-clinical model [Nakamura et al., 2011]. Using a chemically induced mammary cancer model in mice, Boyd et al. demonstrated that psychosocial stress during the neonatal period accelerated chemically induced mammary tumorigenesis in adulthood [Boyd et al., 2010].

Head and neck cancer (HNC) comprises the seventh most common cancer worldwide, being oral squamous cell carcinomas (OSCCs) the most frequent subtype of HNC [Day et al., 2005; Rettig & D'Souza, 2015]. OSCC commonly affects elderly men and its main risk factors are chronic tobacco and alcohol consumption [Day et al., 2015; Rettig & D'Souza, 2015]. Despite the known influence of chronic stress on tumor progression in some cancer pre-clinical models [Thaker et al., 2006; Lamkin et al., 2012; Kim-Fuchs et al., 2014; Zhao et al., 2015], few studies have analyzed the effects of stress and its neurohormones on OSCCs progression. Xie et al. using an orthotropic model in mice showed that chronic stress by restraint accelerated tumor growth and increased the invasiveness of OSCC cells [Xie et al., 2015]. However, Rivera et al. did not observed significant effects of restraint stress on tumor incidence in chemically induced OSCC mice model. [Riviera et al., 2001]. Recently, we have shown that pre-carcinogen stress hormones levels in the normal microenvironment may be predictive for chemically induced cancer in rats

[Valente et al. 2017], which would hypothesize that early stressors could affect oral carcinogenesis. Although ELS is a risk factor for neurobiological and psychiatric disorders and recent evidences show its impact on tumor immunity and progression, no studies which have investigated the effects of ELS on oral cancer progression. In this study, we have used a chemically induced oral carcinogenesis model to investigate the impact of MS-induced stress on OSCC onset and progression.

5. Conclusion

This study provides the first evidence that ELS increase tumor onset and progression in a chemically induced oral cancer model. Furthermore, our findings suggest that IL-6 overexpression and decrease of p53 expression could be a relevant part of the underlying mechanism behind the effects of ELS on oral carcinogenesis.

.

6. References*

Aisa B, Tordera R, Lasheras B, Del Río J, Ramírez MJ. Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2007 Apr;32(3):256-66.

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

Andersen SL, Teicher MH. Desperately driven and no brakes: developmental stress exposure and subsequent risk for substance abuse. *Neurosci Biobehav Rev*. 2009 Apr;33(4):516-24.

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

Armaiz-Pena GN, Allen JK, Cruz A, Stone RL, Nick AM, et al. Src activation by β -adrenoreceptors is a key switch for tumour metastasis. *Nat Commun*. 2013; 4:1403.

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

Borysenko M, Turesky S, Borysenko J, et al.: Stress and dental caries in the rat. *J Beh Med*. 1980; 3:233-243.

Boyd AL, Salleh A, Humber B, Yee J, Tomes L, Kerr LR. Neonatal experiences differentially influence mammary gland morphology, estrogen receptor α protein levels, and carcinogenesis in BALB/c mice. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2010 Nov;3(11):1398-408.

Brandwein-Gensler M, Teixeira MS, Lewis CM, Lee B, Rolnitzky L, Hille JJ, Genden E, Urken ML, Wang BY. Oral squamous cell carcinoma: histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. *Am J Surg Pathol*. 2005 Feb;29(2):167-78.

Brighenti E, Calabrese C, Liguori G, Giannone FA, Trerè D, Montanaro L, Derenzini M. Interleukin 6 downregulates p53 expression and activity by stimulating ribosome biogenesis: a new pathway connecting inflammation to cancer. *Oncogene*. 2014 Aug 28;33(35):4396-406.

Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Stene T, Bang G, Dabelsteen E. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med*. 1989 Sep;18(8):432-7.

* Formatado de acordo com as normas da revista *Brain Behavior and Immunity*

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

Chen CJ, Sung WW, Lin YM, Chen MK, Lee CH, Lee H, Yeh KT, Ko JL. Gender difference in the prognostic role of interleukin 6 in oral squamous cell carcinoma *PLoS One*. 2012;7(11):e50104.

Cole SW, Nagaraja AS, Lutgendorf SK, Green PA, Sood AK. Sympathetic nervous system regulation of the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer*. 2015;15(9):563-72.

Daniels WM, Fairbairn LR, van Tilburg G, McEvoy CR, Zigmond MJ, Russell VA, Stein DJ. Maternal separation alters nerve growth factor and corticosterone levels but not the DNA methylation status of the exon 1(7) glucocorticoid receptor promoter region. *Metab Brain Dis*. 2009 Dec;24(4):615-27.

Day TA, Chi A, Neville B, Hebert JR. Prevention of head and neck cancer. *Curr Oncol Rep*. 2005 Mar;7(2):145-53.

Deisenroth C, Zhang Y. Ribosome biogenesis surveillance: probing the ribosomal protein-Mdm2-p53 pathway. *Oncogene*. 2010 Jul 29;29(30):4253-60.

Dhabhar FS & McEwen BS. Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. *Brain Behav. Immun*. 1997 Dec;11(4):286-306.

Edwards EA, Dean LM: Effects of crowding of mice on humoral antibody formation and protection to lethal antigenic challenge. *Psychosom Med*. 1977; 19(39):19-24.

Elenkov IJ. Systemic stress-induced Th2 shift and its clinical implications. *Int. Rev. Neurobiol*. 2002;52:163-86.

Eriksson M, Räikkönen K, Eriksson JG. Early life stress and later health outcomes--findings from the Helsinki Birth Cohort Study. *Am J Hum Biol*. 2014 Mar-Apr;26(2):111-6.

Esquivel BB, Levin G, Rivarola MA, Suárez MM. Maternal separation and lesion of adn alters anxiety and adrenal activity in male rats. *Int J Neurosci*. 2009;119(9):1319-36.

Feng Z, Liu L, Zhang C, Zheng T, Wang J, Lin M, Zhao Y, Wang X, Levine AJ, Hu W. Chronic restraint stress attenuates p53 function and promotes tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 May 1;109(18):7013-8.

Gasche JA, Hoffmann J, Boland CR, Goel A. Interleukin-6 promotes tumorigenesis by altering DNA methylation in oral cancer cells. *Int J Cancer*. 2011 Sep 1;129(5):1053-63.

Glaser R, MacCallum RC, Laskowski BF, Malarkey WB, Sheridan JF, et al. Evidence for a shift in the Th-1 to Th-2 cytokine response associated with chronic stress and aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2001 Aug;56(8):M477-82.

Gogberashvili Kl. The comparative effect of continuous and intermittent maternal separation on catecholamines blood concentrations among rat pups. *Georgian Med News*. 2007 Jan;(142):70-2.

Guo Y, Xu F, Lu T, Duan Z, Zhang Z. Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer. *Cancer Treat Rev*. 2012;38(7):904–10.

Hamilton DR: Immunosuppressive effects of predator induced stress in mice with acquired immunity to *Hymenolepis nana*. *J Psychosom Res*. 1974; X3:143-150.

Hennessy MB, Tamborski A, Schiml P, Lucot J. The influence of maternal separation on plasma concentrations of ACTH, epinephrine, and norepinephrine in guinea pig pups. *Physiol Behav*. 1989 Jun;45(6):1147-52.

Herr I, Ucur E, Herzer K, Okouoyo S, Ridder R, et al. Glucocorticoid cotreatment induces apoptosis resistance toward cancer therapy in carcinomas. *Cancer Res*. 2003 Jun 15;63(12):3112-20.

Holmes A, LeGuisquet AM, Vogel E, Millstein RA, Leman S, Belzung C. Early life genetic, epigenetic and environmental factors shaping emotionality in rodents. *Neurosci.Biobehav.Rev*. 2005; 29:1335–1346.

Knojia D, Vaidya MM. 4-nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis. *Oral Oncol*. 2006 Aug;42(7):655-67. Epub 2006 Jan 30.

Kendler KS, Sheth K, Gardner CO, Prescott CA. Childhood parental loss and risk for first-onset of major depression and alcohol dependence: the time-decay of risk and sex differences. *Psychol Med*. 2002 Oct;32(7):1187-94.

Kiecolt-Glaser JK, Preacher KJ, MacCallum RC, Atkinson C, Malarkey WB, Glaser R. Chronic stress and age-related increases in the proinflammatory cytokine IL-6. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jul 22;100(15):9090-5.

Kim D, Bae CH, Jun YL, Jeon H, Koo S, Kim S. Acupuncture alters pro-inflammatory cytokines in the plasma of maternally separated rat pups. *Chin J Integr Med*. 2017 Dec;23(12):943-947.

Kim-Fuchs C, Le CP, Pimentel MA, Shackelford D, Ferrari D, Angst E, Hollande F, Sloan EK. Chronic stress accelerates pancreatic cancer growth and invasion: a critical role for beta-adrenergic signaling in the pancreatic microenvironment. *Brain Behav Immun*. 2014 Aug;40:40-7.

Krishnan V and Nestler EJ. Animal models of depression:molecular perspectives. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*. 2011; 7(1):121–147.

Kumari N, Dwarakanath BS, Das A, Bhatt AN. Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. *Tumour Biol.* 2016 Sep;37(9):11553-11572.

La Barba RC, Martini J, White J. The effect of maternal-separation on the growth of Ehrlich carcinoma in the Balb-c mouse. *Psychosom Med.* 1969; 31(2):129-33.
LaBarba RC, Lazar JM, White JL. The effects of maternal separation, isolation and sex on the response to Ehrlich carcinoma in BALB-c mice. *Psychosom Med.* 1972; 34(6):557-9.

LaBarba RC, White JL. Maternal deprivation and the response to Ehrlich carcinoma in BALB-c mice. *Psychosom Med.* 1971; 33(5):458-60.

Lamkin DM, Sloan EK, Patel AJ, Chiang BS, Pimentel MA, Ma JC, Arevalo JM, Morizono K, Cole SW. Chronic stress enhances progression of acute lymphoblastic leukemia via β -adrenergic signaling. *Brain Behav Immun.* 2012 May;26(4):635-41.

Li S, Sun Y, Gao D. Role of the nervous system in cancer metastasis. *Oncol Lett.* 2013 Apr;5(4):1101-1111. Epub 2013 Jan 31.

Liebig C, Ayala G, Wilks J, Verstovsek G, Liu H, Agarwal N, Berger DH, Albo D. Perineural invasion is an independent predictor of outcome in colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2009 Nov 1;27(31):5131-7.

Lippmann M, Bress A, Nemeroff CB, Plotsky PM, Monteggia LM. Long-term behavioural and molecular alterations associated with maternal separation in rats. *Eur.J.Neurosci.* 2007; 25:3091–3098.

Liu J, Zhang C, Hu W, Feng Z. Tumor suppressor p53 and its mutants in cancer metabolism. *Cancer Lett.* 2015 Jan 28;356(2 Pt A):197-203.

Lutgendorf SK, Cole S, Costanzo E, Bradley S, Coffin J, Jabbari S, Rainwater K, Ritchie JM, Yang M, Sood AK. Stress-related mediators stimulate vascular endothelial growth factor secretion by two ovarian cancer cell lines. *Clin Cancer Res.* 2003 Oct 1;9(12):4514-21.

Lutgendorf SK, Lamkin DM, Jennings NB, Arevalo JM, Penedo F, DeGeest K, Langley RR, Lucci JA 3rd, Cole SW, Lubaroff DM, Sood AK. Biobehavioral influences on matrix metalloproteinase expression in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2008a Nov 1;14(21):6839-46.

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. Interleukin-6, cortisol, and depressive symptoms in ovarian cancer patients. *J Clin Oncol.* 2008b Oct 10;26(29):4820-7.

Madden KS, Szpunar MJ, Brown EB. Early impact of social isolation and breast tumor progression in mice. *Brain Behav Immun.* 2013 Mar;30 Suppl:S135-41.

Marais L, van Rensburg SJ, van Zyl JM, Stein DJ, Daniels WM. Maternal separation of rat pups increases the risk of developing depressive-like behavior after subsequent chronic stress by altering corticosterone and neurotrophin levels in the hippocampus. *Neurosci Res.* 2008 May;61(1):106-12.

Meek DW. Regulation of the p53 response and its relationship to cancer. *Biochem J.* 2015 Aug 1;469(3):325-46.

Millstein RA, Holmes A. Effects of repeated maternal separation on anxiety- and depression-related phenotypes in different mouse strains. *Neurosci Biobehav Rev.* 2007;31(1):3-17.

Nakamura T, Walker AK, Sominsky L, Allen T, Rosengren S, Hodgson DM. Maternal separation in early life impairs tumor immunity in adulthood in the F344 rat. *Stress.* 2011;14(3):335-43.

Nilsson MB, Armaiz-Pena G, Takahashi R, Lin YG, Trevino J, Li Y, Jennings N, Arevalo J, Lutgendorf SK, Gallick GE, Sanguino AM, Lopez-Berestein G, Cole SW, Sood AK. Stress hormones regulate interleukin-6 expression by human ovarian carcinoma cells through a Src-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 2007 Oct 12;282(41):29919-26.

Nishi M, Horii-Hayashi N, Sasagawa T, Matsunaga W. Effects of early life stress on brain activity: implications from maternal separation model in rodents. *Gen Comp Endocrinol.* 2013; 15(181):306-9.

Olivier B, Mos J. Rodent models of aggressive behavior and serotonergic drugs. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 1992; 16(6):847–870.

Pasquier E, Street J, Pouchy C, Carre M, Gifford AJ, et al. β -blockers increase response to chemotherapy via direct antitumour and anti-angiogenic mechanisms in neuroblastoma. *Br J Cancer.* 2013;108 (12):2485-94.

Rasmussen AF, Marsh JT, Brill NQ: Increased susceptibility to herpes simplex virus in mice subjected to avoidance learning stress or restraint. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1957; 96:183-189.

Rettig EM, D'Souza G. Epidemiology of head and neck cancer. *Surg Oncol Clin N Am.* 2015 Jul;24(3):379-96.

Rivera CA, Droguett DA, Kemmerling U, Venegas BA. Chronic restraint stress in oral squamous cell carcinoma. *J Dent Res.* 2011 Jun;90(6):799-803.

Romeo RD, Mueller A, Sisti HM, Ogawa S, McEwen BS, Brake WG. Anxiety and fear behaviors in adult male and female C57BL/6 mice are modulated by maternal separation. *Horm Behav.* 2003 May;43(5):561-7.

Roque S, Mesquita AR, Palha JA, Sousa N, Correia-Neves M. The behavioral and immunological impact of maternal separation: a matter of timing. *Front Behav Neurosci*. 2014 May 22;8:192.

Saul AN, Oberyszyn TM, Daugherty C, Kusewitt D, Jones S, Jewell S, Malarkey WB, Lehman A, Lemeshow S, Dhabhar FS. Chronic stress and susceptibility to skin cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2005 Dec 7;97(23):1760-7.

Schmidt MV, Wang XD, Meijer OC. Early life stress paradigms in rodents: potential animal models of depression? *Psychopharmacology (Berl)*. 2011 Mar;214(1):131-40.

Shi Y, Frost PJ, Hoang BQ, Benavides A, Sharma S, Gera JF, Lichtenstein AK. IL-6-induced stimulation of c-myc translation in multiple myeloma cells is mediated by myc internal ribosome entry site function and the RNA-binding protein, hnRNP A1. *Cancer Res*. 2008 Dec 15;68(24):10215-22.

Shi Y, Frost P, Hoang B, Benavides A, Gera J, Lichtenstein A. IL-6-induced enhancement of c-Myc translation in multiple myeloma cells: critical role of cytoplasmic localization of the rna-binding protein hnRNP A1. *J Biol Chem*. 2011 Jan 7;286(1):67-78.

Shi Y, Gu F, Hou LL, Hu YQ. Self-reported depression among patients with non-small cell lung cancer. *Thorac Cancer*. 2015 May;6(3):334-7.

Shin KJ, Lee YJ, Suh PG, Yang YR, Park S, et al. Molecular Mechanisms Underlying Psychological Stress and Cancer. *Curr Pharm Des*. 2016; 22(16):2389-402.

Shinriki S, Jono H, Ota K, Ueda M, Kudo M, Ota T, Oike Y, Endo M, Ibusuki M, Hiraki A, Nakayama H, Yoshitake Y, Shinohara M, Ando Y. Humanized anti-interleukin-6 receptor antibody suppresses tumor angiogenesis and in vivo growth of human oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2009 Sep 1;15(17):5426-34.

Shinriki S, Jono H, Ueda M, Ota K, Ota T, Sueyoshi T, Oike Y, Ibusuki M, Hiraki A, Nakayama H, Shinohara M, Ando Y. Interleukin-6 signalling regulates vascular endothelial growth factor-C synthesis and lymphangiogenesis in human oral squamous cell carcinoma. *J Pathol*. 2011 Sep;225(1):142-50.

Silberman DM, Acosta GB, Zorrilla Zubilete MA. Long-term effects of early life stress exposure: Role of epigenetic mechanisms. *Pharmacol Res*. 2016 Jul;109:64-73.

Slotten HA, Kalinichev M, Hagan JJ, Marsden CA, Fone KC. Long-lasting changes in behavioural and neuroendocrine indices in the rat following neonatal maternal separation: gender-dependent effects. *Brain Res*. 2006 Jun 30;1097(1):123-32.

Smith JD, Shuman AG, Riba MB. Psychosocial Issues in Patients with Head and Neck Cancer: an Updated Review with a Focus on Clinical Interventions. *Curr Psychiatry Rep.* 2017 Sep;19(9):56.

Sood AK, Bhatti R, Kamat AA, Landen CN, Han L, Thaker PH, Li Y, Gershenson DM, Lutgendorf S, Cole SW. Stress hormone-mediated invasion of ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res.* 2006 Jan 15;12(2):369-75.

Soung, NK and Kim, BY. Psychological stress and cancer. *Journal of Analytical Science and Technology.* 2015, 6:30.

Sterley TL, Howells FM, Russell VA. Maternal separation increases GABA(A)receptor-mediated modulation of norepinephrine release in the hippocampus of a rat model of ADHD, the spontaneously hypertensive rat. *Brain Res.* 2013 Feb 25;1497:23-31.

Thaker PH, Han LY, Kamat AA, Arevalo JM, Takahashi R, Lu C, Jennings NB, Armaiz-Pena G, Bankson JA, Ravoory 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. Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. *Nat Med.* 2006 Aug;12(8):939-44.

Tilan J, Kitlinska J. Sympathetic Neurotransmitters and Tumor Angiogenesis-Link between Stress and Cancer Progression. *J Oncol.* 2010;2010:539706.

Ulrich-Lai YM, Figueiredo HF, Ostrander MM, Choi DC, Engeland WC, Herman JP. Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006 Nov;291(5):E965-73.

Uresin Y, Erbas B, Ozek M, Ozkök E, Gürol AO. Losartan may prevent the elevation of plasma glucose, corticosterone and catecholamine levels induced by chronic stress. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2004 Jun;5(2):93-6.

Valente VB, Verza FA, Lopes FYK, Ferreira JZ, Dos Santos PSP, Sundefeld MLMM, Biasoli ÉR, Miyahara GI, Soubhia AMP, de Andrade M, de Oliveira SHP, Bernabé DG. Stress hormones concentrations in the normal microenvironment predict risk for chemically induced cancer in rats. *Psychoneuroendocrinology.* 2017 Nov 8. pii: S0306-4530(17)30440-7.

Vetulani J. Early maternal separation: a rodent model of depression and a prevailing human condition. *Pharmacol Rep.* 2013;65(6):1451-61.

Wang YF, Chang SY, Tai SK, Li WY, Wang LS. Clinical significance of interleukin-6 and interleukin-6 receptor expressions in oral squamous cell carcinoma. *Head Neck.* Sep; 2002 24(9): 850–8.

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

Xiao F, Liu C, Zhang T, Yu G, Cui G. [Early maternal deprivation decreases the immunological function of F1 generation offspring in mice]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. 2014 Apr;30(4):360-2.

Xie H, Li C, He Y, Griffin R, Ye Q, Li L. Chronic stress promotes oral cancer growth and angiogenesis with increased circulating catecholamine and glucocorticoid levels in a mouse model. *Oral Oncol*. 2015 Nov;51(11):991-997.

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

Yang EV, Kim SJ, Donovan EL, Chen M, Gross AC, Webster Marketon JI, Barsky SH, Glaser R. 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*. 2009 Feb;23(2):267-75.

Zhang Y, Lu H. Signaling to p53: ribosomal proteins find their way. *Cancer Cell*. 2009 Nov 6;16(5):369-77.

Zhao L, Xu J, Liang F, Li A, Zhang Y, Sun J. Effect of Chronic Psychological Stress on Liver Metastasis of Colon Cancer in Mice. *PLoS One*. 2015 Oct 7;10(10):e0139978.

Anexo A

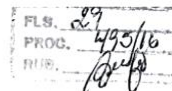
Parecer do CEUA (FOA-UNESP)



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Análise da influência do estresse precoce de vida sobre a carcinogênese bucal: estudo histopatológico, molecular e comportamental em animais"**, Processo FOA nº 00495-2016, sob responsabilidade de Daniel Galera Bernabé apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 02 de Setembro de 2016.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 02 de Outubro de 2018.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 02 de Novembro de 2018.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Influence of early life stress on oral carcinogenesis: histopathology, molecular and behavioral studies in animals"**, Protocol FOA nº 00495-2016, under the supervision of Daniel Galera Bernabé presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on September 02, 2016.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: October 02, 2018.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: November 02, 2018.

Maria Gisela Lafanjeira
Profa. Ass. Dra. Maria Gisela Lafanjeira
Coordenadora da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 - Vila Mendonça - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br

Anexo B

Brain, Behavior, and Immunity



Editor-in-Chief: K.W. Kelley

Impact Factor: 5.964

ISSN: 0889-1591

Qualis CAPES: A1

Guide for authors: <https://www.elsevier.com/journals/brain-behavior-and-immunity/0889-1591/guide-for-authors>