

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta
tese será disponibilizado somente
a partir de 29/09/2022.



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA-UNESP)

Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Área de Concentração: Estomatologia



VITOR BONETTI VALENTE

**Stress hormones promote DNA damage
in human oral keratinocytes**

Araçatuba - SP

2020

VITOR BONETTI VALENTE

**Stress hormones promote DNA damage
In human oral keratinocytes**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, para obtenção do título de ‘Doutor em Odontologia. Área de Concentração: Estomatologia.

Orientador: Prof. Ass. Dr. Daniel Galera Bernabé.

Coorientadora: Profa. Tit. Dra. Sandra Helena Penha Oliveira

Coorientadora: Profa. Assoc. Dra. Gisele Zoccal Mingoti

Araçatuba - SP

2020

Catálogo-na-Publicação
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

V154s Valente, Vitor Bonetti.
Stress hormones promote DNA damage in human oral
keratinocytes / Vitor Bonetti Valente. - Araçatuba, 2020
66 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Daniel Galera Bernabé
Coorientadora: Profa. Sandra Helena Penha de Oliveira
Coorientadora: Profa. Gisele Zoccal Mingoti

1. Estresse psicológico 2. Norepinefrina 3. Glucocorticoide
4. Dano no DNA 5. Apoptose 6. Queratinócitos 7. Neoplasias
bucais 8. Neoplasias de cabeça e pescoço I. T.

Black D64
CDD 617.632

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Dedicatoria

À **Deus**, por todo aprendizado conquistado;

À **minha família**, pela oportunidade, sustentação e suporte;

À **sociedade brasileira**, pelo investimento realizado.

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por todo amparo e cuidados designados a mim e à minha família. Que a **Sua** paz continue iluminando nossos caminhos sempre com muita saúde, trabalho e serenidade. Muito obrigado por me guiar em todos os momentos, intuir nas minhas escolhas e conferir a força necessária para transpor as adversidades e atingir as minhas metas.

Aos meus pais, **Vitor Valente** e **Maria Neusa**, pela educação e formação humana e profissional que me proporcionaram. Muito obrigado pelo persistente suporte e incansáveis esforços, que me ajudaram a conquistar cada objetivo que alcancei. O apoio de vocês e o orgulho materializado no brilho dos olhos de cada um me dá a segurança de que a conquista valeu cada gota do nosso suor. E foi, sim, algo que conquistamos juntos. Obrigado meus pais, por serem o meu porto seguro nesta jornada. Que venham as próximas conquistas. Gratidão eterna por tudo. Amo vocês.

Às minhas irmãs caçulas que tanto amo, **Ana Carolina** e **Ana Julia**, pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida. Muito obrigado pelos sorrisos contagiantes e pelos carinhosos abraços que sempre recebo de vocês duas ao chegar em casa. Obrigado minhas irmãs, por compartilharmos diversas lembranças especiais da nossa família. Agradeço por compreenderem a minha ausência física ao longo desses anos dedicados à academia. Estaremos sempre juntos apesar da distância. Amo vocês.

Aos meus **avós** maternos e paternos, **tios**, **tias**, **primos** e **primas**, todos sempre dispostos a me apoiar na concretização de cada um dos meus sonhos e objetivos. Muito obrigado por acompanharem com carinho minha trajetória.

À minha namorada **Giseli Mitsuy Kayahara**, pelo *importantíssimo* apoio, paciência e compreensão, confiança e incentivo, carinho e amor. Muito obrigado por estar presente em todos os momentos da minha vida e contribuir para o meu crescimento profissional e pessoal. Obrigado por compartilhar esta longa jornada comigo, vivenciar os desafios mais exigentes e comemorar com o melhor sorriso – e *mais lindo* – nossas merecidas vitórias. Obrigado pelo sólido amparo diante das dificuldades e pelos conselhos constantes ao longo deste tortuoso percurso. Você é uma pessoa incrível e muito especial na minha vida. Muito obrigado pela nobre contribuição neste estudo. Eu amo você!

À família **Kayahara**, por me acolher como filho. Obrigado pelos domingos alegres que constantemente desfrutamos juntos e pela preocupação de sempre com meu bem-estar. Muito obrigado por se importarem tanto comigo. Vocês são modelos e grandes exemplos de união, lealdade, fraternidade e honestidade. Vocês são parte da minha família! Gratidão.

Ao meu orientador e grande amigo, Prof. Dr. **Daniel Galera Bernabé**, pela sua nobre contribuição para minha formação profissional, acadêmica e pessoal. Muito obrigado por todas as oportunidades, conselhos, paciência, compreensão e mentoria. Agradeço pela nossa amizade e por toda confiança creditada ao meu trabalho. Obrigado por compartilhar comigo sua experiência e conhecimento, por todos os estímulos ao aprendizado constante e pelo suporte necessário para que pudéssemos desenvolver este trabalho. O senhor é um grande exemplo de ética, honestidade e de como tornar o *ideal* de vida como pesquisador em uma paixão inspiradora na carreira do professor universitário. Grande honra em tê-lo como orientador. Obrigado por tudo, mestre.

À minha coorientadora, Profa. Dra. **Sandra Helena Penha Oliveira**, pela contribuição designada à minha formação como pesquisador. Obrigado por toda ajuda, amizade, confiança, estímulos e disponibilidade. Muito obrigado por ceder generosamente seu laboratório para que este estudo pudesse ser concretizado. Agradeço pelo suporte laboratorial que permitiu o cultivo das nossas células e a realização de boa parte dos experimentos. Obrigado pela grande parceria e por toda colaboração nos nossos trabalhos.

À minha coorientadora, Profa. Dra. **Gisele Zocal Mingoti**, por contribuir, substancialmente, para o meu aprimoramento técnico-científico em laboratório. Muito obrigado por ceder gentilmente todas as instalações para que pudéssemos desenvolver este trabalho. Sem sua nobre contribuição, não teria aprendido, com a mesma propriedade, as difíceis técnicas relacionadas a avaliação de danos no DNA. Obrigado pelo conhecimento compartilhado, pelo convívio ao longo deste ciclo e por todos os momentos de descontração.

À Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FOA – UNESP), representada pelos amigos e companheiros, diretor Prof. Dr. **Glauco Issamu Miyahara** e vice-diretor Prof. Dr. **Alberto Carlos Botazzo Delbem**, pela oportunidade de aprender e de me desenvolver como docente e pesquisador na área de Estomatologia em uma renomada instituição de ensino superior.

Ao Centro de Oncologia Bucal (COB) da FOA – UNESP, supervisionado pelo Prof. Dr. **Daniel Galera Bernabé** e vice-supervisionado pela Profa. Dra. **Daniela Micheline dos Santos** pela oportunidade singular de conhecer pessoas especiais e do convívio próximo junto aos pacientes oncológicos. Gratidão pela riquíssima experiência humanística e pelo aprendizado adquirido. Parabéns aos supervisores

pela gestão impecável e por manterem viva nossa querida unidade auxiliar na elite da extensão universitária unespiana. Aos funcionários do COB, **Adriana de Paula (Dri!)**, **Anne Cocato**, **Daniene Ribeiro**, **Francisco Collado**, **Gabrielle Duarte**, **Regiane Nogueira** e **Sebastião Neto** pela amizade, convívio, disponibilidade e importante contribuição com nossas pesquisas. Muito obrigado por todo aprendizado que construímos em conjunto. Parabéns pelo atendimento especializado, humano e indispensável realizado em equipe.

À ex-secretária do COB, **Jane Fátima (Janinha!)**, atualmente trabalhando na Seção Técnica de Triagem da FOA – UNESP, pelo acolhimento e carinho que recebemos ao longo dos anos. Muito obrigado por tornar nossos dias animados com seu sorriso contagiante e bem-humorado.

Ao Núcleo de Pesquisa em Psicossomática (NPP), liderado pelo Prof. Dr. **Daniel Galera Bernabé**, por todo suporte científico designado à preparação do projeto de pesquisa, interpretação dos dados obtidos e discussão dos resultados deste estudo. Obrigado aos participantes, **docentes** e **funcionários** associados ao COB e **alunos** de pós-graduação e de graduação que participam diretamente das reuniões periódicas do NPP. Tenho muito orgulho em fazer parte do núcleo, que abraça nosso querido Laboratório de Psiconeuroimunologia onde passei os anos do Doutorado estruturando, sempre em equipe, este estudo.

Ao meu grande amigo, Prof. Dr. **Glauco Issamu Miyahara**, professor da disciplina de Estomatologia, ex-supervisor do COB e diretor da FOA – UNESP pela sua contribuição para o meu crescimento pessoal, profissional e acadêmico. O senhor é um grande exemplo de ética e honestidade. Tenho-o como espelho de dedicação impecável a academia e aos valores da família. Muito obrigado por toda força e apoio, por nos guiar e aconselhar nas tomadas de decisões difíceis e até

mesmo críticas. Parabéns pela responsável e competente gestão à frente da FOA, que está muito bem cuidada e representada nas suas mãos. Sem a sua ajuda, teríamos muita dificuldade para desenvolver nossas atividades no COB e no NPP.

Ao grande amigo, Prof. Dr. **Éder Ricardo Biasoli**, professor da disciplina de Estomatologia, ex-supervisor do COB e ex-vice diretor da FOA – UNESP pela contribuição conferida à minha formação acadêmica. Muito obrigado pela força, apoio, parceria, disponibilidade, estímulo, conversas e conselhos. O senhor é um grande exemplo de honestidade e ética e a irreverência é a sua marca registrada. Obrigado pela convivência, por toda ajuda e por tornar nossos dias mais alegres e descontraídos.

À ex-funcionária da disciplina de Estomatologia, atualmente aposentada, **Marli dos Santos**, pela força e colaboração com a clínica de graduação ao longo dos anos. Sua ajuda foi fundamental para que pudéssemos desenvolver um bom trabalho por lá. Muito obrigado pelo apoio, incentivo e pela torcida.

Ao Prof. Dr. **André Luiz Fraga Briso**, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, pela amizade e por todo apoio e suporte necessário para que eu pudesse cumprir as exigências do Programa e concluir meu curso. Aos professores da Área de Concentração em Estomatologia, Prof. Dr. **Daniel Galera Bernabé** (coordenador da Área), Prof. Dr. **Glauco Issamu Miyahara** e Profa. Dra. **Kellen Cristine Tjioe** pela confiança e pela oportunidade de realizar meu curso de pós-graduação em uma renomada instituição de ensino superior. Agradeço à Profa. Dra. **Kellen Cristine Tjioe** pelas dicas e por ceder gentilmente alíquota de anticorpo anti- γ H2AX para investigação de danos no DNA. Obrigado, professora, pela disponibilidade e supervisão durante o meu treinamento técnico no laboratório de cultura de células.

À grande amiga Profa. Dra. **Aline Satie Takamiya (Alininha!)**, professora da disciplina de Clínica Integrada, pela sua contribuição para o meu crescimento pessoal e acadêmico. Muito obrigado pela força, apoio, incentivo e pelos sábios conselhos. Agradeço por todo auxílio em todos momentos que precisei, tanto no âmbito pessoal quanto no profissional. Você é uma pessoa incrível e iluminada e um grande exemplo de perseverança, honestidade e ética. Gratidão pelo apoio incondicional de sempre.

Às funcionárias da Seção de Pós-Graduação da FOA - UNESP, **Valéria Cristiane** e **Lilian** pelas orientações precisas e toda colaboração prestada com eficiência e dedicação. Muito obrigado pela disponibilidade e solicitude ao longo dos anos. Vocês são imprescindíveis para que os alunos alcancem seus títulos e nosso Programa de Pós-Graduação em Odontologia funcione da melhor forma.

Aos funcionários da Biblioteca da FOA – UNESP, em especial, **Cláudio** e **Ana Cláudia**, pelas orientações precisas, atenção, disponibilidade e contribuição com a formatação desta tese. Muito obrigado.

Aos queridos amigos e professores das disciplinas de Patologia Geral e Bucal da FOA - UNESP, Profa. Dra. **Ana Maria Pires Soubhia**, Prof. Dr. **Marcelo Macedo Crivelini**, Profa. Dra. **Cristiane Furuse** e Profa. Dra. **Renata Callestini** e da disciplina de Radiologia também da FOA - UNESP, Profa. Dra. **Leda Maria Salzedas Pescinini**, pelo convívio próximo, aprendizado pessoal e acadêmico, dicas e conselhos importantes e parcerias de trabalho. Muito obrigado por todo apoio, força e incentivos ao longo desta jornada. Gratidão e admiração por cada um de vocês.

Aos queridos amigos e professores da disciplina de Microbiologia da FOA – UNESP, Profa. Dra. **Ana Cláudia Okamoto** e Prof. Dr. **Elerson Gaetti Jardim**

Filho, pela convivência e incentivo ao durante toda minha caminhada neste ciclo de pós-graduação. Muito obrigado pelo apoio de vocês.

Aos servidores técnicos-administrativos do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, **Giseli Mitsuy Kayahara** e **Robson Varlei Ranieri**, pelo entusiasmo, alegria e disposição que me recebem no departamento. Muito obrigado por toda ajuda, colaboração e conversas sempre regadas com um bom café.

Ao ex-servidor técnico administrativo das disciplinas de Patologia Geral e Bucal, atualmente aposentado, **José Marcelo Tramarin (Marcelinho!)**, por ter me acolhido e ajudado com tanta paciência, carinho e alegria no Laboratório de Patologia. Muito obrigado pelo convívio que tivemos juntos ao longo dos anos.

À aluna de graduação, **Diovana de Melo Cardoso**, estagiária de iniciação científica, por ser o meu “braço-direito” no laboratório. Muito obrigado pela ajuda e por me acompanhar fielmente na execução dos experimentos deste estudo e de tantas outras atividades acadêmicas. Destaco seu exímio comprometimento e exemplar responsabilidade na condução de toda proposta que lhe oferecemos. Parabéns pela dedicação, espírito de equipe e pelo conhecimento que você vem conquistando ao longo da graduação. Obrigado pela amizade, parceria, convívio e paciência que sempre teve conosco. Você vai longe!

À médica-veterinária e pós-graduanda, **Giovana Barros Nunes**, por toda ajuda e assessoria na condução dos experimentos deste estudo. Muito obrigado pela colaboração e pela paciência de nos ensinar as técnicas para avaliação de danos no DNA e apoptose. Sua parceria foi fundamental para que pudéssemos deslanchar com os experimentos nesta reta final. Obrigado pela amizade, força, incentivo e por todas as conversas no departamento, acompanhadas com o café

cheiroso que trazia. Gratidão por ter-nos acolhido e pela disponibilidade em nos socorrer sempre que precisávamos.

À médica veterinária e ex-aluna de mestrado, **Luana Teixeira Rodrigues Rossi**, pelo auxílio e por toda ajuda quando comecei a frequentar o laboratório. Muito obrigado pela paciência, convivência, atenção e disponibilidade. Parabéns pelo nascimento do filho e pela família que constituiu.

Ao servidor técnico-administrativo do Departamento de Produção e Saúde Animal da FMVA - UNESP, **Alexandre José Teixeira**, pelo zelo e todo cuidado de sempre ao me receber no laboratório. Obrigado pela disposição em ajudar e a colaborar conosco para o bom andamento das nossas pesquisas.

A todos amigos, atuais companheiros de pós-graduação, **Bruna Sarafim, Daniela Bastos, Jéssica Figueira, Saygo Tomo, Tamara Castro, Maria Clara, Ana Daniela, Daniela Cantieri, Gabriela Lopes, Felipe Yudi, Sabrina Tfaile e Victor Balera**. Muito obrigado pela convivência de vocês ao longo desta jornada, que nos uniu em diversos momentos alegres e de dificuldades. Agradeço a cada um de vocês pelo apoio, incentivo e colaboração em todo o percurso desta etapa acadêmica. Obrigado pelo aprendizado em conjunto e pelo crescimento pessoal, profissional e acadêmico. A todos amigos, ex-companheiros de pós-graduação, **Gláucia Soares, Lígia Lavezo, Neliana Salomão, Maurício Fabiano** (*in memoriam*), **Aneliza Moraes, Ingrid Santos e Ketelin Dal Pra e Stephanye Biss** pela convivência ao longo do Mestrado e/ou do Doutorado. Muito obrigado por todos os momentos em conjunto, que nos trouxeram amadurecimento e oportunidades especiais de crescimento pessoal e profissional. Agradeço pelo apoio e incentivo de vocês ao longo do percurso, o que tornou minha caminhada mais prazerosa.

À minha **amiga-irmã** e ex-companheira de pós-graduação, **Flávia Verza**, pela força, carinho, atenção e apoio de sempre. Muito obrigado por ter feito parte da minha história na pós-graduação. Jamais esquecerei de todo suporte e ajuda para que eu pudesse chegar onde estou hoje. Gratidão por tudo.

Às alunas de graduação, **Laura Coachman** e **Rosani Belzunces**, por ter tido a oportunidade de acompanhá-las durante o estágio de iniciação científica, mesmo que por um breve período. Obrigado pelo aprendizado e pelos momentos que passamos juntos.

Aos cirurgiões-dentistas, ex-alunos de graduação, **Karla Pereira**, **Heitor Cecílio**, **Fábio Posse**, **Jéssica Bugiga**, **Camila Moura**, **Lia Kobayashi**, **Thiago Amorim**, **José Neto**, **Isadora Victorino**, **João Pedro**, **Karina Andrade**, **Lucas Seraphim** e **Camila Guerra** pela amizade que cultivamos até hoje. Obrigado por todo aprendizado pessoal, profissional e acadêmico que desenvolvemos juntos ao longo desses anos. Foi um prazer ter contribuído para a formação de vocês, tenha sido no ensino, na pesquisa ou na extensão universitária. Aos cirurgiões-dentistas, **Fábio Posse**, **Ana Daniela**, **Daniela Cantieri** e **Felipe Yudi**, à época, monitores da disciplina de Estomatologia, por terem me auxiliado na condução da clínica da graduação durante o meu estágio docente. A ajuda e o suporte que vocês me deram foi fundamental para que pudéssemos desenvolver um exímio trabalho junto aos alunos e aos pacientes. Muito obrigado.

A todos os amigos da Turma 84, formados pela Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr – UNESP), em especial, **Welton Arita**, **Tulio Morandin**, **Rafael Piai**, **Vitor Racca** e **Sabrina Neri**, por todos os momentos e lembranças de tudo que vivemos juntos na graduação e que ficarão na minha memória para sempre. Sem dúvida, foi um período muito especial da minha vida. Obrigado por terem feito parte

dela. A todos os professores da FOAr – UNESP, em especial, das disciplinas de Diagnóstico Bucal e Estomatologia, Profa. Dra. **Mirian Onofre**, Profa. Dra. **Cláudia Navarro**, Profa. Dra. **Elaine Sgavioli** e Profa. Dra. **Andreia Bufalino** pela forte influência e contribuição para minha formação profissional e acadêmica. Obrigado pela amizade, apoio, incentivo e ferramentas necessárias para que eu pudesse desenvolver um sólido aprendizado na área clínica durante o curso de graduação. À Profa. Dra. **Cláudia Navarro**, minha ex-orientadora nas disciplinas, com quem pude desenvolver treinamento técnico, iniciação científica e meu trabalho de conclusão de curso (TCC). Muito obrigado por todos os anos de convivência, pelo aprendizado e estímulos para seguir na área acadêmica.

Aos meus grandes amigos de infância, **Leandro Pippa**, **Pedro Henrique** e **Felipe Matioli**. Muito obrigado por acompanharem praticamente toda a minha trajetória e com ela o meu amadurecimento e crescimento pessoal e profissional. Agradeço, por me apoiarem em todas as decisões e por estarem presentes na minha vida desde o princípio. Tenho imenso carinho e gratidão por vocês.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, pelo apoio financeiro concedido por meio de uma bolsa de estudos quando ingressei no curso de Doutorado.

Ao Processo nº 2017/07784-8, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro concedido para o desenvolvimento desta pesquisa.

A todas as pessoas que fizeram parte da minha trajetória até aqui e que, direta ou indiretamente, contribuíram para que este momento acontecesse, deixo registrado a minha eterna gratidão.

De coração, muito obrigado!

Epígrafe

“Tente uma, duas, três vezes e se possível tente a quarta, a quinta e quantas vezes for necessário. Só não desista nas primeiras tentativas, a persistência é amiga da conquista. Se você quer chegar onde a maioria não chega, faça o que a maioria não faz.”

– Bill Gates

“Daqui a 20 anos você estará mais decepcionado pelas coisas que você não fez, do que pelas que fez. Então, jogue fora suas amarras, navegue para longe do porto seguro, pegue os ventos em suas velas. Explore, sonhe, descubra.”

– Mark Twain

Resumo

Valente VB. Hormônios do estresse promovem dano no DNA de queratinócitos humanos de boca [tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2020.

RESUMO

O estresse crônico aumenta os níveis sistêmicos dos hormônios do estresse norepinefrina e cortisol. Assim como o carcinógeno específico do tabaco NNK (4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona), estes hormônios podem induzir danos expressivos no DNA, o que contribui para o desenvolvimento do câncer. No entanto, é desconhecido se os hormônios do estresse possuem efeitos genotóxicos em queratinócitos de boca. Este estudo investigou os efeitos dos hormônios do estresse sobre o dano no DNA de uma linhagem celular de queratinócitos humanos de boca (NOK-SI). Células NOK-SI estimuladas com norepinefrina ou cortisol apresentaram maior dano no DNA que as células não tratadas. O dano induzido pela norepinefrina foi revertido pelo pré-tratamento das células com um beta-bloqueador. Células tratadas com NNK combinado à norepinefrina apresentaram níveis reduzidos das caspases 3 e 7. O cortisol também reduziu a atividade das enzimas pro-apoptóticas em relação às células não estimuladas. O dano no DNA promovido pelo NNK e cortisol e pela combinação de ambos levou ao acúmulo de γ H2AX intracelular. Os efeitos causados pelo NNK e cortisol foram bloqueados com propranolol e com o antagonista do receptor de glicocorticoide RU486, respectivamente. As quebras no DNA induzidas pela norepinefrina, na presença ou ausência de NNK, resultaram em maiores níveis celulares de 8OHdG. Este efeito também foi induzido via receptores beta-adrenérgicos. Os hormônios do estresse induzem danos no DNA de queratinócitos de boca e poderiam contribuir para a carcinogênese bucal.

Palavras-chave: Estresse Psicológico. Norepinefrina. Glucocorticoide. Dano no DNA. Apoptose. Queratinócitos. Neoplasias Bucais. Câncer de Boca. Neoplasias de Cabeça e Pescoço. Câncer de Cabeça e Pescoço. Câncer. Biomarcadores. Tumorigênese. Carcinogênese.

Abstract

Valente VB. Stress hormones promote DNA damage in human oral keratinocytes [thesis]. Araçatuba: UNESP - São Paulo State University; 2020.

ABSTRACT

Chronic stress increases the systemic levels of stress hormones norepinephrine and cortisol. As well tobacco-specific carcinogen NNK (4-(methylnitrosamine)-1-(3-pyridyl)-1-butanone), they can induce expressive DNA damage contributing to the cancer development. However, it is unknown whether stress hormones have genotoxic effects in oral keratinocytes. This study investigated the effects of stress hormones on DNA damage in a human oral keratinocyte cell line (NOK-SI). NOK-SI cells stimulated with norepinephrine or cortisol showed higher DNA damage than untreated cells. Norepinephrine-induced DNA damage was reversed by pre-treatment with beta-adrenergic blocker propranolol. Cells treated with NNK combined to norepinephrine displayed reduced levels of caspases 3 and 7. Cortisol also reduced the activity of pro-apoptotic enzymes. DNA damage promoted by NNK or cortisol and carcinogen combined to the hormone led to intracellular γ H2AX accumulation. The effects caused by NNK and cortisol were abolished by propranolol and glucocorticoid receptor antagonist RU486, respectively. DNA breaks induced by norepinephrine in the presence or absence of NNK resulted in higher 8OHdG cellular levels. This effect was also induced through beta-adrenergic receptors. Stress hormones induce DNA damage of oral keratinocytes and could contribute to oral carcinogenesis.

Keywords: Psychological Stress. Norepinephrine. Glucocorticoid. DNA Damage. Apoptosis. Keratinocytes. Oral Neoplasms. Oral Cancer. Head and Neck Neoplasms. Head and Neck Cancer. Cancer, Biomarkers. Tumorigenesis. Carcinogenesis.

Lísta de figuras

LISTA DE FIGURAS

Figure 1. Stress hormones promote DNA damage in oral keratinocytes. (A) Norepinephrine increased the DNA damage in oral epithelial cells and this effect was abolished by the non-selective beta-blocker propranolol. (B) Cortisol increased the DNA fragmentation of oral keratinocytes. The results are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Upper- and lower cases equal letters indicate a statistically significant difference ($p < 0.05$). NNK = 4 (N-metil-N-nitrosamine)-1-(3-piridil)-butano-1-one). NE = norepinephrine. PROP = propranolol. CORT = cortisol.

Figure 2. Effects of tobacco-specific nitrosamine NNK and norepinephrine on the activity of the caspases 3 and 7. (A) Control. (B) NNK. (C) Norepinephrine. (D) NNK and norepinephrine. (E) NNK and propranolol. (F) Norepinephrine and propranolol. (G) NNK, norepinephrine and propranolol. (H) Combined treatment of NNK with norepinephrine inhibited the activity of the pro-apoptotic enzymes. This effect was not abolished by the beta-adrenergic blocker propranolol. The results are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Upper- and lower cases equal letters indicate a statistically significant difference ($p < 0.0001$). NNK = 4 (N-metil-N-nitrosamine)-1-(3-piridil)-butano-1-one). NE = norepinephrine. PROP = propranolol.

Figure 3. Cortisol inhibits the activity of caspases 3 and 7. (A) Control. (B) Cortisol. (C) NNK and cortisol. (D) Cortisol and RU486. (E) NNK, cortisol and RU486. (F) Cortisol inhibited the activity of pro-apoptotic enzymes. This effect was not abolished by the glucocorticoid receptor blocker RU486. The results are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Upper- and lower cases equal letters indicate a statistically significant difference ($p < 0.0001$). NNK = 4 (N-metil-N-nitrosamine)-1-(3-piridil)-butano-1-one). CORT = cortisol.

Figure 4. Exposure to the NNK and norepinephrine and γ H2AX nuclear expression in oral keratinocytes. (A) Control. (B) NNK. (C) Norepinephrine. (D) NNK and norepinephrine. (E) NNK and propranolol. (F) Norepinephrine and propranolol. (G) NNK, norepinephrine and propranolol. (H) NNK increased the γ H2AX nuclear expression levels. Beta-blocker propranolol inhibited the increased DNA damage caused by the carcinogen. The results are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Upper- and lower cases equal letters indicate a

statistically significant difference ($p < 0.0001$). NNK = 4 (N-metil-N-nitrosamine)-1-(3-piridil)-butano-1-one). NE = norepinephrine. PROP = propranolol.

Figure 5. Cortisol increased the γ H2AX nuclear expression in oral epithelial cells. (A) Control. (B) Cortisol. (C) NNK and cortisol. (D) Cortisol and RU486. (E) NNK, cortisol and RU486. (F) Cortisol increased the γ H2AX nuclear expression levels in the presence or absence of carcinogen NNK. Glucocorticoid receptor blocker RU486 inhibited the increased DNA damage caused by the hormone. The results are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Upper- and lower cases equal letters indicate a statistically significant difference ($p < 0.0001$). NNK = 4 (N-metil-N-nitrosamine)-1-(3-piridil)-butano-1-one). CORT = cortisol.

Figure 6. Effects of stress hormones on oxidative DNA damage in oral epithelial cells. (A) Norepinephrine up-regulated the 8OHdG levels in the presence or absence of carcinogen NNK. Beta-blocker propranolol inhibited the increased oxidative DNA damage caused by the hormone combined to NNK. (B) Cortisol did not change the 8OHdG levels secreted by the NOK-SI cells. The results are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Upper- and lower cases equal letters indicate a statistically significant difference ($p < 0.05$). NNK = 4 (N-metil-N-nitrosamine)-1-(3-piridil)-butano-1-one). NE = norepinefrina. PROP = propranolol. CORT = cortisol.

Supplementary Fig. 1. Comet assay (A-E, 24h-exposure; F-J, 72h-exposure). (A,F) Control. (B,G) NNK. (C,H) Norepinephrine. (D,I) NNK and norepinephrine. (E) Norepinephrine induced DNA damage in the oral epithelial cells. (J) NNK in the presence or absence of norepinephrine promoted an expressive DNA damage in the NOK-SI cells. The results are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Upper- and lower cases equal letters indicate a statistically significant difference ($p < 0.05$). NNK = 4 (N-metil-N-nitrosamine)-1-(3-piridil)-butano-1-one). NE = norepinephrine.

Lísta de abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

3T3 - 3-day transfer inoculum 3×10^5 cells
8OHdG - 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine
AKT - Protein kinase B
ANOVA - Analysis of variance
AP1 - Activator protein 1
ATF - Activating transcription factor
BCL-2 - B-cell lymphoma 2
BSA - Bovine serum albumin
cAMP - Cyclic 3'-5' adenosine monophosphate
CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CORT - Cortisol
CREB - cAMP response element binding protein
DMEM - Dulbecco modified eagle medium
DNA - Deoxyribonucleic acid
ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assay
EPAC - Exchange protein activated by adenylyl cyclase
ERK - Extracellular signal-regulated kinase
ETS - Erythroblast transformation specific
FAPESP - São Paulo Research Foundation
FBS - Fetal bovine serum
HCl - Hydrogen chloride
MAP - Mitogen-activated protein
MDM2 - Mouse double minute 2 homolog
MEK - Mitogen-activated protein kinase
MPK1 - Mitogen-activated protein kinase 1
Na₂EDTA - Ethylenediaminetetraacetic acid disodium
NaCl - Sodium chloride
NE - Norepinephrine
NNK - 4-(methylnitrosamine)-1-(3-pyridyl)-1-butanone
NOK-SI - Normal oral keratinocyte-spontaneously immortalized
PBS - Phosphate-buffered saline
PI3K - Phosphoinositide 3-kinase

PKA - Protein kinase A

PROP - Propranolol

PVA - Polyvinyl alcohol

Raf - Rapidly accelerated fibrosarcoma

ROS - Reactive oxygen species

SEM - Standard error of the mean

SGK1 - Serum and glucocorticoid-regulated kinase 1

STAT3 - Signal transducer and activator of transcription 3

TUNEL - Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labelling

UNESP - São Paulo State University

γ H2AX - H2A histone family member X

SUMÁRIO

1 INTRODUCTION.....	30
2 RESULTS.....	33
2.1 Norepinephrine and cortisol induce DNA damage in oral epithelial cells.....	33
2.2 Cortisol inhibits the activity of apoptotic enzymes in oral keratinocytes.....	35
2.3 DNA damage induced by tobacco-derived nitrosamine NNK and cortisol in oral keratinocytes is associated with intracellular γ H2AX accumulation.....	37
2.4 Norepinephrine increases the 8OHdG levels in the presence or absence of carcinogen NNK in oral keratinocytes	39
3 DISCUSSION	42
4 MATERIAL AND METHODS	49
4.1 Cells and culture conditions.....	49
4.2 Carcinogen and hormone treatment.....	49
4.3 Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labelling (TUNEL assay)	50
4.4 Single cell gel electrophoresis (comet assay).....	50
4.5 Activity of caspases-3 and -7.....	51
4.6 Measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8OHdG) content	51
4.7 Immunoexpression of phospho-H2AX (γ H2AX)	52
4.8 Statistical analysis	52
REFERENCES.....	56
Anexo A - Normas de publicação da Scientific Reports	64

Stress hormones promote DNA damage in human oral keratinocytes¹

Vitor Bonetti Valente¹, Diovana de Melo Cardoso¹, Giseli Mitsuy Kayahara^{1,2}, Giovana Barros Nunes³, Kellen Cristine Tjioe^{1,4}; Éder Ricardo Biasoli¹, Glauco Issamu Miyahara^{1,2}, Gisele Zoccal Mingoti³, Sandra Helena Penha de Oliveira^{1,4}, Daniel Galera Bernabé^{1,2,*}

¹Psychoneuroimmunology Laboratory, Psychosomatic Research Center, Oral Oncology Center, São Paulo State University (Unesp), School of Dentistry, 1193 José Bonifácio St, SP 15050-015, Araçatuba, São Paulo, Brazil

²Department of Diagnosis and Surgery, São Paulo State University (Unesp), School of Dentistry, 1193 José Bonifácio St, SP 15050-015, Araçatuba, São Paulo, Brazil

³Laboratory of Reproductive Physiology, Department of Animal Health, São Paulo State University (Unesp), School of Veterinary Medicine, 793 Clovis Pestana St, SP 16050-680, Araçatuba, São Paulo, Brazil.

⁴Laboratory of Immunopharmacology, Department of Basic Sciences, São Paulo State University (Unesp), School of Dentistry, 1193 José Bonifácio St, SP 15050-015, Araçatuba, São Paulo, Brazil

***Corresponding author:**

Dr. Daniel Galera Bernabé

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

Telephone numbers: +55 18 36363268 / 36363275

E-mail address: daniel.bernabe@unesp.br

¹Formatted according to the rules of Scientific Reports. Online ISSN 2045-2322

Introduction

1 INTRODUCTION

Psychological stress up-regulates the circulating levels of stress hormones norepinephrine and cortisol¹. Exposure to these hormones released from chronic stress response has been associated to an enhanced risk of developing diseases such as cancer^{1,2}. In somatic cells, norepinephrine and cortisol may induce DNA damage through the activation of beta-adrenergic and glucocorticoid receptors, respectively^{3,4}. Both mechanisms trigger similar effects to those produced by the tobacco smoke carcinogens^{5,6}. A significant damage in the integrity of DNA may lead to genome mutations and affect oncogenic mechanisms predisposing to cell malignant transformation^{2,5}.

Chronic stress and stress hormones may cause a significant DNA damage accompanied by a higher production of phosphorylated histone H2AX (γ H2AX)^{7,8} and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8OHdG)^{2,9}. Both molecules are considered mutagenic biomarkers of the DNA damage and significantly enhance the occurrence of tumorigenic mutations into the genome of somatic cells, which may become malignant^{2,10}. Moreover, stress hormones can inhibit the apoptosis of somatic cells^{11,12} allowing their replication with DNA damage. This inhibition is also considered another crucial mechanism related to the acquisition of malignant phenotype^{2,3}. The activity of caspases is measured to assess cell apoptosis and may become downregulated after chronic exposure to the stress hormones and carcinogenic agents^{13,14}.

Oral cancer represents the sixth most common malignancy worldwide and its occurrence has been widely associated to the tobacco smoking¹⁵. In addition, chronic stress and stress hormones have also been investigated in oral cancer patients and preclinical models of the disease¹⁶⁻²⁰. We recently demonstrated that biobehavioral factors are related to increased circulating norepinephrine levels in these patients.¹⁶ In an orthotopic model, chronic stress up-regulated the plasma levels of catecholamines and glucocorticoids, which would contribute to increase tumor size and invasiveness¹⁷. In rats underwent chemical carcinogenesis, we showed that the stress hormones levels in the normal microenvironment predict the risk of developing oral cancer¹⁸. An expressive DNA damage caused by the chemical substances such

as nicotine and tobacco-specific nitrosamines may be considered one of the first molecular events for oral cancer occurrence⁵. However, it remains unknown whether stress hormones have genotoxic effects in oral epithelial cells.

In the current study, we tested the hypothesis that the exposure of an oral keratinocyte cell line (NOK-SI) to the stress hormones in the presence or absence of chemical carcinogen NNK (4-(methylnitrosamine)-1-(3-pyridyl)-1-butanone), a tobacco-specific nitrosamine, would induce DNA damage. In addition, these cells were also evaluated for the production of molecules associated to DNA damage and apoptosis.

REFERENCES

1. Cohen, S., Janicki-Deverts, D. & Miller, G. E. Psychological stress and disease. *JAMA*. **298**, 1685-1687 (2007).
2. Jenkins, F. J., Van Houten, B. & Bovbjerg, D. H. Effects on DNA damage and/or repair processes as biological mechanisms linking psychological stress to cancer risk. *J. Appl. Biobehav. Res.* **19**, 3-23 (2014).
3. Flint, M. S., Baum, A., Chambers, W. H. & Jenkins, F. J. Induction of DNA damage, alteration of DNA repair and transcriptional activation by stress hormones. *Psychoneuroendocrinology*. **32**, 470-479 (2007).
4. Flint, M. S. *et al.* Chronic exposure to stress hormones promotes transformation and tumorigenicity of 3T3 mouse fibroblasts. *Stress*. **16**, 114-121 (2013).
5. Pfeifer, G. P. *et al.* Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene*. **21**, 7435-7451 (2002).
6. Schuller, H. M. Nitrosamines as nicotinic receptor ligands. *Life Sci*. **80**, 2274-2280 (2007).
7. Hara, M. R. *et al.* A stress response pathway regulates DNA damage through β 2-adrenoreceptors and β -arrestin-1. *Nature*. **477**, 349-353 (2011).
8. Flaherty, R. L. *et al.* Glucocorticoids induce production of reactive oxygen species/reactive nitrogen species and DNA damage through an iNOS mediated pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res.* **19**, 35 (2017).

9. Adachi, S., Kawamura, K. & Takemoto, K. Oxidative damage of nuclear DNA in liver of rats exposed to psychological stress. *Cancer Res.* **53**, 4153-4155 (1993).
10. Podhorecka, M., Skladanowski, A. & Bozko, P. H2AX phosphorylation: its role in DNA damage response and cancer therapy. *J. Nucleic Acids.* **2010**, 920161 (2010).
11. Kong, Y. *et al.* Norepinephrine protects against apoptosis of mesenchymal stem cells induced by high glucose. *J. Cell. Physiol.* **234**, 20801-20815 (2019).
12. Wu, W. *et al.* Microarray analysis reveals glucocorticoid-regulated survival genes that are associated with inhibition of apoptosis in breast epithelial cells. *Cancer Res.* **64**, 1757-1764 (2004).
13. Lu, J. Y. D. *et al.* The neuroprotective effect of nicotine in Parkinson's disease models is associated with inhibiting PARP-1 and caspase-3 cleavage. *PeerJ.* **5**, e3933 (2017).
14. Pereira, R. M., Delany, A. M. & Canalis, E. Cortisol inhibits the differentiation and apoptosis of osteoblasts in culture. *Bone.* **28**, 484-490 (2001).
15. Warnakulasuriya, S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol.* **45**, 309-316 (2009).
16. Bastos, D. B. *et al.* Circulating catecholamines are associated with biobehavioral factors and anxiety symptoms in head and neck cancer patients. *PLoS One.* **13**, e0202515 (2018).

17. Xie, H. *et al.* Chronic stress promotes oral cancer growth and angiogenesis with increased circulating catecholamine and glucocorticoid levels in a mouse model. *Oral Oncol.* **51**, 991-997 (2015).
18. Valente, V. B. *et al.* Stress hormones concentrations in the normal microenvironment predict risk for chemically induced cancer in rats. *Psychoneuroendocrinology.* **89**, 229-238 (2018).
19. Bernabé, D. G., Tamae, A. C., Biasoli, É. R. & Oliveira, S. H. Stress hormones increase cell proliferation and regulates interleukin-6 secretion in human oral squamous cell carcinoma cells. *Brain Behav. Immun.* **25**, 574-583 (2011).
20. Zhang, B. *et al.* The stress hormone norepinephrine promotes tumor progression through β 2-adrenoreceptors in oral cancer. *Arch. Oral Biol.* **113**, 104712 (2020).
21. Sun, F. *et al.* Adrenergic DNA damage of embryonic pluripotent cells via β 2 receptor signalling. *Sci. Rep.* **5**, 15950 (2015).
22. Hara, M. R., Sachs, B. D., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. Pharmacological blockade of a $\beta(2)$ AR- β -arrestin-1 signaling cascade prevents the accumulation of DNA damage in a behavioral stress model. *Cell Cycle.* **12**, 219-224 (2013).
23. Jang, H. J., Boo, H. J., Lee, H. J., Min, H. Y. & Lee, H. Y. Chronic stress facilitates lung tumorigenesis by promoting exocytosis of IGF2 in lung epithelial cells. *Cancer Res.* **76**, 6607-6619 (2016).
24. Feng, Z. *et al.* Chronic restraint stress attenuates p53 function and promotes tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 7013-7018 (2012).

25. Andersson, D. C. *et al.* Mitochondrial production of reactive oxygen species contributes to the β -adrenergic stimulation of mouse cardiomyocytes. *J. Physiol.* **589**, 1791-1801 (2011).
26. Thakur, A. *et al.* Norepinephrine-induced apoptotic and hypertrophic responses in H9-c2 cardiac myoblasts are characterized by different repertoire of reactive oxygen species generation. *Redox Biol.* **5**, 243-252 (2015).
27. Valavanidis, A., Vlachogianni, T. & Fiotakis, C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): a critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J. Environ. Sci. Health C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* **27**, 120-139 (2009).
28. Bahar, G., Feinmesser, R., Shpitzer, T., Popovtzer, A. & Nagler, R. M. Salivary analysis in oral cancer patients: DNA and protein oxidation, reactive nitrogen species, and antioxidant profile. *Cancer.* **109**, 54-59 (2007).
29. Kaur, J., Politis, C. & Jacobs, R. Salivary 8-hydroxy-2-deoxyguanosine, malondialdehyde, vitamin C, and vitamin E in oral pre-cancer and cancer: diagnostic value and free radical mechanism of action. *Clin. Oral Investig.* **20**, 315-319 (2016).
30. Soares, G. R. *et al.* Protective effects of purple carrot extract (*Daucus carota*) against rat tongue carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. *Med. Oncol.* **35**, 54 (2018).
31. De Moura, C. F. G. *et al.* Evaluation of the chemopreventive activity of grape skin extract using medium-term oral carcinogenesis assay induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. *Anticancer Res.* **39**, 177-182 (2019).

32. Veeravarmal, V., Austin, R. D., Siddavaram, N., Thiruneelakandan, S. & Nassar, M. H. Caspase-3 expression in normal oral epithelium, oral submucous fibrosis and oral squamous cell carcinoma. *J. Oral Maxillofac. Pathol.* **20**, 445–452 (2016).
33. Cole, S. W. & Sood, A. K. Molecular pathways: beta-adrenergic signaling in cancer. *Clin. Cancer Res.* **18**, 1201-1206 (2012).
34. Zhang, X. *et al.* Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 4459-4464 (2005).
35. Hollenhorst, P. C. RAS/ERK pathway transcriptional regulation through ETS/AP-1 binding sites. *Small GTPases.* **3**, 154-158 (2012).
36. Landen, C. N. Jr. *et al.* Neuroendocrine modulation of signal transducer and activator of transcription-3 in ovarian cancer. *Cancer Res.* **67**, 10389-10396 (2007).
37. Shen, Y. *et al.* Involvement of p53 mutation and mismatch repair proteins dysregulation in NNK-induced malignant transformation of human bronchial epithelial cells. *Biomed. Res. Int.* **2014**, 920275 (2014).
38. Arredondo, J., Chernyavsky, A. I. & Grando, S. A. Nicotinic receptors mediate tumorigenic action of tobacco-derived nitrosamines on immortalized oral epithelial cells. *Cancer Biol. Ther.* **5**, 511-517 (2006).
39. Kalantari-Dehaghi, M., Bernard, H. U. & Grando, S. A. Reciprocal effects of NNK and SLURP-1 on oncogene expression in target epithelial cells. *Life Sci.* **91**, 1122-1125 (2012).
40. Arredondo, J., Chernyavsky, A. I. & Grando, S. A. Overexpression of SLURP-1 and -2 alleviates the tumorigenic action of tobacco-derived

- nitrosamine on immortalized oral epithelial cells. *Biochem. Pharmacol.* **74**, 1315-119 (2007).
41. Arredondo, J., Chernyavsky, A. I. & Grando, S. A. SLURP-1 and -2 in normal, immortalized and malignant oral keratinocytes. *Life Sci.* **80**, 2243-2247 (2007).
42. Chen, Z. B. *et al.* Effects of tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) on the activation of ERK1/2 MAP kinases and the proliferation of human mammary epithelial cells. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **22**, 283-291 (2006).
43. Laag, E. *et al.* NNK activates ERK1/2 and CREB/ATF-1 via beta-1-AR and EGFR signaling in human lung adenocarcinoma and small airway epithelial cells. *Int. J. Cancer.* **119**, 1547-1552 (2006).
44. Oakley, R. H. & Cidowski, J. A. The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* **132**, 1033-1044 (2013).
45. Reeder, A. *et al.* Stress hormones reduce the efficacy of paclitaxel in triple negative breast cancer through induction of DNA damage. *Br. J. Cancer.* **112**, 1461-1470 (2015).
46. Flaherty, R. L. *et al.* Stress hormone-mediated acceleration of breast cancer metastasis is halted by inhibition of nitric oxide synthase. *Cancer Lett.* **459**, 59-71 (2019).
47. Zhang, S. *et al.* Genotoxicity analysis of five particle matter toxicants from cigarette smoke based on γ H2AX assay combined with Hill/Two-component model. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **58**, 131-140 (2018).

48. Chou, S. J. & Alawi, F. Expression of DNA damage response biomarkers during oral carcinogenesis. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **111**, 346-353 (2011).
49. Herr, I. *et al.* Glucocorticoid cotreatment induces apoptosis resistance toward cancer therapy in carcinomas. *Cancer Res.* **63**, 3112-2310 (2003).
50. Liu, Y. *et al.* Tumorigenesis of smoking carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone is related to its ability to stimulate thromboxane synthase and enhance stemness of non-small cell lung cancer stem cells. *Cancer Lett.* **370**, 198-206 (2016).

Anexos

Anexo A - Normas de publicação da Scientific Reports



Scientific Reports

Online ISSN: 2045-2322

Editor in-Chief

Dr. Richard White

<https://www.nature.com/srep/>

Acesso em 31 de Março de 2020