

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTec
Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

**Avaliação da frequência dos genótipos do polimorfismo
T102C do receptor 5HT2A em lesões bucais malignas e
potencialmente malignas e sua associação com o fumo e
o álcool**

Rafaely Ferreira Severo

Rafaely Ferreira Severo

Avaliação da frequência dos genótipos do polimorfismo T102C do receptor 5HT2A em lesões bucais malignas e potencialmente malignas e sua associação com o fumo e o álcool

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora Acadêmico: Prof^ª. Dr^ª Fernanda Nedel

Orientadora do Estágio: Prof^ª. Dr^ª Gabriele Cordenonzi Ghisleni

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:

Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

S498a Severo, Rafaely Ferreira

Avaliação da frequência dos genótipos do polimorfismo T102C do receptor 5HT2A em lesões bucais malignas e potencialmente malignas e sua associação com o fumo e o álcool / Rafaely Ferreira Severo. – 65f. : il. – Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2014. – Orientador Fernanda Nedel.

1.Biotecnologia. 2.Câncer de boca. 3.Serotonina. 4.Polimorfismo T102C. 5.PCR em tempo real. I.Nedel, Fernanda. II.Título.

CDD: 616.99431

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr^a. Marta de Oliveira Gazal, Universidade Federal de Pelotas

Ma. Eliana do Nascimento Torre, Universidade Federal de Pelotas

“Dedico este trabalho de conclusão de curso à minha família. Sem eles, não teria chegado até aqui”.

Agradecimentos

À Universidade Federal de Pelotas e a todos os professores da Biotecnologia por estabelecerem um curso de grande qualidade e pela dedicação em capacitar seus alunos da melhor forma possível.

Ao NCT-BIO da Faculdade de Odontologia, Ufpel, onde tive a oportunidade de estagiar durante a graduação.

Ao Laboratório de Neurociências Clínicas, Ucpel, pela oportunidade de realização do meu estágio final.

À professora Sandra Tarquínio por disponibilizar as amostras para a realização deste trabalho. Ao Prof. Flávio Demarco pelo período de orientação. À Prof. Gabriele Ghisleni pela orientação no estágio final.

À minha orientadora, Prof. Fernanda Nedel, por todo apoio, orientação, e pela motivação para seguir o melhor caminho.

Aos colegas de laboratório, pela companhia e ajuda nas atividades diárias.

À minha família e demais pessoas importantes presentes na minha vida que estão comigo em todos os momentos, me incentivando sempre a seguir em frente.

Muito Obrigada.

Resumo

SEVERO, Rafaely Ferreira. **Avaliação da frequência dos genótipos do polimorfismo T102C do receptor 5HT2A em lesões bucais malignas e potencialmente malignas e sua associação com o fumo e o álcool.** 2014. 65f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

A molécula de Serotonina (5-HT) realiza a função de neurotransmissor e age em diversas áreas fisiológicas, tais como o sistema cardiovascular, o sistema digestivo e também no cérebro, onde é capaz de interferir no apetite, na agressividade, nos hábitos e na memória. Os receptores serotoninérgicos são classificados em sete tipos (5-HT1-7), o receptor tipo 2 é dividido em três subgrupos (A,B e C). O receptor 5-HT2A, cujo gene (*HTR2A*) se encontra no cromossomo 13 (13q14-q21), apresenta diferentes polimorfismos, como o T102C (rs6313). No polimorfismo T102C o nucleotídeo timina (T) é alterado pela citosina (C), assim surgem três alelos que podem ser identificados pela técnica de PCR, são eles: TC, TT e CC. Algumas pesquisas vêm sugerindo uma provável relação entre o genótipo CC do polimorfismo T102C com dependência ao tabaco, álcool e drogas. Neste sentido, o fumo, o álcool, a má nutrição, a má higiene, variáveis demográficas e problemas imunológicos são alguns dos fatores que, associados, podem resultar na iniciação e promoção neoplásica na cavidade bucal. Desta forma o objetivo do presente estudo foi verificar a frequência e o perfil dos genótipos do polimorfismo T102C do receptor 5HT2A e sua associação com o fumo e o álcool em lesões bucais malignas e potencialmente malignas. A população alvo consistiu em pacientes com e sem lesões bucais malignas e potencialmente malignas, e dentro destes grupos pacientes com e sem os hábitos de fumo e consumo de bebidas alcoólica. Foram genotipadas 177 amostras de indivíduos, desse grupo faziam parte 22 diagnosticados com carcinoma, 28 com displasia moderada/severa, 33 com hiperqueratose + acantose + displasia leve, 22 com líquen plano e 72 faziam parte do grupo controle. Os pacientes são usuários do Centro de Diagnóstico das Doenças da Boca (CDDB-UFPe), com idade igual ou superior a 45 anos. O polimorfismo do T102C foi genotipado em ensaios de discriminação alélica por PCR em tempo real no termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Primer e sonda do tipo TaqMan MGB foram designados utilizando-se o software Primer Express v3.0 e a sequência consenso do gene obtida a partir do GeneBank. Os resultados obtidos sugerem uma associação positiva entre o alelo C e o hábito do fumo e álcool. Este alelo parece ter importância nos momentos iniciais da carcinogênese.

Palavras chaves: câncer de boca; serotonina; polimorfismo T102C; PCR em tempo real.

Abstract

SEVERO, Rafaely Ferreira. **Frequency of assessment of the T102C polymorphism genotypes of the 5HT2A receptor in malignant oral lesions and potentially malignant and its association with smoking and alcohol.** 2014. 65f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

The molecule Serotonin (5-HT) performs a neurotransmitter and acts on various physiological areas, such as the cardiovascular system, digestive system, and also in the brain, which is capable of interfering with appetite, aggression, habits and memory. The serotonin receptors are classified into seven types (5-HT1-7), type 2 receptor is divided into three groups (A, B and C). The 5-HT2A receptor, which gene (HTR2A) is located on chromosome 13 (13q14-q21) has different polymorphisms, such as T102C (rs6313). T102C polymorphism in the nucleotide thymine (T) is amended by cytosine (C) and generates three alleles that can be identified by PCR, they are: TC, TT and CC. Some studies have suggested a possible relationship between the CC genotype of the T102C polymorphism with tobacco dependence, alcohol and drugs. In this sense, smoking, alcohol, poor nutrition, poor hygiene, demographic variables and immune disorders are some of the factors associated, may result in the initiation and promotion in neoplastic oral cavity. Therefore, the objective of this study was to determine the frequency and the profile of the T102C polymorphism genotypes of the 5HT2A receptor and its association with smoking and alcohol in malignant and potentially malignant oral lesions. The target population consisted of patients with and without malignant and potentially malignant oral lesions, and within these groups patients with and without smoking habits and alcohol consumption. Were genotyped 177 samples of individuals, this group included 22 diagnosed with carcinoma, 28 with moderate / severe dysplasia, 33 with hyperkeratosis acanthosis + mild dysplasia, 22 with lichen planus and 72 as the control group. Patients are users of the Mouth Disease Diagnostic Center (CDDB-UFPel), aged over 45 years. The T102C polymorphism was genotyped for allelic discrimination assays for real-time PCR thermocycler the 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Primer and Taqman MGB probe type were assigned using the Primer Express v3.0 software and consensus sequence of the gene obtained from GenBank. The results suggest a positive association between the C allele and the habit of smoking and alcohol. This allele seems to be important in the early stages of carcinogenesis.

Key Words: mouth cancer; serotonin; T102C polymorphism; real-time PCR.

Lista de Figuras

Figura 1 Apresentação clínica de leucoplasia em ventre lingual/assoalho bucal.....	18
Figura 2 Lesão leucoeritroplásica em palato duro e reborbo alveolar superior.....	19
Figura 3 Aspecto clínico do Líquen Plano em mucosa jugal esquerda, revelando estrias esbranquiçadas em fundo eritematoso.....	20
Figura 4 Estrutura molecular da serotonina (5-HT).....	23
Figura 5 Coleta de amostras de células das lesões orais.....	34
Figura 6 Coleta de amostras do grupo controle	35
Figura 7 Escovas citológicas destinadas à análise de DNA introduzidas em um tubo contendo solução de lise celular	35

Lista de Tabelas

Tabela 1 Artigos publicados no período de 2005 a 2014 envolvendo o polimorfismo T102C do receptor 5HT2A	24
Tabela 2 Polimorfismo T102C	36
Tabela 3 Frequência dos genótipos em lesões pré-malignas, malignas e controles.	37
Tabela 4 Porcentagem dos genótipos em lesões malignas e pré-malignas.....	38
Tabela 5 Hábito de ingerir bebidas alcoólicas	39
Tabela 6 Ingestão de bebidas alcoólicas/semana- Carcinoma	40
Tabela 7 Ingestão de bebidas alcoólicas/semana- Displasia moderada/severa	41
Tabela 8 Ingestão de bebidas alcoólicas/semana- Hiperkeratose + Acantose + Displasia Leve	42
Tabela 9 Ingestão de bebidas alcoólicas/semana- Líquen Plano.....	43
Tabela 10 Ingestão de bebidas alcoólicas/semana- Controle	43
Tabela 11 Hábito de fumo	44
Tabela 12 Quantidade de cigarros por unidade- Carcinoma	45
Tabela 13 Quantidade de cigarros por unidade- Displasia Moderada/Severa	46
Tabela 14 Quantidade de cigarros por unidade- Hiperkeratose+Acantose+Displasia Leve	46
Tabela 15 Quantidade de cigarros por unidade- Líquen Plano	47
Tabela 16 Quantidade de cigarros por unidade- Controle.....	48

Lista de Abreviaturas e Siglas

C	Citosina
CDDB	Centro de Diagnóstico das Doenças da Boca
CEC	Carcinoma Espinocelular
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FO	Faculdade de Odontologia
GABA	Ácido Gama-Aminobutírico
HTR2A	Gene Receptor da Serotonina 2 ^a
5-HT	5-Hidroxitriptamina (Serotonina)
INCA	Instituto Nacional do Câncer
mRNA	RNA Mensageiro
μl	Microlitro
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em Cadeia Polimerase
RNA	Ácido Ribonucleico
5-HT2A	Receptor Serotoninérgico
SNC	Sistema Nervoso Central

T	Timina
T102C	Polimorfismo Serotoninérgico
UFPEL	Universidade Federal de Pelotas

Sumário

1 Introdução	143
2 Objetivos	154
2.1 Objetivo Geral	154
2.2 Objetivos Específicos	154
3 Revisão Bibliográfica.....	165
3.1 Câncer de boca.....	165
3.1.1 Epidemiologia.....	187
3.1.2 Fatores Etiológicos.....	200
3.2 Polimorfismo T102C do receptor 5HT2A.....	222
3.2.1 Polimorfismo T102C – Alcoolismo.....	30
3.2.2 Polimorfismo T102C – Tabagismo	311
4 Materiais e Métodos	333
4.1 População de estudo.....	333
4.2 Obtenção do DNA genômico.....	344
4.3 Genotipagem do polimorfismo T102C do gene do receptor 5-HT2A.....	355
4.4 Obtenção da sequência consenso	366
5 Resultados e discussão.....	37
6 Conclusões.....	50
Referências bibliográficas	51
Apêndice A.....	59
Apêndice B.....	61
Anexo A.....	63
Anexo B.....	64

1 Introdução

O câncer de boca é uma doença crônica multifatorial que está entre os dez tipos de cânceres mais comuns na população mundial (OLIVEIRA, 2013; CARVALHO, 2012) e acomete predominantemente indivíduos do sexo masculino (BITTAR, et al., 2010). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o câncer de boca acomete lábios e o interior da cavidade oral, sendo que no interior da boca inclui-se a gengivas, a mucosa jugal (bochechas), o palato duro (céu da boca), e a língua. Vale ressaltar que fatores ambientais como o fumo, o álcool e a má nutrição em conjunto podem levar à iniciação e promoção neoplásica (MEHROTRA, et al., 2006). Neste sentido, o câncer tem acometido principalmente tabagistas, onde os riscos aumentam quando o tabagista é também etilista. A incidência do câncer intra bucal tem acompanhado os padrões de consumo de tabaco e de álcool há várias décadas (Vargas-Ferreira, et al., 2012).

Devido ao aumento do número de indivíduos fumantes e alcoólatras, estudos de cunho genético estão sendo realizados no intuito de desvendar a variedade de fenótipos relacionados aos hábitos de dependência, os quais podem ocorrer em decorrência de polimorfismos genéticos (DOS SANTOS, 2011). A molécula de serotonina (5-HT) apresenta função de neurotransmissor, e vem sendo relacionada aos comportamentos: apetitivo, emocional, motor, cognitivo e autônomo (LIMA, 2004). O receptor serotoninérgico do tipo 2 (5HT2) é dividido em 3 subgrupos (A,B,C), e o subgrupo 5HT2A por sua vez, contém diversos polimorfismos, sendo um deles o T102C. Estudos vem sugerindo uma relação positiva entre os genótipos CC do polimorfismo T102C com doenças neuropsiquiátricas, incluindo dependência ao álcool e tabaco (JAKUBCZYK, 2013).

Para tanto, analisou-se a frequência e o perfil dos genótipos do polimorfismo T102C em pacientes com lesões bucais malignas e potencialmente malignas a fim de encontrar uma relação entre o polimorfismo em questão com a dependência de álcool e tabaco e, conseqüentemente, com o desenvolvimento do câncer de boca.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

- Analisar a frequência e o perfil dos genótipos do polimorfismo T102C no receptor 5HT2A e sua associação com o fumo e o álcool em lesões bucais malignas e potencialmente malignas.

2.2 Objetivos Específicos

- Comparar a frequência e a relação entre o polimorfismo T102C do receptor 5HT2A com a dependência do álcool e tabaco.

- Comparar a frequência e a relação entre o polimorfismo T102C do receptor 5HT2A com as lesões bucais malignas e potencialmente malignas.

3 Revisão Bibliográfica

3.1 Câncer de boca

O câncer é uma doença com um importante componente genético que surge devido a mutações em genes relacionados ao controle da proliferação e apoptose celular, isso permite com que células obtenham a competência de adentrar em tecidos, permitindo a formação de metástases (NEDEL et al., 2010). O câncer pode ser denominado como o “acúmulo de transformações genéticas”, sendo essas alterações normalmente obtidas no decorrer da vida, ou seja, de caráter somático. Somente em 5% a 10% dos casos as transformações genéticas relacionadas ao câncer são germinativas, isto é, existem desde o nascimento e são hereditárias. Apesar do nosso organismo ser formado por trilhões de células, os tumores se originam a partir de uma única célula ou de uma quantidade pequena de células modificadas, e acredita-se que de quatro a sete eventos genéticos importantes sejam o bastante para que ocorra uma transformação maligna (SAAD et al., 2009).

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), a forma como ocorre a formação do câncer se chama oncogênese ou carcinogênese, e esse processo pode demorar anos. As ações cumulativas de agentes cancerígenos são responsáveis pelo início, promoção, progressão e inibição do tumor. O crescimento celular pode ser do tipo controlado ou não controlado. No controlado, como hiperplasia, metaplasia e displasia, existe um crescimento localizado do número de células dos tecidos ocasionado por estímulos fisiológicos ou patológicos, processo que é reversível assim que cessam os estímulos que o causaram. Por sua vez, o crescimento não controlado, como as neoplasias (câncer *“in situ”* e câncer invasivo), apresentam uma massa anormal de tecido cujo crescimento é descontrolado, fugindo total ou parcialmente do comando do organismo, e persistem mesmo após o

término dos estímulos que o causaram, trazendo efeitos graves para os indivíduos (ABC do câncer, 2011). Os inúmeros tipos de câncer que existem se referem aos diferentes tipos de células do organismo. É denominado carcinoma o câncer cuja origem se deu em tecidos epiteliais, como pele e mucosa, já o sarcoma é o tipo de tumor originado em tecidos conjuntivos, como ossos, músculos e cartilagem (SARTORI, 2004).

O câncer de boca, ou câncer bucal, por sua vez, tem origem nas células das estruturas que formam a cavidade bucal, e é considerada uma doença crônica multifatorial, pois surge da combinação de elementos de risco (OLIVEIRA, et al., 2013). Câncer bucal inclui os cânceres de lábio, língua, gengiva, assoalho bucal, palato duro, trígonoretromolar, glândulas salivares, amígdala e faringe (MELO, et al., 2010). Os pacientes com lesões bucais malignas mais comuns são costumeiramente submetidos a tratamentos como cirurgia, quimioterapia e radioterapia, e somado a isso há acompanhamento de uma equipe de profissionais da saúde a fim de contribuir para um melhor resultado (CARVALHO, 2012).

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), sintomas como problemas na fala, mastigação, e presença de linfadenomegalia cervical, um tipo de caroço no pescoço, são sinais de alerta. Se essas lesões forem detectadas de forma tardia, podem resultar em menores chances de cura, e conseqüentemente, crescimento da taxa de mortalidade (CARVALHO, et al., 2012). Por sua vez, o prognóstico do câncer de boca pode ser determinado seguindo diversos parâmetros como tamanho do tumor, local onde se encontra a lesão e também se o tumor é benigno, sem chances de se espalhar pelo organismo ou se é maligno, com presença de metástases (MATEUS, 2008). A consciência dos fatores de risco, principalmente os relacionados a agentes com potencial mutagênico, são o pilar

para prevenção do câncer bucal, assim como o reconhecimento dos sintomas pelo paciente, podendo este ser diagnosticado e tratado no início da doença, tornando real a chance de redução da mortalidade gerada pelo tumor, e podendo levar a um aumento nas taxas de sobrevivência (MELO, et al., 2010).

3.1.1 Epidemiologia

Em nosso país e no mundo, o câncer de boca se mostra um importante problema de saúde pública, essa neoplasia se encontra entre as dez mais frequentes na população mundial, apesar desta frequência variar em diferentes regiões geográficas (CARVALHO, 2012; NEDEL, 2010). No Brasil, o câncer bucal representa a sétima neoplasia mais comum e a nona causa de morte por câncer (SAAD et al., 2009). Segundo o INCA, a estimativa para o nosso país no ano de 2014 é de 11.280 casos novos de câncer da cavidade oral em homens e 4.010 em mulheres, correspondendo a um risco estimado de 11,54 casos novos a cada 100 mil homens e 3,92 a cada 100 mil mulheres (Estimativas INCA, 2014). Esse tipo de câncer pode ser considerado o mais frequente na região de cabeça e pescoço, afetando predominantemente o sexo masculino (SARTORI, 2004; BITTAR, et al., 2010), com razão aproximada homem/mulher de 3:1, e depois dos 55 anos de idade essa proporção apresenta tendência de crescimento (CARVALHO, et al., 2012).

O carcinoma espinocelular (CEC) ou epidermóide, é uma neoplasia maligna com origem no epitélio de revestimento da mucosa bucal, e se mostra como o tumor de boca mais prevalente, correspondendo de 90% a 95% dos casos de câncer na cavidade oral (BITTAR, 2010; BRENER, 2007; TEIXEIRA, 2009). Apesar do crescimento de pesquisas em biologia celular e molecular, e os grandes progressos em oncologia e cirurgia, o índice de sobrevivência de cinco anos se mantém em cerca de 53%, sem considerável aumento nas últimas décadas. Os CECs são em geral

precedidos de lesões hiperplásicas, evoluindo para displasias, para carcinomas *in situ* e então chegando ao câncer bucal invasivo. Estas lesões são denominadas de lesões pré-malignas (potencialmente malignas) e incluem as leucoplasias (Fig.1), as eritroplasias (Fig.2), líquen plano (Fig. 3) e úlceras crônicas (NEDEL, 2010). Foi definido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como leucoplasias as lesões na forma de manchas/placas brancas, e como eritroplasia as alterações avermelhadas, ambas as quais não podem ser caracterizadas como nenhuma outra doença. Considera-se que as eritroplasias homogêneas, pelo seu alto potencial de malignização, sejam as lesões pré-malignas mais nocivas.



Figura 1: Apresentação clínica da leucoplasia em ventre lingual/assoalho bucal. Fonte: CDDB, Faculdade de Odontologia, UFPEL.

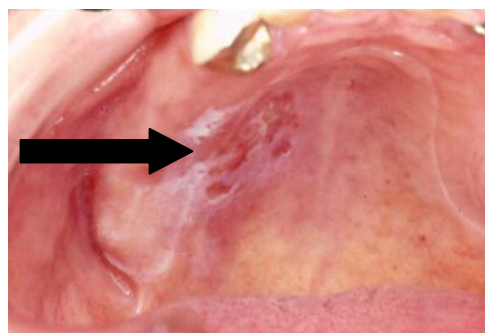


Figura 2: Lesão leucoeritroplásica em palato duro e reborbo alveolar superior. Fonte: CDDB, Faculdade de Odontologia, UFPEL.

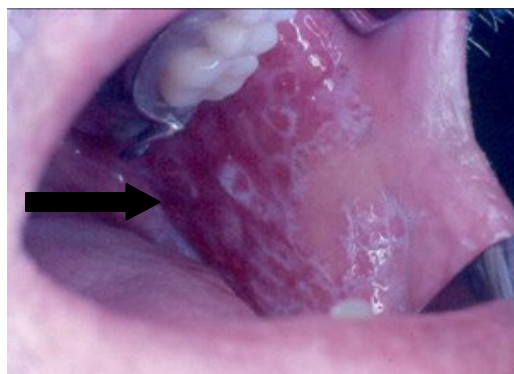


Figura 3: Aspecto clínico do Líquen Plano em mucosa jugal esquerda, revelando estrias esbranquiçadas em fundo eritematoso. Fonte: CDDB, Faculdade de Odontologia, UFPEL.

3.1.2 Fatores Etiológicos

Fumo, álcool, má nutrição, má higiene, radiação solar, variáveis demográficas e problemas imunológicos são alguns dos fatores que, associados, podem resultar na iniciação e promoção neoplásica (OLIVEIRA, et al., 2013). Além desses, outro importante fator de risco é o papilomavírus humano (HPV), o qual também está ligado com lesões bucais benignas e malignas (MEHROTRA, et al., 2006).

Álcool é um dos significativos fatores de risco para o advento do câncer bucal, e seu consumo tem tido considerável aumento no decorrer dos anos, principalmente por consumidores de baixa faixa etária. Substâncias etílicas podem causar prejuízo na mucosa bucal agindo diretamente ou devido a seu comportamento sobre os outros sistemas, como diminuição da habilidade em reparar danos no DNA, problemas no sistema imunológico, além de serem responsáveis por acréscimo na proliferação epitelial e alterações no processo de maturação. O primeiro metabólito do etanol chamado acetaldeído, pode ter função de solvente, auxiliando os carcinógenos a entrarem pelas membranas celulares e, além disso, esse metabólito tem a capacidade de romper a dupla fita de DNA, afetando o metabolismo celular. O

consumo de substâncias alcoólicas pode, também, levar a uma elevação da atividade metabólica do fígado, podendo ativar elementos carcinogênicos (CARRARD et al.,2008; LEITE et al.,2005).

Ainda de acordo com Carrard, et al., 2008, o metabolismo do álcool pode conduzir ao estresse oxidativo, uma vez que faz com que haja um crescimento na produção de radicais livres e uma queda dos mecanismos antioxidantes. Além disso, segundo o autor, a quantidade de bebida alcoólica ingerida e a duração do hábito são fatores mais importantes do que o tipo de bebida ingerida em relação ao aumento da probabilidade de gerar tumores. Porém, apesar de o etilismo estar fortemente ligado ao câncer de boca, os mecanismos envolvidos no dano gerado por estas substâncias ainda não estão completamente compreendidos e ainda não está totalmente esclarecido como o álcool isoladamente pode estar relacionado ao início da carcinogênese bucal (BRENER, 2007; LEITE, 2005).

O fumo, por sua vez, é um dos mais importantes agentes carcinogênicos que o homem insere de forma voluntária no próprio organismo, o hábito de fumar amplia cerca de 3 a 8 vezes a chance de o indivíduo desenvolver a doença (SAAD, 2009) e entre as causas de morte que podem ser evitadas o tabaco é uma das maiores (MIGOTT, 2007).

A nicotina é um alcalóide que apresenta função na estimulação da dependência adquirida pelo fumante. Essa substância orgânica nitrogenada de alto poder de adição liga-se aos receptores do sistema colinérgico do cérebro, que contém subunidades $\beta 2$ expressos na região tegmental ventral aos gânglios do sistema nervoso autônomo e também às placas neuromusculares (LIMA, 2004). Ao adentrar pela membrana do alvéolo capilar, essa substância pode chegar ao cérebro em menos de dez segundos, e ao atingir o sistema mesolímbico, ela promove a

liberação de dopamina, o neurotransmissor que gera a sensação de prazer ocasionada pelo hábito de fumar. Além disso, a nicotina realiza ações complexas sobre o organismo do fumante que fortalecem o ato de fumar, então, cada tragada incita a repetição do hábito de fumar, e após certo período, há a dessensibilização da ação da nicotina, surgindo então, a abstinência (MIGOTT, 2007).

O tabaco tem relação com o desenvolvimento de tumores, pois apresenta a capacidade de modificar o genoma, gerar silenciamento ou ativação de determinados genes e a nicotina é capaz de provocar a metilação do DNA (OLIVEIRA, 2011). Não somente os cigarros manufaturados, mas também cachimbos, charutos ou o costume de mascar fumo são fatores de risco, uma vez que fumar ou simplesmente mascar fumo pode gerar prejuízos às proteínas, lipídios, carboidratos e DNA, devido a formação de radicais livres. Somado a isso, elementos resultantes da combustão do tabaco são vistos como carcinogênicos, tais como os hidrocarbonetos aromáticos polinucleares (LEITE, et al., 2005).

O tabaco em conjunto com o etanol gera sinergismo e isso faz com que exista uma maior probabilidade de desenvolvimento de câncer bucal (FROTA, 2011). Devido ao aumento significativo no número de fumantes e dependentes de álcool, pesquisas tentam encontrar respostas. Nesse contexto, a genética pode explicar a grande variabilidade fenotípica, a qual pode ocorrer devido a polimorfismos genéticos (DOS SANTOS, 2011).

3.2 Polimorfismo T102C do receptor 5HT2A

O cérebro humano produz de forma contínua neurotransmissores, os quais são substâncias químicas com capacidade de regular o humor através de impulsos nervosos entre as células nervosas. Existem três neurotransmissores: a

noradrenalina, a dopamina e a serotonina. A molécula de serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) (Figura 4) é sintetizada pelo aminoácido essencial triptofano, o qual tem por fonte principal a dieta, incluindo grãos, carne e laticínios. A serotonina pode ser influenciada por fatores como estilo de vida, hereditariedade e faz parte da família das monoaminas juntamente com epinefrina, norepinefrina e dopamina (JOBIM, 2008). Este neurotransmissor é liberado para o sangue a partir do intestino e está relacionado com a regulação de algumas funções cerebrais, inibindo ou estimulando o sistema GABA, um tipo de neurotransmissor inibitório, presente em todo o Sistema Nervoso Central (SNC) (DICKOW & KOCHE 2011), e assim é capaz de regular comportamentos importantes, tais como alcoolismo, tabagismo, depressão, compulsão, liberação de alguns hormônios, sono, apetite e agressividade. Sendo assim, certamente a serotonina apresenta uma função reguladora no processo de resposta envolvendo o SNC (JOBIM, 2008). Dessa forma, problemas na modulação da 5-HT levam ao aparecimento de doenças crônicas, como doenças cardiovasculares e distúrbios psiquiátricos (MIGOTT, 2007). Porém, apesar de estar relacionada a todas essas funções, ainda não está comprovado, do prisma fisiológico, se a serotonina atinge de forma direta ou indireta tais condutas (LIMA, 2004).

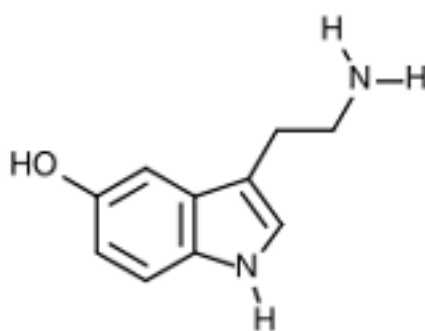


Figura 4: Estrutura molecular da serotonina (5-HT). Fonte: www.todabiologia.com

Os neurônios serotoninérgicos localizam-se nos núcleos da rafe (no tronco cerebral), projetam-se para as regiões do SNC e agem através dos receptores serotoninérgicos (LIMA, 2004), os quais são classificados em sete tipos (5-HT1-7). Por sua vez, o receptor tipo 2 é dividido em três subgrupos (A,B e C). O receptor 5-HT2A, cujo gene (*5HTR2A*) se encontra no cromossomo 13 na posição 14-21 do braço longo (13q14-q21) apresenta diferentes polimorfismos, como o T102C (rs6313). Este polimorfismo está na posição nucleotídica 102 do gene e envolve uma mutação pontual, onde o nucleotídeo com timina (T) é alterado pela citosina (C), e dessa modificação surgem três alelos, sendo eles: TC, TT e CC (MIGOTT, 2007). Nesse polimorfismo, ambas as sequências TCT ou TCC codificam para o mesmo aminoácido: a serina; não alterando, portanto, a sequência de aminoácidos da molécula do receptor (DICKOW, 2011; LIMA, 2004). Porém, este polimorfismo tem sido considerado funcional, uma vez que estudos têm demonstrado que os alelos T e C determinam expressões gênicas diferentes. Neste sentido, trabalhos envolvendo expressão de mRNA e proteínas do receptor 5-HT2A apresentam a hipótese de que o alelo C seria transcricionalmente menos ativo do que o alelo T. Porém, algumas pesquisas falharam em encontrar esta diferença de expressão do receptor em relação aos alelos, gerando a possibilidade de alterações na metilação do DNA em diferentes populações como os motivos para se encontrar resultados tão diferentes (NEDEL, 2010).

Algumas pesquisas vêm sugerindo uma provável relação entre os genótipos CC do polimorfismo T102C com doenças neuropsiquiátricas, incluindo dependência ao tabaco, álcool e drogas (JAKUBCZYK, 2013; WRZOSEK, 2012). Em contrapartida, outros trabalhos demonstram uma ligação positiva entre o genótipo TT

do polimorfismo em questão, com infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral, hipertensão arterial e valores elevados de agregação plaquetária em indivíduos adultos, conforme Tabela 1:

Tabela 1 – Trabalhos publicados no período de 2005 a 2014 envolvendo o polimorfismo T102C do receptor 5HT2A

	Autor (Ano)	País	Casos	Genótipos	Obs.
Alcoolismo	Jakubczyk et al. (2013)	Polônia	Recidivas/Alcoólatras	CC	
	Wrzosek et al. (2012)	Polônia	Dependência de Álcool	CC	Alelo C relacionado a menor idade do início do hábito
	Jakubczyk et al. (2012)	Polônia	Comportamento impulsivo em dependentes de álcool	CC	
Tabagismo	Ramos Neto et al. (2014)	Brasil	Tabagismo uma população do nordeste do Brasil	Sem diferença estatística significativa	Associação do T102C com a manutenção do hábito de fumar
	White et al. (2011)	Austrália	Dependência ao tabagismo em	TT	

			adultos jovens	
Depressão	Peters et al. (2011)	EUA	Reposta ao tratamento de depressão Alzheimer	Sem diferença estatística significativa
	Lin et al. (2009)	Taiwan	Resposta antidepressivos em pacientes com transtorno depressivo	Alelo C melhora na resposta ao tratamento a curto prazo
Outros	Mergener et al. (2011)	Brasil (Porto Alegre)	Fatores predisponentes para a Fibromialgia	CC
	Piatto et al. (2011)	Brasil (São Paulo)	Síndrome da apneia obstrutiva sono	Sem diferença estatística significativa
	Salo et al. (2011)	Finlândia	Efeito da criação materna sobre os relacionamentos sociais da criança na idade adulta	TT são mais influenciados pelo efeito da criação materna do que os CC
	Keltikangas et al.	Finlândia	Escolaridade	Genótipo TT Sugerido

al. (2010)	a	dos pais e sucesso escolar (9 anos de acompanhamento)	e se beneficiou mais da alta escolaridade materna e sofreu mais quando o nível de escolaridade materno era baixo.	que: o alelo T pode sensibilizar mais uma pessoa a efeitos ambientais que o alelo C
Markoutsaki et al. (2011)	Grécia	Síndrome do intestino irritado	do	Sem diferença estatística significativa
Kling et al. (2008)	Suécia	Artrite reumatoide		Alelo C mais frequente Baixa frequência do alelo T. Sugere que: este alelo pode ter um efeito protetor
Jobin et al. (2008)	Brasil (Porto Alegre)	Tempo de vida		Genótipo TT associado com indivíduos mais velhos
Jokela et al. (2007)	Finlândia	Influência da residência	da	Alelo T associado Pode estar associado

			urbana/rural	e	elevados	com	o
			do	polimorfismo	sintomas	de	desenvolvi
			na	depressão	depressão		mento de
			subclínica		em	áreas	depressão
					remotas		influenciad
					rurais.		o como o
					Alelo	T	indivíduo
					associado		responde
					com	baixos	as
					sintomas	de	condições
					depressão		do
					em	áreas	ambiente
					urbanas		
Jokela et al (2007)	Finlândia	Influencia do genótipo status socioeconômico dos pais no temperamento de evitar danos (TED)	do	Alto nível socioeconômico	prediz	baixo TED	em indivíduos com genótipo TT ou TC. O mesmo não ocorre com o genótipo CC
Jokela et al (2007)	Finlândia	Influência do genótipo e da nutrição materno infantil nos sintomas depressivos	do	Genótipo TT ou TC	quando na presença de alta nutrição materno	expressavam	baixos níveis de sintomas

				depressivos.
Schwanke et al. (2007)	Brasil (Gravatá)	Incontinência urinária em idosos	TT	
Prado-Lima et al. (2006)	Brasil (Porto Alegre)	Preferência alimentar	Genótipo TT maior ingestão de proteínas e menor índice de massa corporal	
Choi et al. (2005)	Coréia	Níveis de colesterol genótipo	de e reduzidos de colesterol total e HDL em indivíduos com o genótipo CC	
Miguita et al. (2011)	Brasil (São Paulo)	Resposta ao tratamento com clomipramina no transtorno obsessivo-compulsivo	Sem diferença estatística significativa	
Alfimova et al. (2010)	Rússia	Avaliação da memória de curto prazo em esquizofrênicos	Piora no genótipo CC	
Tsunoka et al. (2010)	Japão	Esquizofrenia	Sem diferença	

			estatística significativa
Chen et al. (2009)	Taiwan	Resposta ao CC tratamento com Aripiprazol da esquizofrenia aguda exacerbada	CC predispõem a uma pobre reposta ao tratamento com Aripiprazol
Zhang et al. (2008)	China	Comportamento suicida	Sem diferença estatística significativa
Kim et al. (2008)	Coréia	Resposta ao tratamento com Risperidona em pacientes esquizofrênicos	TT menor melhora clínica
Peñas-Lledó et al. (2007)	Espanha	Esquizofrenia	Maior frequência do alelo T
Golimbet et al. (2007)	Rússia	Esquizofrenia	Alelo C mais frequente

3.2.1 Polimorfismo T102C – Alcoolismo

O caminho do uso de drogas até a dependência origina-se em um contexto de vulnerabilidade baseado em questões genéticas e ambientais. Conforme a doença se instala a plasticidade neuronal atípica tem chances de ocorrer no cérebro,

fazendo com que aconteça, assim, o desenvolvimento e manutenção do vício. O sistema serotoninérgico tem a capacidade de contribuir tanto para a predisposição quanto para a continuidade da dependência ao álcool (KIRBY, 2011). Hwo e Chen, (2000), ao pesquisarem uma população de dependentes em álcool revelaram que o abuso do álcool em homens, associado a transtornos de comportamento apresentava ligação com o alelo C do polimorfismo T102C.

Devido aos graves problemas causados pelo consumo de álcool, surgem programas de tratamentos para dependentes, porém, apesar dos esforços alguns pacientes enfrentam recaídas. Nesse contexto, Jakubczk, et al., 2013, revelaram que o genótipo CC do polimorfismo T102C está significativamente associado com o aumento de recaídas de alcoólatras durante o período de tratamento.

Outros estudos sugerem que o desejo por álcool e nível de impulsividade podem ser controlados pelas mesmas áreas cerebrais, e que altos níveis de impulsividade podem tornar o indivíduo mais vulnerável à dependência do álcool. Análises bioquímicas e genéticas aceitam a hipótese de que níveis baixos de serotonina podem levar a níveis mais altos de impulsividade e, além disso, a hereditariedade da impulsividade foi confirmada em humanos, então esse é um alvo importante no tratamento do alcoolismo (LI, 2009; JAKUBCZK, 2012).

3.2.2 Polimorfismo T102C – Tabagismo

O ato de fumar é considerado multifatorial, uma vez que os componentes genético e ambiental se complementam (DOS SANTOS, 2011). No estudo de Hong et al., 2002, foi sugerido que os fatores genéticos podem ter responsabilidade superior a 50% tanto no início quanto na dependência ao tabaco, além do envolvimento na quantidade de cigarros fumados por dia (HONG, 2002). O vício

apresenta caráter crônico, pois logo que desenvolvido há grandes chances de recidiva, mesmo após um longo tempo de abstinência. Além da dependência, evidências científicas sugerem influência genética também na capacidade de parar de fumar (BATRA, 2003; LIMA, 2004; LI, 2003), o que foi descrito em estudo recente de Ramos Neto et al., (2014), onde os autores sugerem que o polimorfismo T102C contribui para a manutenção do hábito de fumar (RAMOS NETO, 2014)

O alelo que está associado à continuação do vício em tabaco é o alelo C, o qual confere uma redução na expressão gênica, ou seja, uma queda no número de receptores 5HT2A (LIMA, 2004; POLESSKAYA & SOKOLOV, 2002). Esses receptores fazem com que ocorra uma maior liberação de dopamina no córtex frontal, e assim, aumentam a atividade dos neurônios da área tegmental ventral, como conseguinte a queda no número desses receptores pode acarretar em uma menor ativação dos neurônios da área tegmental ventral, os quais estão associados com o surgimento da adição e da abstinência. Então, indivíduos que tivessem uma menor quantidade de receptores 5HT2A estimulando os neurônios dopaminérgicos na área tegmental ventral (ou seja, menor estimulação serotoninérgica das vias de adição), seriam os com maiores chances de se tornarem dependentes ao tabaco. Outra descoberta importante é que pessoas com genótipo CC do polimorfismo T102C realizaram menos esforço em parar de fumar, além de desenvolverem o vício ao tabaco, então esse polimorfismo pode vir a ser futuramente um teste de prevenção, para identificar pessoas mais suscetíveis ao tabagismo (LIMA, 2004).

Ainda de acordo com pesquisas de Lima (2004), houve diferenças nos genótipos quando fumantes foram comparados a não fumantes e ex-fumantes, e o genótipo CC foi mais encontrado em fumantes, propondo assim, que T102C tem

relação com a dependência. Em contrapartida, White et al., (2011) relacionaram o genótipo TT a um maior risco para o tabagismo. (LIMA, 2004; WHITE ET AL., 2011).

4 Materiais e Métodos

4.1 População de estudo

A população alvo consiste em pacientes com e sem lesões bucais malignas e potencialmente malignas, e dentro destes grupos pacientes com e sem os hábitos de fumo e consumo de bebidas alcoólicas. No total foram avaliados 177 pacientes. Os critérios clínicos para suspeita de malignidade das lesões foram alterações na mucosa oral presentes há mais de 15 dias, exibindo alterações de forma, tamanho, coloração, textura e sensibilidade. Indivíduos com doenças de natureza inflamatória e/ou infecciosa, bem como enfermidades vasculares ou do colágeno em um período de até um mês prévio à coleta do material genômico, foram considerados critérios de exclusão.

Os pacientes são usuários do Centro de Diagnóstico das Doenças da Boca (CDDDB-UFPel), com idade igual ou superior a 45 anos. Estes foram informados a respeito do presente estudo e tendo se disponibilizado a participar, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice A), e também responderam a um questionário feito por equipe treinada (Apêndice B) contendo questões a respeito do hábito de fumar e ingerir bebidas alcoólicas. Para facilitar a interpretação das respostas foram incluídos no grupo de fumantes os indivíduos ex-fumantes. No grupo dos indivíduos consumidores de bebidas alcoólicas incluíram-se também os que haviam abandonado o hábito. O presente estudo obteve a aprovação do Comitê

de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Pelotas (Parecer n. 058/2008 do CEP da FOUFPEL) (Anexo A).

4.2 Obtenção do DNA genômico

Amostras de células das lesões orais foram coletadas com o paciente previamente anestesiado. Foram utilizadas escovas citológicas descartáveis, sendo friccionadas as lesões por aproximadamente 30 segundos (Figura 5), movimentando-as ao longo da porção anterior em direção aos dois lados da cavidade bucal. O mesmo procedimento foi realizado para a coleta de material do grupo controle (Figura 6). Após a coleta, as escovas citológicas destinadas à análise de DNA foram introduzidas em um tubo de microcentrífuga contendo solução de lise celular (Figura 7). Após 24 horas procedeu-se à extração de DNA, seguindo as instruções do fabricante (Puregene Bucca ICell Kit- Genra Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota, USA) (Anexo B). Para cada uma das amostras foi obtido 20µl de solução final e deste volume, 2µl foram retirados para a quantificação de DNA no espectrofotômetro Nanovue (GE Healthcare Life Sciences) (NEDEL, 2009).



Figura 5: Coleta de amostras de células das lesões orais. Fonte: CDDB, Faculdade de Odontologia, UFPEL.



Figura 6: Coleta de amostras do grupo controle. Fonte: CDDB, Faculdade de Odontologia, UFPEL.

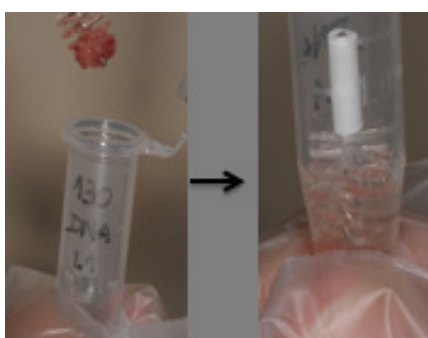


Figura 7: Escovas citológicas destinadas à análise de DNA introduzidas em um tubo contendo solução de lise celular. Fonte: CDDB, Faculdade de Odontologia, UFPEL.

4.3 Genotipagem do polimorfismo T102C do gene do receptor 5-HT2A

O polimorfismo apresentado na tabela 2 foi genotipado em ensaios de discriminação alélica por PCR em tempo real no termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System (AppliedBiosystems). Primer e sonda do tipo TaqMan MGB foram designados utilizando-se o software Primer Express v3.0. O DNA genômico foi diluído 2:8 para a realização da reação de PCR.

Tabela 2. Polimorfismo T102C

Nome do Gene	Posição Cromossômica	Alelo	Identificação do SNP
5HT2A	13q14-q21	C/T	rs6313

4.4 Obtenção da sequência consenso

A sequência consenso do gene foi obtida a partir do banco de dados GeneBank (disponível online em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

5 Resultados e discussão

No total foram genotipadas e analisadas em ensaios de discriminação alélica por PCR em tempo real, 177 amostras de pacientes com e sem lesões bucais malignas e potencialmente malignas. Desse grupo faziam parte 22 indivíduos diagnosticados com carcinoma, 28 com displasia moderada/severa, 33 com hiperkeratose + acantose + displasia leve, 22 com líquen plano e 72 faziam parte do grupo controle. Na tabela 3, é possível observar que as frequências totais dos genótipos observados são similares aos esperados, e que os mesmos se enquadraram no equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p=0,18$).

Tabela 3: Frequência dos genótipos em lesões pré-malignas, malignas e controles

Genótipo	Frequência Esperada	Frequência Observada
C/C	59,7	61
T/C	82,7	80
T/T	28,7	30

Os genótipos, tanto independente do diagnóstico quanto em relação a cada diagnóstico podem ser observados na tabela 4. Nela, pode-se perceber que o genótipo TC, com 45,2% foi o de maior frequência, independente do diagnóstico. Se analisarmos a frequência dos genótipos em relação a cada diagnóstico, o genótipo de maior frequência em carcinoma, displasia moderada/severa e no grupo controle foi também o TC. Porém, em hiperkeratose+acantose+displasia leve e no líquen plano observou-se uma maior porcentagem do genótipo CC, quando comparados com os demais diagnósticos e com o grupo controle. Esta mesma população já foi avaliada para polimorfismos do códon 72 do gene da *p53*, onde o líquen plano

também apresentou uma inversão da frequência do genótipo em relação aos demais diagnósticos, sendo encontrada uma maior presença do genótipo homozigoto (Nedel, et al., 2010).

Tabela 4: Porcentagem dos genótipos em lesões malignas e pré-malignas

Diagnóstico	Genótipo			Total
	TT(%)	TC (%)	CC (%)	
Carcinoma	5 (22,7)	10 (45,5)	7 (31,8)	22
Displasia Moderada/Severa	3 (10,7)	16 (57,2)	9 (32,1)	28
Hiperkeratose + Acantose + Displasia Leve	6 (18,2)	13 (39,4)	14 (42,4)	33
Líquen Plano	3 (13,6)	9 (40,9)	10 (45,5)	22
Controle	13 (18)	32 (44,5)	27 (37,5)	72
Total	30(16,95)	80 (45,2)	67 (37,85)	=177

A literatura a respeito do polimorfismo T102C vêm sugerindo uma provável relação entre os genótipos CC do polimorfismo T102C com doenças neuropsiquiátricas, incluindo dependência ao tabaco, álcool e drogas. Em relação ao álcool, alguns pesquisadores afirmam que esse genótipo tem relação com as recaídas nos tratamentos, com a iniciação e continuidade do vício (JAKUBCZK, 2013; LI et al., 2009). Na tabela 5, podemos analisar os resultados sobre o hábito de ingerir bebidas alcoólicas. Observando apenas os genótipos sem considerar o diagnóstico, percebe-se que o heterozigoto TC apresentou a maior porcentagem entre os indivíduos que afirmaram serem consumidores de substâncias etílicas. Esse genótipo foi também o que apresentou maior porcentagem entre os indivíduos que não tem o hábito de beber. Ao analisar separadamente os genótipos dos indivíduos que bebem em relação ao diagnóstico, percebemos uma maior porcentagem do TC

em carcinoma e no grupo controle, houve maior frequência do CC em displasia moderada/severa, hiperkeratose+acantose+displasia leve e no líquen plano. Assim, o alelo C, em especial o genótipo CC, parece estar mais vinculado ao câncer de boca+ consumo de álcool nos momentos iniciais do desenvolvimento do carcinoma, tendo em vista que o carcinoma é frequentemente precedido de uma displasia. Entre os indivíduos que não bebem, os genótipos que prevaleceram foram o CC e TC ambos com a mesma porcentagem em carcinoma, TC em displasia moderada/severa, hiperkeratose+acantose+displasia leve e no grupo controle, e por fim, no líquen plano os genótipos TC e CC apresentaram a mesma frequência. Além disso, pode-se perceber que o genótipo TT não apresentou maior frequência em nenhum dos casos analisados. Assim, o presente estudo corrobora com a literatura, uma vez que apresentou uma prevalência do alelo C em indivíduos etilistas.

Tabela 5: Hábito de ingerir bebidas alcoólicas

Diagnóstico	Genótipo								
	TT		TC		CC		Total		S/ inf.
Hábito de ingerir bebidas alcoólicas	S (%)	N (%)	S (%)	N (%)	S (%)	N (%)	S (%)	N (%)	
Carcinoma	1 (10)	1 (20)	6 (60)	2 (40)	3 (30)	2 (40)	10 (45,4)	5 (22,7)	7
Displasia Moderada/Severa	0 (0)	3 (23,08)	3 (33,33)	9 (69,23)	6 (66,67)	1 (7,69)	9 (32,1)	13 (46,4)	6
Hiperkeratose + Acantose + Displasia Leve	2 (25)	2 (28,57)	2 (25)	3 (42,86)	4 (50)	2 (28,57)	8 (24,2)	7 (21,2)	18

Líquén Plano	0 (0)	1 (9)	1 (20)	5 (45,4)	4 (80)	5 (45,4)	5 (22,7)	11 (50)	6
Controle	1 (9)	11 (20,7)	8 (72,7)	24 (45,2)	2 (18,1)	18 (33,9)	11 (15,2)	53 (73,6)	8
Total	4 (9,3)	18 (20,2)	20 (46,5)	43 (48,3)	19 (44,2)	28 (31,5)	43	89	45

Segundo Carrard, et al., 2008, a quantidade de bebida alcoólica ingerida e a duração do hábito são fatores mais importantes do que o tipo de bebida ingerida em relação ao aumento da probabilidade de gerar tumores (CARRARD, 2008).

Tabela 6: Ingestão de bebidas alcoólicas/semana- Carcinoma

Diagnóstico	Genótipo					
	1- Carcinoma	TT (%)	TC (%)	CC (%)	Total	S / inf.
Ingestão de bebidas alcoólicas/Semana						
1 dia /Semana	0 (0)	1 (50)	1 (50)	2		
Até 4 dias/Semana	0 (0)	2 (100)	0 (0)	2	2	
Até 7 dias/Semana	0 (0)	2 (50)	2 (50)	4		
Total	0 (0)	5 (62,5)	3 (37,5)	8		

Nesse contexto, foi analisada também a frequência com que os pacientes ingeriam bebida alcoólica por semana. Na tabela 6, analisou-se essa característica em relação ao carcinoma. Dos indivíduos acometidos pela doença, houve predomínio do genótipo TC, independente da frequência com que bebiam. Ao considerar a frequência até 1 e 7 dias na semana, 2 genótipos compartilharam a maior porcentagem, sendo eles o TC e o CC. Até 4 dias por semana o mais frequente foi o TC.

Nas tabelas 7 e 8 observa-se, em relação a displasia moderada-severa e a hiperkeratose + acantose + displasia leve, uma maior prevalência do genótipo CC, sem considerar a frequência de ingestão de álcool. Em ambas as tabelas observa-se que até 4 dias na semana, os genótipos TC e CC são mais prevalentes, até 7 dias por semana CC foi o de maior porcentagem. Porém, em relação a frequência de ingestão de apenas 1 dia por semana, os resultados foram diferentes, na displasia moderada-severa o homozigoto CC foi o mais prevalente enquanto em pacientes diagnosticados com hiperkeratose + acantose + displasia leve o genótipo TC foi o de maior frequência.

Tabela 7: Ingestão de bebidas *alcoólicas*/semana- Displasia moderada/severa

Diagnóstico	Genótipo			Total
	TT (%)	TC (%)	CC (%)	
2- Displasia Moderada-Severa				
Ingestão de bebidas alcoólicas/Semana				
1 dia /Semana	0 (0)	0 (0)	1 (100)	1
Até 4 dias/Semana	0 (0)	1 (50)	1 (50)	2
Até 7 dias/Semana	0 (0)	2 (33,33)	4 (66,67)	6

Total	0 (0)	3 (33,33)	6 (66,67)			9
--------------	------------------------	----------------------------	----------------------------	--	--	----------

Tabela 8: Ingestão de bebidas alcoólicas/semana- Hiperkeratose + Acantose + Displasia Leve

Diagnóstico	Genótipo			Total
	TT (%)	TC (%)	CC (%)	
3- Hiperkeratose + Acantose + Displasia Leve				
Ingestão de bebidas alcoólicas/Semana				
1 dia /Semana	0 (0)	1 (100)	0 (0)	1
Até 4 dias/Semana	0 (0)	1 (50)	1 (50)	2
Até 7 dias/Semana	2 (40)	0 (0)	3 (60)	5
Total	2 (25)	2 (25)	4 (50)	8

Na tabela 9, foi possível verificar a frequência de ingestão de bebidas alcoólicas por pacientes com líquen plano. Analisando somente o genótipo sem considerar a frequência, o homocigoto CC foi o mais frequente, e o mesmo aconteceu em até 1 dia por semana e até 4 dias por semana. Por fim, não houve pacientes que afirmaram ingerir álcool até 7 dias por semana.

Tabela 9: Ingestão de bebidas alcoólicas/semana- Líquen Plano

Diagnóstico	Genótipo			Total	S /inf.
	TT (%)	TC (%)	CC (%)		
4- Líquen Plano					
Ingestão de bebidas alcoólicas/Semana					
1 dia /Semana	0 (0)	0 (0)	3 (100)	3	
Até 4 dias/Semana	0	0	1	1	1

Até 7 dias/Semana	(0) 0	(0) 0	(100) 0	0
Total	0 (0)	0 (0)	4 (100)	4

Já no grupo controle, observado na tabela 10, sem considerar o diagnóstico, que o genótipo de maior frequência foi o TC, e o mesmo aconteceu em até 1 dia por semana e até 4 dias por semana. E assim como na tabela anterior, não houve pacientes que afirmaram ingerir álcool até 7 dias por semana.

Tabela 10: Ingestão de bebidas alcoólicas/semana- Controle

Diagnóstico	Genótipo			Total
	0- Controle	TT (%)	TC (%)	
Ingestão de bebidas alcoólicas/Semana				
1 dia /Semana	1 (11,11)	6 (66,67)	2 (22,22)	9
Até 4 dias/Semana	0 (0)	2 (100)	0 (0)	2
Até 7 dias/Semana	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0
Total	1 (9,1)	8 (72,72)	2 (18,18)	11

Outro importante fator etiológico para o advento do câncer de boca foi analisado, o fumo. Diversos estudos apresentam teorias em relação ao polimorfismo T102C do receptor 5HT2A e o hábito de fumar, os pesquisadores afirmam que o polimorfismo contribui para a manutenção do vício, que o genótipo CC é mais encontrado em fumantes, entre outras hipóteses (RAMOS NETO et al., 2014; LIMA, 2004). Na tabela 11 pode-se fazer uma análise dos resultados sobre o hábito de fumar. Independente do diagnóstico pode-se perceber que os genótipos TC e CC apresentaram a maior frequência em indivíduos fumantes, ambos com 41,1%, sendo o TC o genótipo de maior frequência entre os não fumantes, com 52%. Analisando

separadamente os indivíduos que fumam em relação ao diagnóstico carcinoma, o genótipo que prevaleceu foi o TC. Em displasia moderada/severa e hiperqueratose + acantose + displasia leve os genótipos TC e CC apareceram com a maior frequência, apresentando porcentagens iguais para ambos os genótipos. No líquen plano o CC foi o de maior prevalência. Observando os resultados dos indivíduos não fumantes, percebe-se que em displasia moderada/severa, hiperqueratose + acantose + displasia leve, líquen plano e grupo controle, o genótipo heterozigoto foi o mais comum, porém, o mesmo não aconteceu no carcinoma, onde o CC foi o prevalente. Da mesma forma como na análise da tabela anterior, o genótipo TT não foi o mais frequente em nenhum dos casos avaliados.

Tabela 11: Hábito de fumo

Diagnóstico	Genótipo								Sem inf.
	TT		TC		CC		Total		
Hábito de fumo	S (%)	N (%)	S (%)	N (%)	S (%)	N (%)	S (%)	N (%)	
Carcinoma	2 (16,6)	0 (0)	6 (50)	1 (33,3 3)	4 (33,3)	2 (66,6 7)	12 (54,5)	3 (13,6)	7
Displasia Moderada/Severa	2 (12,5)	1 (16,6 7)	7 (43,7 5)	5 (83,3)	7 (43,7 5)	0 (0)	16 (57,1)	6 (21,4)	6
Hiperqueratose + Acantose + Displasia Leve	3 (27,2 8)	0 (0)	4 (36,3 6)	2 (66,6 7)	4 (36,3)	1 (33,3 3)	11 (33,3)	3 (9,0)	19
Líquen Plano	1 (12,5)	0 (0)	1 (12,5)	3 (75)	6 (75)	1 (25)	8 (36,3)	4 (18,1)	10
Controle	1 (25)	11 (18,6 4)	3 (75)	28 (47,4 6)	0 (0)	20 (33,)	4 (5,5) 51	59 (81,9) 75	9
Total	9 (17,6 6)	12 (16)	21 (41,1 7)	39 (52)	21 (41,1 7)	24 (32)			51

Analisou-se também a quantidade de cigarros fumados por dia. Na tabela 12, dos pacientes acometidos com carcinoma, independente da quantidade de cigarros fumados por dia, o genótipo que prevaleceu foi o TC. O mesmo se repetiu nos indivíduos que afirmaram fumar até 5 unidades por dia. Dentre os que fumam até 10 unidades por dia, os genótipos TT e TC foram o de maior frequência. E entre os pacientes que fumavam mais de 10 cigarros por dia houve porcentagem iguais dos genótipos TC e CC.

Tabela 12: Quantidade de cigarros por unidade- Carcinoma

Diagnóstico	Genótipo			Total
	<i>TT (%)</i>	<i>TC (%)</i>	<i>CC (%)</i>	
1- Carcinoma				
Quantidade de cigarros- Por unidade				
Até 5 unidades/Dia	0 (0)	2 (66,67)	1 (33,33)	3
Até 10 unidades/Dia	1 (50)	1 (50)	0 (0)	2
Mais de 10 unidades/Dia	1 (14,28)	3 (42,86)	3 (42,86)	7
Total	2 (16,67)	6 (50)	4 (33,33)	12

Na tabela 13, podemos avaliar a quantidade de cigarros fumados por dia em pacientes diagnosticados com displasia moderada-severa. Nesse caso, sem considerar a quantidade de cigarros fumados prevaleceu os genótipos TC e CC, ambos com 43,7%. O genótipo CC foi o de maior porcentagem em indivíduos que fumavam até 5 unidades por dia, e o heterozigoto TC foi o mais frequente naqueles que fumavam mais de 10 cigarros por dia. Na opção até 10 cigarros por dia 2 genótipos compartilharam da maior porcentagem, o CC e o TC.

Tabela 13: Quantidade de cigarros por unidade- Displasia Moderada/Severa

Diagnóstico	Genótipo			Total
	TT (%)	TC (%)	CC (%)	
2- Displasia Moderada-Severa				
Quantidade de cigarros- Por unidade				
Até 5 unidades/Dia	0 (0)	0 (0)	1 (100)	1
Até 10 unidades/Dia	0 (0)	4 (50)	4 (50)	8
Mais de 10 unidades/Dia	2 (28,57)	3 (42,86)	2 (28,57)	7
Total	2 (12,5)	7 (43,75)	7 (43,75)	16

Na tabela 14, referente à quantidade de cigarros por indivíduos com hiperkeratose+acantose+displasia leve, nota-se que não houve pacientes que afirmaram fumar até 5 unidades por dia. Em relação a opção até 10 cigarros por dia o genótipo que prevaleceu foi o CC, e o TC foi o mais frequente em pacientes que fumavam mais de 10 cigarros por dia. Ao analisar somente o genótipo sem levar em consideração a quantidade de cigarros fumados, TC e CC apresentaram a maior porcentagem, ambos com 36,3%.

Tabela 14: Quantidade de cigarros por unidade- Hiperkeratose+Acantose+Displ.Leve

Diagnóstico	Genótipo			Total
	TT (%)	TC (%)	CC (%)	
3- Hiperkeratose + Acantose + Displasia Leve				
Quantidade de cigarros- Por unidade				
Até 5 unidades/Dia	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0
Até 10 unidades/Dia	1 (33,33)	0 (0)	2 (66,67)	3
Mais de 10 unidades/Dia	2 (25)	4 (50)	2 (25)	8
Total	3 (27,28)	4 (36,36)	4 (36,36)	11

Na tabela 15, foi possível verificar a quantidade de cigarros fumados por dia por pacientes com líquen plano. Analisando somente o genótipo sem considerar a quantidade de cigarros, o homozigoto CC foi o mais frequente, e o mesmo aconteceu em até 5, e mais de 10 cigarros fumados por dia. O alelo TC e CC foram os mais prevalentes em pacientes que afirmavam fumar até 10 unidades por dia, ambos com 50%.

Tabela 15: Quantidade de cigarros por unidade-Líquen Plano

Diagnóstico	Genótipo			Total
	4- Líquen Plano	TT (%)	TC (%)	
Quantidade de cigarros- Por unidade				
Até 5 unidades/Dia	1 (33,33)	0 (0)	2 (66,67)	3
Até 10 unidades/Dia	0 (0)	1 (50)	1 (50)	2
Mais de 10 unidades/Dia	0 (0)	0 (0)	3 (100)	3
Total	1 (12,5)	1 (12,5)	6 (75)	8

Por fim, o grupo controle também foi analisado com relação a quantidade de cigarros fumados por dia, os resultados podem ser observados na tabela 16. Considerando apenas os genótipos sem levar em consideração a quantidade de cigarros fumados diariamente, o TC foi o prevalente, com 75%. Porém, se consideradas as quantidades diárias, o TC novamente foi o de maior porcentagem tanto em pacientes que afirmaram fumar até 5 e até 10 cigarros por dia. O mesmo não aconteceu na opção mais de 10 unidades, onde os genótipos TT e TC compartilharam a maior frequência, ambos com 50%.

Tabela 16: Quantidade de cigarros por unidade-Controle

Diagnóstico	Genótipo			Total
	0- Controle	TT (%)	TC (%)	
Quantidade de cigarros- Por unidade				
Até 5 unidades/Dia	0 (0)	1 (100)	0 (0)	1
Até 10 unidades/Dia	0 (0)	1 (100)	0 (0)	1
Mais de 10 unidades/Dia	1 (50)	1 (50)	0 (0)	2
Total	1 (25)	3 (75)	0 (0)	4

O presente estudo apresenta limitações, em especial com relação ao número amostral, onde a estratificação em grupos de diagnóstico, etilistas e não-etilistas, fumantes e não fumantes, reduziu ainda mais o poder da amostra. No entanto, um resultado que parece bastante recorrente é a relação entre o alelo C e a dependência de fumo e álcool, o qual corrobora com os achados da literatura. Ainda, com relação ao fumo, independente do número de unidades/dia, com exceção do carcinoma, o restante das lesões parecem estar relacionadas com o genótipo CC ou TC e CC, com porcentagem igual entre estes dois últimos genótipos. Com o hábito de ingerir bebidas alcoólicas o mesmo ocorre, onde, com exceção novamente do carcinoma, nas demais lesões prevalece o genótipo CC. Este fato denota que o hábito de fumar e consumir álcool pode estar associado ao alelo C, o que parece ser um aspecto importante nos momentos iniciais da carcinogênese, uma vez que o carcinoma é frequentemente precedido de lesões potencialmente malignas, e o alelo C foi encontrado em maior frequência em lesões displásicas e de líquen plano quando comparadas com o carcinoma. Com relação ao líquen plano o mesmo mostrou-se positivamente ligado ao alelo C tanto quando correlacionado com o hábito do fumo como do álcool. O líquen plano tem sido considerado uma doença inflamatória do epitélio escamoso estratificado, contudo o presente resultado pode

despertar a atenção para os aspectos relacionados ao fumo e álcool em associação com genótipo T102C do receptor 5HT2A no desencadeamento e/ou manutenção desta patologia.

6 Conclusões

Os resultados apontam para uma associação positiva entre o alelo C e o hábito do fumo e álcool. Este alelo parece ter importância nos momentos iniciais da carcinogênese, uma vez que o alelo C foi encontrado em maior frequência em lesões displásicas e de líquen plano quando comparadas com o carcinoma e o grupo controle. Ainda, observa-se um indicativo de que aspectos relacionados ao fumo e álcool em associação com genótipo T102C do receptor 5HT2A podem estar envolvidos no desencadeamento e/ou manutenção do líquen plano. Contudo, o presente estudo apresenta limitações, em especial no aspecto do número amostral, neste sentido os autores pretendem ampliar a amostra no intuito de obter respostas referentes aos questionamentos levantados neste trabalho.

Referências bibliográficas

ALFIMOVA, M.V; MONAKHOV, M.V; ABRAMOVA, L.1; GOLUBEY, S.A; GOLIMBET, V.E. Polymorphism of serotonin receptor genes (5-HTR2A) and Dysbind in (DTNBP1) and individual components of short-term verbal memory processes in Schizophrenia. **NeurosciBehav Physiol.** v.40, n.8, p.934-40, 2010.

BATRA, V; PATKAR, A.A; BERRETTINI, W.H; WEINSTEIN, S.P.The genetic determinants of smoking. **Chest** v. 123, n. 5, p. 1730-1739, 2003.

BRENER, S; JEUNON, F.A; BARBOSA, A.A; GRANDINETTI, H.A.M. Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão de literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. **Revista Brasileira de Cancerologia.** v. 53, n. 1, p. 63-69, 2007.

BITTAR, T.O; PARANHOS, L.R; FORNAZARI, D.H; PEREIRA, A.C. Epidemiological features of oral cancer – a world public health matter. **RFO,** v. 15, n. 1, p. 87-93, 2010.

CARRARD, V.C; PIRES, A.S; PAIVA, R.L; CHAVES, A.C.M; FILHO, M.S. Alcohol and Oral Cancer: Comments on Related Mechanisms. **Revista Brasileira de Cancerologia.** v. 54, n. 1, p. 49-56, 2008.

CARVALHO, S.H.G. Epidemiological Survey of Oral Cancer Cases in a Reference Hospital of Campina Grande, State of Paraíba, Brazil. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr.** v. 12, n. 1, p. 47-51, 2012.

CHOI, J.H; SHANG, S.Y; PARK, K.W; CHO, Y.S; LEE, M.M. The association between the T102C polymorphism of the HTR2A serotonin receptor gene and HDL cholesterol level in Koreans. **J Biochem Mol Biol.** v.38, n.2, p.238-42, 2005.

DICKOW, L.L, KOCHÉ, A. O polimorfismo do receptor 2A da 5-Hidroxitriptamina (5-HTR2A) e a incidência de doença depressiva no Vale do Rio Pardo. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. v. 2, n.4, p. 7-15, 2011.

DOS SANTOS, V.A. **Inter-relações entre tabagismo, sintomas depressivos e genética**. 2011. Tese de Doutorado (Doutorado em Clínicas Médicas) - Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

FROTA, A.R.S. **Orientação sobre prevenção de câncer bucal e auto-exame**. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Atenção Básica em Saúde da Família) - Universidade Federal de Minas Gerais.

GOLIMBET, V.E; LAVRUSHINA, O.M; KALEDA, V.G; ABRAMOVA, L.I; LEZHEIKO, T.V. Supportive evidence for the association between the T102C 5-HTR2A gene polymorphism and schizophrenia: a large-scale case-control and family-based study. **EurPsychiatry**.v. 22, n. 3, p.167-70, 2007.

GOMES, F.G. **Avaliação quantitativa e qualitativa de DNA obtido a partir de lesões potencialmente malignas e do carcinoma espinocelular de boca**. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas – Bacharelado) - Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

GUERRA, M.R; GALLO, C.V.M; MENDONÇA, G.A.S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 51, n.3, p. 227-234, 2005.

HONG, W.K; TYNDALE, R; SPITZ, M. **Biology of tobacco and smoking**. Editora ASCO. Educational Book- 38th Annual Meeting, p. 4-17, 2002.

HWO, H.G; CHEN, C.H. Association of 5-HT_{2A} receptor gene polymorphism and alcohol abuse with behavior problems. **American Journal of Medical Genetics**. v.4, p. 797-800, 2000.

INCA. Câncer de Boca – Instituto Nacional do Câncer. Capturado em 10 de outubro de 2014. **Online**. Disponível na internet: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/boca+/definicao>

INCA. ABC do câncer. Capturado em 20 de outubro de 2014. **Online**. Disponível na internet: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/abc_do_cancer.pdf

JAKUBCZYK, A; WROZOSEK, M; LUKASZKIEWICZ, J; SADOWSKA-MAZURYK, J; MATSUMOTO, H; SLIWERSKA, E. The CC genotype in HTR_{2A} T102C polymorphism is associated with behavioral impulsivity in alcohol-dependent patients. **J Psychiatr Res**. v. 46, n. 1, p. 44-49, 2012.

JAKUBCZYK, A; KLIMKIEWICZ, A; KOPERA, M; KRASOWSKA, A; MATSUMOTO, H; BROWER, K.J; WOJNAR, M. The CC genotype in the T102C HTR_{2A} polymorphism predicts relapse in individuals after alcohol treatment. **J Psychiatr Res**. v. 47, n.4, p. 527–533, 2013.

JOBIM, P.F.C. **Possível influência do polimorfismo T102C do gene 5HT_{2A} no tempo de vida médio dos seres humanos**. 2008. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Médicas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

JOKELA, M; LEHTIMAK, T; KELTIKANGAS-JARVINEN, L. The influence of urban/rural residency on depressive symptoms is moderated by the serotonin receptor 2A gene. **Am J MedGenet B NeuropsychiatrGenet**. v.144, n.7, p.918-22, 2007.

KELTIKANGAS-JARVINEN, L; JOKELA, M; HINTSANEN, M; SALO, J; HINTSA, T; et al. Does genetic background moderate the association between parental education and school achievement? **Genes Brain Behav.** v.9, n.3, p.318-24, 2010.

KIRBY, L.G; ZEEB, F.D; WINSTANLEY, C.A. Contributions of Serotonin in Addiction Vulnerability. **Neuropharmacology.** v. 61, n. 3, p. 421-432, 2011.

KLING, A; SEDDIGHZADEH, M; ALFREDSSON, L; RANTAPAA-DAHLQVIST, S; PADYUKOV, L. Genetic variations in the serotonin 5-HT_{2A} receptor gene (HTR2A) are associated with rheumatoid arthritis. **NanRheumDis.** v.67, n.8, p.1111-5, 2008.

LEITE, A.C.E; GUERRA, E.N.S; MELO, N.S. Risk factors related to development of oral cancer: a revision. **Rev. de Clín. Pesq. Odontol.**, v.1, n.3, 2005.

LI, M.D; CHENG, R; MA, J.Z; SWAN, G.E. A meta-analysis of estimated genetic and environmental effects on smoking behavior in male and female adult twins. **Addiction.** v. 98, n. 1, p. 23-31, 2003.

LI, C.S; LUO, X; YAN, P; BERGQUIST, K; SINHA, R. Altered Impulse Control in Alcohol Dependence: Neural Measures of Stop Signal Performance. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research.** v. 33, n. 4, p. 7340-750, 2009.

LIMA, P.A.S.P. **O polimorfismo T102C do receptor serotoninérgico 5HT_{2A} participa na manutenção do tabagismo e dos mecanismos de preferência alimentar.** 2004. Tese de Doutorado (Doutorado em Bioquímica) - Curso de pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

LIN, E; CHEN, P.S; CHANG, H.H; GEAN, P.W; TSAI, H.C; YANG, Y.K. Interaction of serotonin-related genes affects short-term antidepressant response in major

depressive disorder. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. v. 33, n. 7, p. 1167-1172, 2009.

MARKOUTSAKI, T; KARANTANOS, T; GAZOULI, M; ANAGNOU, NP; KARAMANOLIS, D.G. 5-HT_{2A} receptor gene polymorphisms and irritable bowel syndrome. **J Clin Gastroenterol**. v.45, n.6, p. 514-7, 2011.

MATEUS, F.O. **Câncer bucal no Brasil: Revisão de literatura**. 2008. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Saúde Pública) - Departamento de Medicina Social, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

MEHROTRA, R; YADAV, S. Oral squamous cell carcinoma: Etiology, pathogenesis and prognostic value of genomic alterations. **Indian Journal of Cancer**. v. 43, n. 2, p. 60-66, 2006.

MELO, L. C; SILVA, M.C; BERNARDO, J.M.P; MARQUES, E.B; LEITE, I.C.G. Perfil epidemiológico de casos incidentes de câncer de boca e faringe. **RGO - Rev Gaúcha Odontologia**, Porto Alegre, v. 58, n. 3, p. 351-355, 2010.

MERGENER, M; BECKER, R.M; DOS SANTOS, A.F; DOS SANTOS, G.A; DE ANDRADE, F.M. Influence of the interaction between environmental quality and T102C SNP in the HTR_{2A} gene on fibromyalgia susceptibility. **Ver Bras Reumatol**. v. 51, n.6, p.594-602, 2011.

MIGOTT, A.M.B. **Um estudo do polimorfismo 5HT_{2A} como elo entre tabagismo e depressão**. 2007. Tese de Doutorado (Programa de Pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

MIGUITA, K; CORDEIRO, Q; SHAVITT, R.G; MIGUEL, E.C, VALLADA, H. Association study between genetic monoaminergic polymorphisms and OCD

response to clomipramine treatment. **Arq Neuropsiquiatr.** v. 69, n.2B, p.283-7, 2011.

NEDEL, F.; CONDE; M.C.M., OLIVEIRA, I.O.; TARQUINIO, S.B.C.; DEMARCO, F.F. Comparison Between DNA Obtained From Buccal Cells of the Upper and Lower Gutter Area. **Brazilian Dental Journal**, v. 20, n. 4, p. 275-278, 2009.

NEDEL, F. THUROW, H.S; YURGEL, V; TARQUINIO, S; COLLARES, T; SEIXAS, F.K. Frequência dos polimorfismos do códon 72 do gene da p53 em lesões bucais pré-malignas e malignas: Estudo piloto. **XIX Congresso de Iniciação Científica**, Ufpel, Anais Ciências da Saúde. Pelotas, Pelotas, 2010.

OLIVEIRA, J.M.B; PINTO, L.O; LIMA, N.G.M; ALMEIDA, G.C.M. Câncer de Boca: Avaliação do Conhecimento de Acadêmicos de Odontologia e Enfermagem quanto aos Fatores de Risco e Procedimentos de Diagnóstico. **Revista Brasileira de Cancerologia** v. 59, n. 2, p. 211-218, 2013.

PEÑAS-LLEDÓ; E.M; DORADO, P; CÁCERES, M.C; LLERENA, A .Association between T102C and A-1438G polymorphisms in the serotonin receptor 2A (5-HT2A) gene and schizophrenia: relevance for treatment with anti psychotic drugs. **ClinChemLab Med.** v. 45, n.7, p.835-8, 2007.

PETERS, M.E; VAIDYA, V; DRYE, L.T, ROSENBERG, P.B; MARTIN, B.K; PORTEINSSON, A.P. Sertraline for the treatment of depression in Alzheimer disease: genetic influences. **J Geriatr Psychiatry Neurol.** v. 24, n. 4, p. 222-228, 2011.

POLESSAKAYA, O.O; SOKOLOV, B.P. Differential expression of the "C" and "T" alleles of the 5-HT2A receptor gene in the temporal cortex of normal and schizophrenics. **Journal of Neuroscience Research.** v. 67, p. 812-822, 2002.

PIATTO, V.B; CARVALHO, T.B; DEMARCHI, N.S; MOLINA, F.D; MANIGLIA, J.V. Polymorphisms in the 5-HTR2A gene related to obstructive sleep apnea syndrome.

Braz J Otorhinolaryngol. v.77, n.3, p.348-55, 2011.

RAMOS NETO, E.S; MÁGULAS, J.O; SOUSA, J.J; MOURA, A.C; PINTO, G.R; YOSHIOKA, F.K; CANALLE, R; MOTTA, F.J. Study of polymorphic variants of the serotonin 2A receptor gene (5-HT2A) and its possible effects on smoking habits of a population from north eastern Brazil. **Genet Mol Res.** v. 13, n.4, p.8268-77, 2014.

SAAD, E.D.; MALUF, F.C; HOFF, P.M. **Oncologia em evidência.** Dendrix Edição e Design Ltda, 1. Ed., São Paulo, 2009.

SALO, J; JOKELA, M; LEHTIMAK, T; KELTIKANGAS-JARVIVEN, L. Serotonin receptor 2A gene moderates the effect of childhood maternal nurturance on adulthood social attachment. **Genes Brain Behav.** v. 10, n. 7, p.702-9, 2011.

SARTORI, L.C. **Rastreamento do câncer bucal: aplicações no Programa Saúde da Família.** 2004. Dissertação de Mestrado (Programa de PósGraduação em Saúde Pública) – Universidade de São Paulo.

SCHWANKE, C.H; BITTENCOURT, L; NORONHA, J.A; JUNG, I.E; CRUZ, I.B. Is there an association between T102C polymorphism of the serotonin receptor 2A gene and urinary incontinence? **Braz J Med Biol Res.** v. 40, n.10, p. 1315-22, 2007.

SURIYAPROM, K; PHONRAT, B; CHUENSUMRAN, U; TUNGTRONGCHITR, A. Association of HTTLPR and 5HT2A T102C polymorphisms with smoking characteristics and anthropometric profiles of Thai males. **Genetics and Molecular Research.** v. 11, n. 4, p.4360-4369, 2012.

TEIXEIRA, A.K..M; ALMEIDA, M.E.L; HOLANDA, M.E; SOUZA, F.B; ALMEIDA, P.C. Carcinoma Espinocelular da Cavidade Bucal: um Estudo Epidemiológico na Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 55, n. 3, p. 229-236, 2009.

Toda Biologia. Capturado em 08 de outubro de 2014. **Online**. Disponível em <http://www.todabiologia.com/dicionario/serotonina.htm>

TSUNOKA, T; KISHIJ, T; KITAJIMA, T; OKOCHI, T, OKUMURA, T; et al. Association analysis of GRM2 and HTR2A with methamphetamine-induced psychosis and schizophrenia in the Japanese population. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. v.34, n.4, p.639-44, 2010.

VARGAS-FERREIRA, F; NEDEL, F; ETGES, A; GOMES, A.P; FURUSE, C; TARQUINIO, S.B. Etiologic factors associated with oral squamous cell carcinoma in non-smokers and non-alcoholic drinkers: a brief approach. **Braz Dent J**. v. 23, n. 5, p. 586-90, 2012.

WHITE, M.J; YOUNG, R.M; MORRIS, C.P. Cigarette smoking in Young adults: The influence of the HTR2A T102C polymorphism and punishment sensitivity. **Drug and Alcohol Dependence**. v. 114, n. 2-3, p. 140-146, 2011.

WRZOSEK, M; JAKUBCZYK, A; MATSUMOTO, H; LUKASZKIEWICZ, J; BROWER, K.J; WOJNAR, M. Serotonin 2A receptor gene (HTR2A) polymorphism in alcohol-dependent patients. **Pharmacol Rep**. v. 64, n. 2, p. 449-453, 2012.

ZHANG, J; SHEN, Y; HE, G; LI, X; MENG, J, et al. Lack of association between three serotonin genes and suicidal behavior in Chinese psychiatric patients. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. v.32, n.2, p.467-71, 2008.

Apêndices

Apêndice A: Termo de consentimento livre e esclarecido

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Carta de Informação ao Paciente

Neste estudo serão examinados os pacientes que utilizam os serviços do Centro de Diagnóstico das Doenças da Boca (CDOB), com idade superior ou igual a 45 anos, colhendo-se a história da evolução de cada lesão; e realizando-se um exame interno e externo da boca, sendo avaliada a necessidade de realização de biópsias de diagnóstico microscópico.

Serão coletadas amostras da mucosa bucal, utilizando escovinhas especiais que serão esfregadas sobre a região da lesão por aproximadamente 30 segundos, após a anestesia, realizando quatro coletas para análise do material genético. As técnicas utilizadas neste estudo tem como objetivo estudar os genes que podem estar envolvidos no desenvolvimento do câncer de boca. Os protocolos utilizados não implicam em nenhum risco à saúde física e mental do indivíduo.

Desta forma, estando informado do estudo que será realizado, dou pleno consentimento à Faculdade de Odontologia de Pelotas e ao Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal de Pelotas para que, por intermédio de seus professores, alunos de pós-graduação e graduação devidamente autorizados, utilizem o material biológico coletado, de acordo com os conhecimentos científicos e de forma ética.

Concordo também, que a documentação relativa ao estudo deverá ser arquivada na Faculdade de Odontologia e mantida sob a guarda dos autores do projeto de pesquisa, que se comprometem a manter sigilo dos dados coletados, e também a garantir que as informações geradas pelos resultados deste trabalho serão divulgadas apenas com finalidade científica e de ensino, preservando-se, totalmente, o anonimato dos pacientes. Assim, dou aos autores deste projeto de pesquisa, plenos direitos de uso, para fins de ensino e divulgação, respeitando os respectivos códigos de ética.

Pelotas, _____ de _____ de 2011.

Assinatura do paciente

Documento: _____
N.º _____

Termo de consentimento ético para pesquisa em seres humanos

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Autorização para Pesquisa e Execução de Tratamento

Projeto: *AÇÕES COLETIVAS PARA A PREVENÇÃO e DETECÇÃO do CÂNCER de BOCA E IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES DO CARCINOMA ESPINOCELULAR NA POPULAÇÃO DA REGIÃO SUL DO RIO GRANDE DO SUL*

Responsável: Prof. Dra. Sandra Beatriz Chaves Tarquinio

NOME DO PACIENTE: _____

FICHA N.º: _____

Por este instrumento que atende às exigências legais, o (a) senhor(a) _____, portador (a) da cédula de identidade n.º _____ SSP/____, após leitura minuciosa da CARTA DE INFORMAÇÃO AO PACIENTE, devidamente explicada pelo(s) profissional(is) em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e do explicado, firma seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO em concordância em participar da pesquisa proposta no que lhe é cabível, conforme a CARTA DE INFORMAÇÃO AO PACIENTE.

Fica claro que o paciente ou seu representante legal pode, a qualquer momento, retirar seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, sem ser prejudicado no tratamento, e deixar de participar do estudo alvo da pesquisa e ciente que todo trabalho realizado torna-se informação confidencial guardada por força do sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética odontológica).

Por estarem entendidos e conformados, assinam o presente termo.

Pelotas, ____ de _____ de 2011.

Assinatura do paciente

Responsáveis pelo estudo

Apêndice B: Questionário

QUESTIONÁRIO

1. Até que série tu estudastes na escola? SÉRIE: GRAU:
 2. Terminastes a ___série? N° DE SÉRIES COMPLETAS: GRAU:

HÁBITOS PESSOAIS

Agora vou te perguntar sobre teus hábitos diários.

Primeiro vamos falar sobre cigarro.

NESSA ABORDAGEM, FUMANTE É QUEM FUMA TODOS OS DIAS PELO MENOS 1 CIGARRO POR DIA.

3. Tu costumavas fumar? (1)NÃO (2)SIM (3)EX-FUMANTE SE A RESPOSTA FOR NÃO, PULE PARA A QUESTÃO 7)

SE SIM ou se EX-FUMANTE:

4. Tu fumas/fumavas todos os dias? (1)NÃO (2)SIM-

SE EX-FUMANTE:

5. Há quanto tempo paraste de fumar? ___ dias OU ___ meses OU ___ anos

6. SE SIM OU EX-FUMANTE, preencha o quadro abaixo (perguntando)

a) - Tipo de fumo:

b) - Quantos cigarros por dia? _____

(MARCAR NO QUADRO, AO LADO DE CADA TIPO DE FUMO, O NÚMERO CONSUMIDO POR DIA, LEMBRANDO QUE 1 MAÇO DE CIGARROS= 20 CIGARROS)

a) Tipo de fumo	b) No./dia
<input type="checkbox"/> Cigarro com filtro (comum)	
<input type="checkbox"/> Fumo de corda (rolo)	
<input type="checkbox"/> Cachimbo	
<input type="checkbox"/> Outros:	

Agora vamos falar sobre tomar bebidas quentes (café, chá e outros, menos chimarrão).

CONSIDERADO CONSUMIDOR QUEM TOMA 1 VEZ OU MAIS POR SEMANA. SE FOR MENOS DE 1 VEZ POR SEMANA, PULA AS DEMAIS PERGUNTAS E VAI PARA CHIMARRÃO (PERGUNTA 11)

7. Tu costumavas tomar bebidas quentes como café, chá ou outra (menos chimarrão)?

(1) NÃO (2) SIM (3)BEBIA,MAS PAROU (SE A RESPOSTA FOR NÃO, PULE PARA A QUESTÃO 11)

8. SE SIM OU SE BEBIA MAS PAROU:: Uma vez ou mais por semana? (0)NÃO (1)SIM

9. SE SIM OU SE BEBIA, MAS PAROU: Quantos dias por semana? ___ dias (7) todos os dias

10. SE RESPONDEU SIM À PERGUNTA "UMA VEZ OU MAIS POR SEMANA", PREENCHER O QUADRO ABAIXO (perguntando)

a) - Em que tipo de vasilha tu costumavas/costumavas tomar café, chá ou outra bebida quente? (MARCAR NO QUADRO AS VASILHAS CORRESPONDENTES)

b) - Quantas dessa <vasilha> tu costumavas tomar por dia?
(MARCAR NO QUADRO, AO LADO DE CADA TIPO DE <vasilha> E, O NÚMERO CONSUMIDO POR DIA)

a) Tipo de vasilha	b) N.ºDIA
<input type="checkbox"/> XICARA	
<input type="checkbox"/> MEIA TAÇA	
<input type="checkbox"/> XICARA DE CAFEZINHO	
<input type="checkbox"/> COPO COMUM - 200ml	
<input type="checkbox"/> OUTRO: _____	

Agora vamos falar de chimarrão.

CONSIDERADO CONSUMIDOR QUEM TOMA 1 VEZ OU MAIS POR SEMANA. SE FOR MENOS DE 1 VEZ POR SEMANA, PULA AS DEMAIS PERGUNTAS E VAI PARA ÁLCOOL (PERGUNTA 15)

11. Tu costumavas tomar chimarrão?

(1)NÃO (2)SIM- (3)BEBIA, MAS PAROU (SE A RESPOSTA FOR NÃO, PULE PARA A QUESTÃO 15)

SE SIM OU SE BEBIA MAS PAROU:

12. Uma vez ou mais por semana? (1)Não (2)SIM

13. Quantos dias por semana? _____ DIAS/SEMANA (7) Todos os dias

14. SE RESPONDEU SIM À PERGUNTA "UMA VEZ OU MAIS POR SEMANA", PREENCHER O QUADRO ABAIXO (perguntando)

- A) Tu medes/medias o chimarrão que tu tomas/tomavas em (cuia, térmica ou chaleira)?(MARCAR NO QUADRO AS VASILHAS CORRESPONDENTES)
- B) Quanto tu costumavas tomar por dia?
- C) A <vasilha> que tu costumavas tomar é: (1)pequena (2) grande (3) média

(MARCAR NO QUADRO, AO LADO DE CADA TIPO DE <vasilha>, O TAMANHO E, O NÚMERO CONSUMIDO POR DIA)

A) Vasilha	B) N.ºDIA	C) TAMANHO (pequena, média ou grande)
<input type="checkbox"/> CUIA		
<input type="checkbox"/> CHALEIRA		
<input type="checkbox"/> TÉRMICA		

Agora vamos falar de bebidas de álcool

CONSIDERADO CONSUMIDOR QUEM TOMA 1 VEZ OU MAIS POR SEMANA. SE FOR MENOS DE 1 VEZ POR SEMANA, PULA AS DEMAIS PERGUNTAS E VAI A PERGUNTA 20)

15. Tu costumavas tomar bebidas de álcool?

(1)NÃO (2)SIM- (3)Bebia mas parou (SE A RESPOSTA FOR NÃO, PULE PARA A QUESTÃO 20)

SE SIM OU SE BEBIA MAS PAROU:

16. Uma vez ou mais por semana? (1)Não (2)Sim

17. Há quanto tempo paraste de BEBER? ___ dias OU ___ meses OU ___ anos

SE SIM:

18. Quantos dias por semana? _____ DIAS/SEMANA (7) Todos os dias

19. SE RESPONDEU SIM OU SE BEBIA MAS PAROU, preencher o quadro abaixo (perguntando)

a) -Que bebida tu tomas/tomavas? (ASSINALAR NO QUADRO ABAIXO)

PARA CADA BEBIDA MENCIONADA, PERGUNTAR:

b) -Que tipo de vasilha tu usas/usavas? (ASSINALAR NO QUADRO ABAIXO, MARCANDO O NO. CORRESPONDENTE DÀ VASILHA)

c) - Quantas <vasilha> tu tomas/tomavas por dia? (ANOTAR NO QUADRO ABAIXO)

(01) COPO COMUM (200ml) (de BAR)

(02) TAÇA (cálice)

(03) MARTELO (100ml)

(04) LATA(350,355ml)

(05) GARRAFA PEQUENA (300ml)

(06) GARRAFA MAIOR (600, 720ml)

(07) OUTRO=_____

	RECIPIENTE	N.ºDIA
<input type="checkbox"/> Vinho		
<input type="checkbox"/> Cerveja		
<input type="checkbox"/> Bebidas destiladas (aguardente, vodca, uísque...)		

Outra _____

20. Tu mesmo costumavas examinar a tua boca no espelho,?

(1) NÃO (2) SIM (3) ÀS VEZES (4) NÃO SABE

MUITO OBRIGADA PELA SUA COLABORAÇÃO!!!

Anexos

Anexo A: Parecer do comitê de ética

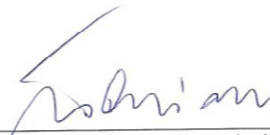


MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PELOTAS, 19 de novembro de 2008.

PARECER Nº 058/2008

O projeto de pesquisa intitulado: “AÇÕES COLETIVAS PARA A PREVENÇÃO E DETECÇÃO DO CÂNCER DE BOCA E IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES DO CARCINOMA ESPINOCELULAR NA POPULAÇÃO DA REGIÃO SUL DO RIO GRANDE DO SUL”, está constituído de forma adequada, cumprindo, nas suas plenitudes preceitos éticos estabelecidos por este Comitê e pela legislação vigente recebendo, portanto, **PARECER FAVORÁVEL** à sua execução.


Prof. Marcos Antonio Torriani
Coordenador do CEP/FO/UFPel
Comitê de Ética e Pesquisa

Anexo B: Protocolo de extração de DNA (PuregeneBuccalCell Kit- Gentra Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota, USA)

Lise celular

1. Lavar a escova num tubo de microcentrífuga contendo 300µl de solução de lise celular, levantando-a e abaixando-a, cerca de 10 vezes;
 2. Adicionar 1,5µl de Proteinase K (20mg/ml) ao lisado celular;
 3. Misturar, por inversão, 25 vezes;
 4. Incubar a 55° C por uma hora ou overnight a 37° C.
- Amostras são estáveis no tampão de lise por ao menos 18 meses à temperatura ambiente.

Tratamento com RNase A

1. Adicionar 1,5µl de Solução de RNase A ao lisado celular;
2. Misturar a amostra, invertendo o tubo 25 vezes;
3. Incubar a 37° C por 15-60 minutos.

Precipitação da proteína

1. Resfriar a amostra à temperatura ambiente;
2. Adicionar 100µl de Solução de precipitação de proteína ao lisado celular;
3. Misturar no agitador, em alta velocidade, por 20 segundos;
4. Colocar o tubo no gelo por 5 minutos;
5. Centrifugar a 13.000-16.000 g por 3 minutos

- Formação de um pellet branco e firme; se ele não se formar, repetir os passos 3,4 e 5.

Precipitação do DNA

1. Transferir o sobrenadante contendo o DNA para um tubo novo de 1,5ml contendo 300 µl de Isopropanol a 100% (2-propanol) e 0,5µl de solução de glicogênio (200mg/ml);
2. Misturar por inversão, delicadamente, 50 vezes;
3. Incubar a temperatura ambiente por no mínimo 5 minutos;
4. Centrifugar a 13.000-16.000 g por 5 minutos (o pellet de DNA, pequeno e branco; pode não ser visível);
5. Desprezar o sobrenadante e secar o tubo sobre um papel absorvente limpo;
6. Adicionar 300µl de Etanol 70% e inverter o tubo várias vezes para lavar o DNA;
7. Centrifugar a 13.000-16.000 g por 1 minuto. Cuidadosamente retirar o etanol (cuidado, o pellet pode ficar frouxo);
8. Inverter o tubo; secar com papel absorvente e deixar ao ar ambiente por 10-15 minutos.

Hidratação do DNA

1. Adicionar 20µl de Solução de hidratação de DNA;
2. Reidratar o DNA incubando a amostra por uma hora a 65° C ou overnight a temperatura ambiente;
3. Armazenar o DNA a 4° C, ou para longo tempo de armazenamento, a -20°C ou -80° C.