

UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PELOTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E COMPORTAMENTO

RAFAELY FERREIRA SEVERO

**ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO DO RECEPTOR 5HT2A COM AS
DISPLASIAS NAS LESÕES BUCAIS POTENCIALMENTE MALIGNAS: UM
ESTUDO DE CASO-CONTROLE**

Pelotas
2017

RAFAELY FERREIRA SEVERO

**ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO DO RECEPTOR 5HT2A COM AS
DISPLASIAS NAS LESÕES BUCAIS POTENCIALMENTE MALIGNAS: UM
ESTUDO DE CASO-CONTROLE**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós- Graduação em Saúde e
Comportamento da Universidade
Católica de Pelotas.

Orientadora: Dr^a. Fernanda Nedel

Pelotas

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S498a Severo, Rafaely Ferreira
Associação do polimorfismo do receptor 5Ht2A com as displasias nas lesões bucais potencialmente malignas: um estudo de caso controle. / Rafaely Ferreira Severo. – Pelotas: UCPEL, 2017.
69 f.
Dissertação (mestrado) – Universidade Católica de Pelotas, Programa de Pós-Graduação em Saúde e Comportamento, Pelotas, BR-RS, 2017.
Orientadora: Fernanda Nedel.

1.câncer bucal. 2.lesões orais potencialmente malignas. 3. SNP 6313.
I. Nedel, Fernanda,or. II. Título.

CDD 617.7

RESUMO

O câncer bucal é uma doença crônica multifatorial e é amplamente aceito que o desenvolvimento de câncer oral pode ser precedido por lesões orais potencialmente malignas (LOPM). Estudos têm relatado um risco aumentado para o desenvolvimento de LOPM, associado com o hábito de fumar e beber álcool, onde estudos genéticos estão sendo realizados a fim de descobrir a variedade de fenótipos relacionados aos hábitos de dependência, que pode ocorrer devido a polimorfismos genéticos. A molécula de serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) regula algumas das funções do cérebro, inibindo ou estimulando o sistema GABA; e assim é capaz de regular os hábitos de alcoolismo e o tabagismo. Neste estudo investigamos o polimorfismo T102C no receptor 5HT2A (rs6313) em displasia oral em LOPM e a sua associação com hábitos de fumo e álcool. Este estudo de caso-controle incluiu pacientes com LOPM histopatologicamente diagnosticados com displasia avaliando hábitos de consumo de tabaco e álcool. As amostras de células das lesões orais foram coletadas com os pacientes previamente anestesiados usando escovas citológicas descartáveis. A extração de DNA foi realizada e o polimorfismo foi genotipado em ensaios de discriminação alélica de PCR em tempo real. Um total de 109 indivíduos foram incluídos neste estudo (37 com displasia e 72 controles). A distribuição do genótipo ($p=0,016$), alelos ($p=0,020$) e o hábito de fumar ($<0,001$) diferiram significativamente entre os grupos de displasia e controle, onde o genótipo CT e TT e o alelo T mostraram maior frequência na displasia (65,6, 18,8 e 84,4%, respectivamente) do que nos controles (55,7, 4,9 e 60,7%). No que se refere aos hábitos tabagistas a maior frequência foi no grupo de displasia. Na análise de regressão logística multivariada associando as variáveis de interesse e a presença de displasia mostrou que indivíduos com hábitos tabagistas apresentam um risco 7,58 vezes maior de desenvolver displasia do que não fumantes; e individuais carregando o alelo T para o polimorfismo T102C tem um risco 4,6 vezes maior de desenvolver displasia oral em LOPM. Em geral os resultados do nosso estudo indicaram uma relação entre hábitos tabagistas e a displasia oral em LOPM. Além disso, nosso estudo indicou, pela primeira vez, uma possível relação entre o polimorfismo T102C e a displasia oral em LOPM.

Palavras-Chave: câncer bucal, lesões orais potencialmente malignas, SNP 6313 serotonina

ABSTRACT

Oral cancer is a multifactorial chronic disease and it is generally accepted that oral cancer development may be preceded by oral potentially malignant lesions (OPML). Studies have reported an increased risk for OPML development, associated with smoking and drinking alcohol, where genetic studies are being carried out in order to uncover the variety of phenotypes related to habits of dependence, which may occur due to genetic polymorphisms. The serotonin or 5-hydroxytryptamine (5-HT) molecule regulates some of the brains functions by inhibiting or stimulating the GABA system; and thus it is able to regulate alcoholism and smoking habits. In this study, we investigated the T102C polymorphism at the 5HT2A receptor in oral dysplasia in OPML and their association with smoking and alcohol habits. This case-control study included patients with OPML histopathologically diagnosed with dysplasia and within this group, patients with and without smoking and alcohol consumption habits. Cell samples from the oral lesions were collected with the patients previously anesthetized using disposable cytological brushes. DNA extraction was performed and the polymorphism was genotyped in real-time PCR allelic discrimination assays. A total of 109 individuals were included in this study (37 with dysplasia and 72 controls). The genotype ($p=0.016$), allele ($p=0.020$) and smoking habits (<0.001) distribution differed significantly between dysplasia and control group, where the CT and TT genotype, and the T allele showed a higher frequency in dysplasia (65.6, 18.8 and 84.4%, respectively) than in controls (55.7, 4.9 and 60.7%). In regard to smoking habits the higher frequency was in the dysplasia group. In the multivariate logistic regression analysis associating variables of interest and the presence of dysplasia showed that individuals with smoking habits present 7.58 increase risk to develop dysplasia then non-smokers; and individual carrying the T allele for the T102C polymorphism have a 4.6 increase risk to develop oral dysplasia in OPML. Overall the results in our study indicated a relationship between smoking habits and oral dysplasia in OPML. In addition our study indicated, for the first time, a possible relationship between the T102C polymorphism and oral dysplasia in OPML.

Keywords: oral cancer, oral potentially malignant lesions, rs6313, serotonin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Apresentação clínica da leucoplasia em ventre lingual/assoalho bucal.....**19**
- Figura 2** - Lesão leucoeritoplásica em palato duro e reborbo alveolar superior**19**
- Figura 3** - Aspecto clínico do Líquen Plano em mucosa jugal esquerda**19**
- Figura 4** - Representação gráfica da distribuição dos grupos a serem estudados**33**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Busca bibliográfica realizada na base de dados do PubMed.....	14
Tabela 2 – Busca bibliográfica acerca do polimorfismo T102C do receptor 5HT2A relacionado ao fumo e álcool.....	24
Tabela 3 – Polimorfismo T102C do gene do receptor 5HT2A.....	35
Tabela 4 - Orçamento.....	38

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 2A
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
UCPEL	Universidade Católica de Pelotas
UFPEL	Universidade Federal de Pelotas

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	10
PROJETO	11
1. IDENTIFICAÇÃO	10
1.1 Título	10
1.2 Designação da titulação pretendida pelo autor.....	10
1.3 Orientador.....	10
1.4 Instituição	10
1.5 Curso	10
1.6 Linha de pesquisa	10
1.7 Data	10
2. INTRODUÇÃO	11
3. OBJETIVOS	12
4. HIPÓTESES	13
5. ESTRATÉGIAS DE BUSCA	14
5.1 Descritores.....	14
5.2 Artigos encontrados.....	14
6. REVISÃO DE LITERATURA	15
6.1 Câncer de boca	15
6.2 Fatores etiológicos.....	20
6.3 Polimorfismo T102C do receptor 5HT2A.....	22
6.4 Polimorfismo T102C - Alcoolismo	29
6.5 Polimorfismo T102C - Tabagismo.....	30
7. METODOLOGIA	32
7.1 Delineamento.....	32
7.2 Cálculo de amostra	32
7.3 Participantes	32
7.3.1 Critérios de inclusão.....	33
7.3.2 Critérios de exclusão	34

7.4 Procedimentos e instrumentos.....	34
7.4.1 Desfecho primário	34
7.4.2 Desfecho secundário.....	34
7.4.3 Questionário	34
7.4.4 Coleta de material biológico.....	34
7.4.5 Genotipagem do polimorfismo T102C do gene do receptor 5HT2A.....	35
7.4.6 Obtenção da sequência consenso	35
7.5 Análise dos dados.....	36
7.6 Aspectos éticos	36
7.6.1 Riscos	36
7.6.2 Benefícios.....	37
7.7 Cronograma.....	37
7.8 Orçamento	38
8. REFERÊNCIAS.....	39
9. ARTIGO	47
10. CONCLUSÃO.....	62
ANEXOS.....	63
Anexo A – Carta de informação ao paciente	63
Anexo B – Termo de consentimento livre e esclarecido	64
Anexo C – Carta de aprovação do comitê de ética em pesquisa	65
Anexo D – Questionário	66
Anexo E- Protocolo de extração de DNA	68

1. IDENTIFICAÇÃO

1.1 Título: Associação do polimorfismo do receptor 5HT2A com as displasia nas lesões bucais potencialmente malignas: Um estudo de caso-controle

1.2 Designação do titulação pretendida pelo autor: Título de mestre

1.3 Orientador: Dra. Fernanda Nedel

1.4 Instituição: Universidade Católica de Pelotas (UCPel)

1.5 Curso: Mestrado em Saúde e Comportamento

1.6 Linha de pesquisa: Biologia em Estudos Clínicos

1.7 Data: 29.08.2017

PROJETO

2. INTRODUÇÃO

O câncer de boca é uma doença crônica multifatorial que está entre os dez tipos de cânceres mais comuns na população mundial [39; 6] acometendo predominantemente indivíduos do sexo masculino [4]. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o câncer bucal inclui os cânceres de lábio, mucosa bucal, língua, gengiva, assoalho bucal e palato duro. Vale ressaltar que fatores ambientais como o fumo, o álcool e a má nutrição em conjunto podem levar à iniciação e promoção neoplásica [32]. Neste sentido, o câncer tem acometido principalmente tabagistas, onde os riscos aumentam quando o tabagista é também etilista. Ainda, a incidência do câncer intra bucal tem acompanhado os padrões de consumo de tabaco e de álcool há várias décadas [51].

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 [9]. A molécula de serotonina (5-HT) apresenta função de neurotransmissor, e vem sendo relacionada aos comportamentos: apetitivo, emocional, motor, cognitivo e autônomo [28]. 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 (rs6313). Estudos vem sugerindo uma relação positiva entre os genótipos CC do polimorfismo T102C com doenças neuropsiquiátricas, incluindo dependência ao álcool e tabaco [19].

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

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

3.2 Específicos

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

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

4. HIPÓTESES

- 4.1 Associação positiva entre o alelo C do polimorfismo T102C e o hábito de fumo e álcool.
- 4.2 O alelo C será mais frequente em pacientes com lesões malignas do que em pacientes com lesões potencialmente malignas.
- 4.3 O alelo C será mais prevalente em pacientes com displasia severa à moderada do que em pacientes com displasia leve ou hiperplasia.

5. ESTRATÉGIAS DE BUSCA

5.1. Descritores

Para a realização da busca bibliográfica de trabalhos na área do presente projeto, utilizou-se a base de dados National Library of Medicine National Institutes of Health (PubMed), utilizando-se os seguintes descritores: *Polymorphism, T102C, alcohol, tobacco, oral cancer, serotonin*.

5.2 Artigos encontrados

Tabela 1- Busca bibliográfica realizada na base de dados PubMed

Busca PUBMED		
Descritores	Total de artigos	Artigos selecionados
Polymorphism <i>T102C</i>	191	7
<i>T102C AND alcohol</i>	9	5
<i>T102C AND tobacco</i>	4	3
<i>T102C Polymorphism AND oral cancer</i>	0	0
<i>6313 AND oral câncer</i>	0	0
<i>Polymorphism AND oral cancer</i>	1227	5
<i>Alcohol AND tobacco AND oral cancer</i>	1386	10
<i>Polymorphism AND tobacco AND alcohol</i>	443	12
Total	1589	42

6. REVISÃO DE LITERATURA

6.1 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. Essas alterações permitem que as células obtenham a capacidade de invadir tecidos vizinhos ou a distancia, permitindo a formação de metástases [37]. O câncer pode, assim, 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 [45].

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o processo pelo qual o câncer se forma chama-se de oncogênese ou carcinogênese e pode demorar anos para se perfazer. Dentro deste processo o crescimento celular pode ser do tipo controlado ou não controlado. No controlado, como a hiperplasia, a metaplasia e a displasia, existe um crescimento localizado do número de células ocasionado por estímulos fisiológicos ou patológicos, onde assim que cessam os estímulos o processo se torna reversível. 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. Este tipo de crescimento celular persiste mesmo após o término dos estímulos que o causaram, trazendo efeitos graves para os indivíduos [17].

Os inúmeros tipos de cânceres que existem se referem aos diferentes tipos de células do organismo. É denominado carcinoma o câncer cuja a origem se deu em um tecido epitelial, como a pele e a mucosa, já o sarcoma é o tipo de tumor originado em tecidos conjuntivos, como ossos, músculos e cartilagem [46]. 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 [39]. De acordo com o INCA, sintomas como problemas na fala, mastigação, e presença de linfadenomegalia cervical, semelhante a caroço no pescoço, são sinais de alerta para que o paciente busque auxílio médico ou odontológico. O câncer bucal inclui os cânceres de lábio, mucosa bucal, língua, gengiva, assoalho bucal e palato duro [33].

A não detecção precoce de lesão bucais pode levar a metástase, o qual é um processo complexo que envolve o desprendimento das células do tecido tumoral, a regulação da motilidade e da invasividade celular, e a proliferação e a invasão pelo sistema linfático e vascular. Este processo ocorre pela redução da adesão intercelular das células tumorais devido a perda das E-caderinas, conforme as células progredem na carcinogênese. As células começam então a expressar proteínas mesenquimais como a vimentina e a N-caderina, promovendo o alongamento celular e interferindo na polaridade da célula. Esta transição morfológica chamada transição epitélio-mesenquima (TEM) leva a alterações moleculares que interferem com o comportamento destas células [56].

O grande determinante do prognóstico do carcinoma bucal é o risco de metástase cervical [56]. Apesar do crescimento das 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 pacientes

com câncer de boca nas fases iniciais (estágio I e II) possuem uma sobrevida de 2 anos em 90% dos casos utilizando como modalidade de tratamento a cirurgia ou a radioterapia. No entanto, aqueles com estágio mais avançado da doença (estágio III e IV), possuem apenas 45% de chance de sobreviver por dois anos realizando terapia combinada de cirurgia, radioterapia e quimioterapia [57]. Assim, 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 sobrevida [33].

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 [6; 38]. No Brasil, o câncer bucal representa a sétima neoplasia mais comum e a nona causa de morte por câncer [45]. Segundo o INCA, a estimativa para o nosso país no ano de 2014 é de 11,280 novos casos de câncer da cavidade bucal em homens e 4,010 em mulheres, correspondendo a um risco estimado de 11,54 novos casos a cada 100 mil homens e 3,92 a cada 100 mil mulheres [16]. Esse tipo de câncer pode ser considerado o mais frequente na região de cabeça e pescoço, afetando predominantemente o sexo masculino [46; 4], com razão aproximada homem/mulher de 3:1, e depois dos 55 anos de idade essa proporção apresenta tendência de crescimento [6].

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 bucal [4; 3; 49]. O desenvolvimento do CEC é um processo gradual consistindo de múltiplas

etapas, onde ocorre um aumento gradual da instabilidade genética [58]. Assim, os CECs são em geral precedidos de lesões hiperplásicas, evoluindo para displasias, carcinomas *in situ* e então chegando ao câncer bucal invasivo. Estas lesões são denominadas de lesões pré-malignas (potencialmente malignas) e incluem as lesões clinicamente descritas como leucoplasias (Fig.1), as eritroplasias (Fig.2), líquen plano (Fig. 3) e úlceras crônicas [38].

Foram definidas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como leucoplasias as lesões clinicamente descritas na forma de manchas/placas brancas, e como eritroplasias 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 potencialmente malignas mais nocivas. Em 2005 a OMS categorizou as lesões potencialmente malignas de acordo com o seu grau de displasia em leve, moderada, severa e carcinoma *in situ* [59]. As leucoplasias podem ser classificadas, de acordo com o histopatológico, como displasias leves, moderadas e severas, onde esta designação caracteriza as fases sequenciais da carcinogênese bucal [60; 61]. Aproximadamente 10-15% das leucoplasias serão diagnosticadas como displasias moderadas e 5% como displasias severas ou carcinomas *in situ*. O risco a longo prazo de progressão de uma leucoplasia para um câncer invasivo varia de 4-18% entre os estudo [61]. O líquen plano é uma doença inflamatória do epitélio escamoso estratificado e de etiologia desconhecida. A transformação maligna desta entidade patológica tem sido relatada em 1% a 4% dos casos, e o mecanismo pelo qual ocorre a malignização ainda é pouco conhecido [61; 62].

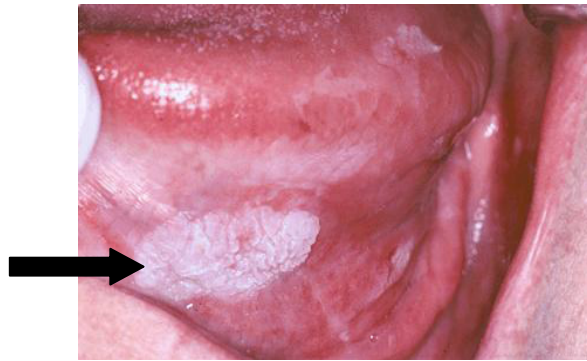


Figura 1- Apresentação clínica da leucoplasia em ventre lingual/assoalho bucal. Fonte: CDDB, Faculdade de Odontologia, UFPEL.

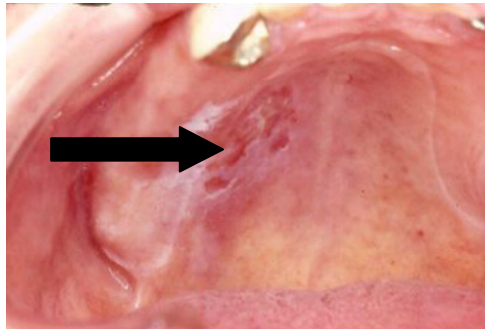


Figura 2- Lesão leucoeritroplásica em palato duro e rebordo alveolar superior. Fonte: CDDB, Faculdade de Odontologia, UFPEL.

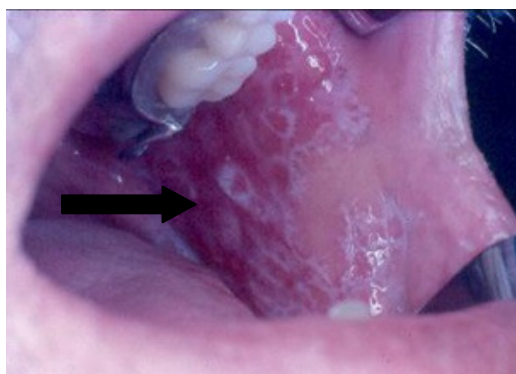


Figura 3- Aspecto clínico do Líquen Plano em mucosa jugal esquerda, revelando estrias esbranquiçadas em fundo eritematoso. Fonte: CDDB, Faculdade de Odontologia, UFPEL.

6.2 Fatores Etiológicos

O fumo, o álcool, a má nutrição, a má higiene, a radiação solar, as variáveis demográficas e os problemas imunológicos são alguns dos fatores que, associados, podem resultar na iniciação e promoção neoplásica [39; 63]. Além desses, outro importante fator de risco é o papilomavírus humano (HPV), o qual também está ligado com lesões bucais benignas e malignas [32; 63].

O 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 a 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 [5; 25].

Ainda de acordo com Carrard e colaboradores (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 [5]. 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 [3; 25].

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 [45] e entre as causas de morte que podem ser evitadas, o tabaco é uma das mais significativas [35].

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 β_2 expressos na região tegmental ventral aos gânglios do sistema nervoso autônomo e também às placas neuromusculares [28]. 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 [35].

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 [39]. Não somente os cigarros manufacturados, 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 [25].

O tabaco em conjunto com o etanol gera sinergismo e isso faz com que exista uma maior probabilidade de desenvolvimento de câncer bucal [10]. 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 [9].

6.3 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) 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 [20]. 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) [8], 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 [20]. Dessa forma, problemas na modulação da 5-HT levam ao aparecimento de doenças crônicas, como doenças cardiovasculares e distúrbios psiquiátricos [35]. 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 [28].

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 [28], 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 [35]. 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 [8; 28]. 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 a 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 [38].

Algumas pesquisas vêm sugerindo uma provável relação entre os genótipos CC do polimorfismo T102C com doenças neuropsiquiátricas, incluindo dependência ao tabaco, álcool e drogas (Tabela 2) [19; 53].

Tabela 2- Busca bibliográfica acerca do polimorfismo T102C do receptor 5HT2A relacionado ao fumo e álcool

<i>Autor, ano, revista</i>	<i>Objetivo Principal</i>	<i>Método</i>	<i>Resultados</i>	<i>Comentários / Observações</i>
Hwu H.G. et al., (2000), American Journal of Medical Genetics	Avaliar a associação entre o polimorfismo T102C e abuso de álcool com problemas de comportamento	Oitenta e cinco pacientes com o abuso de álcool, 75 indivíduos com dependência de álcool, e 70 controles normais participaram do estudo. Diagnóstico de abuso de álcool e dependência de álcool por critérios do DSM-III [APA, 1980], foram avaliados usando a seção alcoolismo da versão chinesa modificada da Diagnostic Interview	Este estudo demonstra que o alcoolismo é heterogêneo e abuso de álcool em indivíduos do sexo masculino, com problemas de comportamento, foi associado com polimorfismo T102C do gene do receptor	Futuros estudos deste tipo podem ter que considerar a presença de problemas de comportamento e as diferentes

		Schedule (DIS-CM)	5HT2A	categorias de diagnóstico de abuso e dependência de álcool
Wrzosek, M. et al., (2012), Pharmacological Reports	Examinar a potencial relação entre o polimorfismo no gene T102C e dependência em álcool	O estudo incluiu uma amostra de 150 pacientes (108 do sexo masculino e 42 do sexo feminino) admitidos em programas de tratamento da dependência em Warszawa, na Polônia, e foram diagnosticados com dependência de álcool de acordo com os critérios do DSM-IV	A análise genética mostrou que a frequência do alelo 102C e genótipo C102C em indivíduos dependentes em álcool foi significativamente maior do que nos controles	O estudo apresenta limitações, como pequeno tamanho amostral, além disso, informações como idade e

				sexo não foram especificados
White, M.J et al., (2011), Drug and Alcohol Dependence	Investigar as contribuições do gene HTR2A, o estresse psicológico crônico, e impulsividade para a previsão do tabagismo e dependência em adultos jovens	A genotipagem de T102C e -1438A / G foi realizada em 132 adultos saudáveis jovens caucasianos (47 fumantes) que completaram as medidas de auto-relato do estresse crônico, sintomas depressivos, personalidade impulsiva e uso do cigarro	Foi encontrada relação entre o polimorfismo T102C e o uso de tabaco, porém, não foi encontrada relação entre o polimorfismo e o número de cigarros fumados	Pesquisas futuras utilizando uma amostra maior poderiam investigar melhor esta interação
Jakubczyk. A. et al., (2012), Journal of	Analisar a associação entre altos níveis de impulsividade	Foram analisados 304 pacientes dependentes de álcool. O sangue foi recolhido e analisado para o polimorfismo	Os resultados indicam uma associação significativa entre altos níveis de impulsividade	Novos estudos devem ser realizados para

Psychiatric Research	comportamental e o genótipo CC do polimorfismo rs6313 (T102C)	T102C (rs6313) e níveis de impulsividade tal como determinado através da Escala de Impulsividade Barratt (BIS-11)	e o genótipo CC de rs6313 em pacientes dependentes de álcool	em amostras maiores e mais representativas e verificar as relações entre impulsividade e outros polimorfismos genéticos relacionados com a serotonina em pacientes dependentes de álcool
-------------------------	--	---	--	--

<p>Jakubczyk, A. et al., (2013), Journal of Psychiatric Research</p>	<p>O objetivo do estudo foi avaliar a contribuição desse polimorfismo genético (T102C) como um preditor de recaída em relação a outros preditores previamente identificados</p>	<p>Uma amostra de 254 sujeitos dependentes de álcool foi recrutada em centros de tratamento de álcool em Varsóvia, na Polônia, e foram avaliados no início e após 12 meses</p>	<p>A análise estatística mostrou que o genótipo CC foi significativamente associado com o aumento da recaída</p>	<p>Neste estudo houve ausência de uma relação entre impulsividade comportamental e recaída</p>
--	---	--	--	--

6.4 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 [23]. Hwo e Chen, (2000), ao pesquisarem uma população de dependentes de álcool revelaram que o abuso do álcool em homens, associado a transtornos de comportamento apresentava ligação com o alelo C do polimorfismo T102C [15].

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, Jakubcz e colaboradores (2013), revelaram que o genótipo CC do polimorfismo T102C está significativamente associado com o aumento de recaídas de alcoólatras durante o período de tratamento [19].

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 [27; 18].

6.5 Polimorfismo T102C – Tabagismo

O ato de fumar é considerado multifatorial, uma vez que os componentes genético e ambiental se complementam [9]. No estudo de Hong e colaboradores (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 [14]. O vício apresenta caráter crônico, pois logo que é 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 [2; 28; 27], o que foi descrito em estudo recente de Ramos Neto e colaboradores (2014), onde os autores sugerem que o polimorfismo T102C contribui para a manutenção do hábito de fumar [44].

O alelo que está associado à continuação do vício no tabaco é o alelo C, o qual confere uma redução na expressão gênica, ou seja, uma queda no número de receptores 5HT2A [28; 42]. 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 [28].

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 prevalente em fumantes, propondo assim, que T102C tem relação com a dependência. Em contrapartida, White e colaboradores (2011) relacionaram o genótipo TT a um maior risco para o tabagismo [28; 52].

7. METODOLOGIA

7.1 Delineamento

Será realizado um estudo de caso-controle

7.2 Cálculo de amostra:

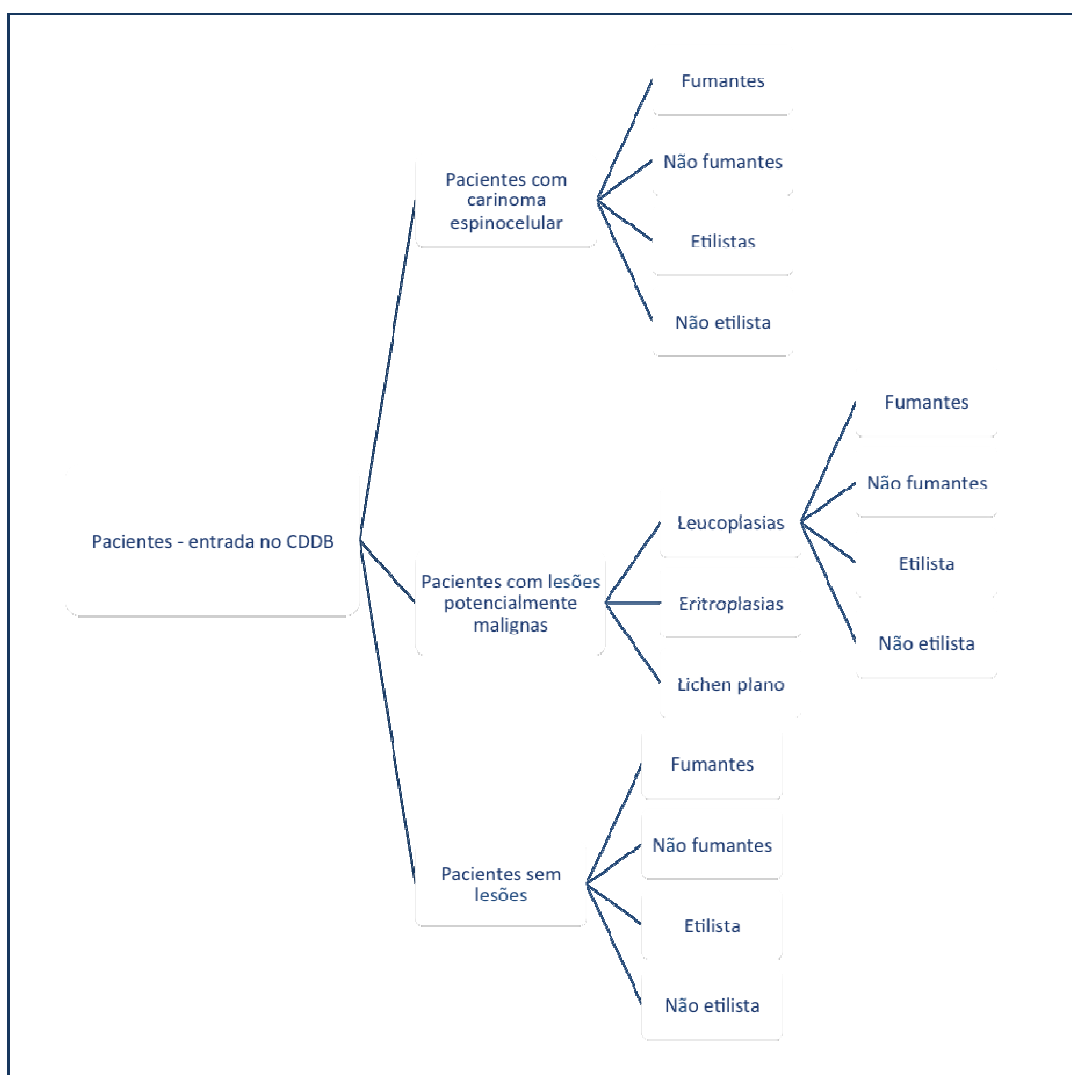
A captação da amostra será obtida por conveniência. Está será composta por pacientes diagnosticados com e sem lesões malignas e potencialmente malignas que sejam atendidos no Centro de Diagnóstico das Doenças da Boca (CDDDB-UFPEl). Foi realizado o calculo amostral com nível de confiança de 95% e prevalência de hábito de fumo na população pelotense de 23%. Assim, estima-se que sejam necessários 61 pacientes com lesões malignas, 61 pacientes com lesões potencialmente malignas e 61 pacientes controles. Ainda, foram acrescentados 10% para controle de perdas e recusas totalizando, assim, 67 pacientes com lesões malignas, 67 com lesões potencialmente malignas e 67 pacientes fazendo parte do grupo controle.

7.3 Participantes:

A população alvo consistirá 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 (Figura 4). Os pacientes são usuários do Centro de Diagnóstico das Doenças da Boca (CDDDB-UFPEl). Estes serão informados a respeito do presente estudo e ao se disponibilizar a participar, assinarão o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo A e B), e também responderão a um questionário (Anexo D) aplicado por uma equipe treinada contendo questões a respeito do hábito de fumar e ingerir bebidas alcoólicas. Para facilitar a interpretação das

respostas serão incluídos no grupo de fumantes os indivíduos ex-fumantes. No grupo dos indivíduos consumidores de bebidas alcoólicas serão também incluídos os que já abandonaram 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 C).

Figura 4 – Representação gráfica da distribuição dos grupos a serem estudados.



7.3.1 Critérios de inclusão

- Idade igual ou superior a 45 anos;

- Alterações na mucosa oral presentes há mais de 15 dias, exibindo alterações de forma, tamanho, coloração, textura e sensibilidade;
- Assinar o termo de consentimento permitindo a coleta de material biológico e a aplicação do questionário.

7.3.2 Critérios de exclusão

- Indivíduos com doenças de natureza inflamatória e/ou infecciosa;
- Enfermidades vasculares ou do colágeno em um período de até um mês prévio à coleta do material genômico;

7.4 Procedimentos e Instrumentos

7.4.1 Desfecho primário

- Polimorfismo T102C

7.4.2 Desfecho secundário

- Lesões bucais malignas e potencialmente malignas

7.4.3 Questionário

Os pacientes responderão a um questionário feito por uma equipe previamente treinada contendo questões a respeito do hábito de fumar e ingerir bebidas alcoólicas (Anexo D).

7.4.4 Coleta de material biológico

Amostras de células das lesões orais serão coletadas com o paciente previamente anestesiado. Serão utilizadas escovas citológicas descartáveis, sendo friccionadas as lesões por aproximadamente 30 segundos, movimentando-as ao longo da porção anterior em direção aos dois lados da cavidade bucal. O mesmo procedimento será

realizado para a coleta de material do grupo controle. Após a coleta, as escovas citológicas destinadas à análise de DNA serão introduzidas em um tubo de microcentrífuga contendo solução de lise celular. Após 24 horas será realizada a extração de DNA, seguindo as instruções do fabricante (Puregene Buccal Cell Kit- Gentra Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota, USA). Para cada uma das amostras será obtido 20µl de solução final e deste volume, 2µl serão retirados para a quantificação de DNA no espectrofotômetro Nanovue (GE Healthcare Life Sciences).

7.4.5 Genotipagem do polimorfismo T102C do gene do receptor 5HT2A

O polimorfismo apresentado na tabela 2 será 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 serão designados utilizando-se o software Primer Express v3.0. O DNA genômico será diluído 2:8 para a realização da reação de PCR.

Tabela 3- Polimorfismo T102C do gene do receptor 5HT2A

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

7.4.6 Obtenção da sequência consenso

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

7.5 Análise de dados

As frequências genóticas e alélicas serão estimadas por contagem direta dos alelos e o equilíbrio de Hardy-Weinberg, será testado pelo teste de qui-quadrado. As distribuições alélicas entre os grupos de indivíduos serão avaliadas pelo qui-quadrado. Uma medida de magnitude de efeito será calculada através da razão de chances (odds ratio – OR) e intervalo de confiança de 95%. Para a comparação de variáveis contínuas com distribuição normal entre os grupos de pacientes serão utilizados o teste *t de Student* ou análise da variância (ANOVA), e o teste do qui-quadrado para a comparação entre variáveis normais. Para a análise da interação entre os fatores será realizado o teste do modelo linear geral. Valores de $p \leq 0,05$ serão considerados estatisticamente significativos. As análises estatísticas serão realizadas através do pacote estatístico SPSS 16.0 para Windows.

7.6 Aspectos éticos

Os participantes receberão informações sobre os objetivos da pesquisa e assinarão um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo A e B). Será assegurado o direito à confidencialidade dos dados e o cuidado na utilização das informações nos trabalhos escritos, de modo que os participantes não possam ser identificados. 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).

7.6.1 Riscos

Os riscos oferecidos aos pacientes serão mínimos, tais como incômodo no local da coleta do material biológico. Porém, independente dos riscos, os pacientes serão acompanhados por um profissional da área da saúde.

7.8 Orçamento

Tabela 4. Orçamento para os materiais de consumo

Material de Consumo	Valor (R\$)
Custom Taqman SNP Genotyping Assay	1.300,00
TaqMan Genotyping Master Mix	2.400,00
Placas para qPCR 0.1ml com 20	500,00
Adesivo MicroAmp Optical para real-time PCR	1.000,00
Total	5.200,00

8. REFERÊNCIAS

[1] 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.

[2] 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.

[3] 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.

[4] 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.

[5] 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.

[6] 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.

[7] 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.

[8] DICKOW, L.L, KOCHE, 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.

[9] 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.

[10] 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.

[11] GOLIMBET, V.E; LAVRUSHINA, O.M; KALEDA, V.G; ABRAMOVA, L.I; LEZHEIKO, T.V. Supportive evidence for the association between the T102C 5-HT_{2A} gene polymorphism and schizophrenia: a large-scale case-control and family-based study. *EurPsychiatry*.v. 22, n. 3, p.167-70, 2007.

[12] 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.

[13] 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.

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

[15] 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.

[16] 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>

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

[18] JAKUBCZYK, A; WROZOSEK, M; LUKASZKIEWICZ, J; SADOWSKA-MAZURYK, J; MATSUMOTO, H; SLIWERSKA, E. The CC genotype in HTR2A T102C polymorphism is associated with behavioral impulsivity in alcohol-dependent patients. *J Psychiatr Res.* v. 46, n. 1, p. 44-49, 2012.

[19] JAKUBCZYK, A; KLIMKIEWICZ, A; KOPERA, M; KRASOWSKA, A; MATSUMOTO, H; BROWER, K.J; WOJNAR, M. The CC genotype in the T102C HTR2A polymorphism predicts relapse in individuals after alcohol treatment. *J Psychiatr Res.* v. 47, n.4, p. 527–533, 2013.

[20] JOBIM, P.F.C. Possível influência do polimorfismo T102C do gene 5HT2A 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.

[21] 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.

[22] 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.

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

[24] KLING, A; SEDDIGHZADEH, M; ALFREDSSON, L; RANTAPAA-DAHLQVIST, S; PADYUKOV, L. Genetic variations in the serotonin 5-HT2A receptor gene (HTR2A) are associated with rheumatoid arthritis. *NanRheumDis.* v.67, n.8, p.1111-5, 2008.

[25] 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.

[26] 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.

[27] 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.

[28] LIMA, P.A.S.P. O polimorfismo T102C do receptor serotoninérgico 5HT2A 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.

[29] 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.

[30] MARKOUTSAKI, T; KARANTANOS, T; GAZOULI, M; ANAGNOU, NP; KARAMANOLIS, D.G. 5-HT2A receptor gene polymorphisms and irritable bowel syndrome. *J Clin Gastroenterol*. v.45, n.6, p. 514-7, 2011.

[31] 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.

[32] 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.

[33] 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.

[34] 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 HTR2A gene on fibromyalgia susceptibility. Ver Bras Reumatol. v. 51, n.6, p.594-602, 2011.

[35] MIGOTT, A.M.B. Um estudo do polimorfismo 5HT2A 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.

[36] 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.

[37] 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.

[38] 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.

[39] 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.

[40] 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.

[41] 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.

[42] 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.

[43] 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.

[44] 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.

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

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

[47] 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.

[48] 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.

- [49] 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.
- [50] 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>
- [51] TSUNOKA, T; KISHI, 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.
- [52] 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.
- [53] 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.
- [54] 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.
- [55] 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.

[56] NOGUTI, J; DE MOURA, C.F; DE JESUS, G.P; DA SILVA, V.H; HOSSAKA, T.A; OSHIMA, C.T; RIBEIRO, D.A. Metastasis from oral cancer: an overview. *Cancer Genomics Proteomics*. v.9, n. 5, p. 329-235, 2012.

[57] GÜNERI, P; EPSTEIN, J.B. Late stage diagnosis of oral cancer: components and possible solutions. *Oral Oncol*. v. 50, n.12, p. 1131-1136, 2014.

[58] KHAN, Z; TIWARI, R.P; MULHERKAR, R; SAH, N.K; PRASAD, G.B; SHRIVASTAVA, B.R; BISEN, P.S. Detection of survivin and p53 in human oral cancer: correlation with clinicopathologic findings. v. 31, p. 1039-1048, 2009.

[59] MONTERO, P.H; PATEL, S.G. Cancer of the oral cavity. v. 24, n. 3, p. 491-508, 2015.

[60] KONDOH, N; OHKURA, S; ARAI, M; HADA, A; ISHIKAWA, T; YAMAZAKI, Y; SHINDOH, M; TAKAHASHI, M; MATSUBARA, O; YAMAMOTO, M. Gene expression signatures that can discriminate oral leukoplakia subtypes and squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. v. 43, p. 455-462.

[61] TSANTOULIS, P.K; KASTRINAKIS, N.G; TOURVAS, A.D; LASKARIS, G; GORGOULIS, V.G. Advances in the biology of oral cancer. *Oral Oncol*, v. 43, p. 523-534.

[62] FARHI, D; DUPIN, N. Pathophysiology, etiologic factors, and clinical management of oral lichen planus, part I: facts and controversies. *Clin Dermatol*, v. 28, p. 100-108.

[63] 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.586-590, 2012.

9. ARTIGO

The 5HT2A receptor polymorphism is associated with dysplasia in potentially malignant oral lesions: a case-control study

Rafaely Ferreira Severo¹, Cainá Correa do Amaral¹, Tiago Fernandez Garcia¹, Geovanna Peter Corrêa¹, Camila Perelló Ferrúa¹, Laísa Camerini da Rosa¹, Greice Dotto Simões¹, Clarissa Bastos¹, Marcos Britto Correa², Gabriele Cordenonzi Ghisleni¹, Sandra Beatriz Chaves Tarquinio², Fernanda Nedel^{1*}

¹ Post-Graduate Program in Health and Behavior, Catholic University of Pelotas, Pelotas, RS, 96010-901, Brazil

² Post-Graduate Program in Dentistry, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, 96015-560, Brazil

* Corresponding author: Programa de Pós-graduação em Saúde e Comportamento, Universidade Católica de Pelotas, Rua Félix da Cunha, 412, Cep. 96010-901, Pelotas, RS,

Brazil. Tel.: +55 53 2128 8408; fax: +55 53 2128 8229.

E-mail address: fernanda.nedel@gmail.com (Fernanda Nedel).

Abstract

Oral cancer is a multifactorial chronic disease and it is generally accepted that oral cancer development may be preceded by oral potentially malignant lesions (OPML). Studies have reported an increased risk for OPML development, associated with smoking and drinking alcohol, where genetic studies are being carried out in order to uncover the variety of phenotypes related to habits of dependence, which may occur due to genetic polymorphisms. The serotonin or 5-hydroxytryptamine (5-HT) molecule regulates some of the brains functions by inhibiting or stimulating the GABA system; and thus it is able to regulate alcoholism and smoking habits. In this study, we investigated the T102C polymorphism at the 5HT2A receptor in oral dysplasia in OPML and their association with smoking and alcohol habits. This case-control study included patients with OPML histopathologically diagnosed with dysplasia and within this group, patients with and without smoking and alcohol consumption habits. Cell samples from the oral lesions were collected with the patients previously anesthetized using disposable cytological brushes. DNA extraction was performed and the polymorphism was genotyped in real-time PCR allelic discrimination assays. A total of 109 individuals were included in this study (37 with dysplasia and 72 controls). The genotype ($p=0.016$), allele ($p=0.020$) and smoking habits (<0.001) distribution differed significantly between dysplasia and control group, where the CT and TT genotype, and the T allele showed a higher frequency in dysplasia (65.6, 18.8 and 84.4%, respectively) than in controls (55.7, 4.9 and 60.7). In regard to smoking habits the higher frequency was in the dysplasia group. In the multivariate logistic regression analysis associating variables of interest and the presence of dysplasia showed that individuals with smoking habits present 7.58 increase risk to develop dysplasia then non-smokers; and individual carrying the T allele for the T102C polymorphism have a 4.6 increase risk to develop oral dysplasia in OPML. Overall the results in our study indicated a relationship between smoking habits and oral dysplasia in OPML. In addition our study indicated, for the first time, a possible relationship between the T102C polymorphism and oral dysplasia in OPML.

Keywords: oral cancer, oral potentially malignant lesions, serotonin, rs6313

Introduction

Oral cancer is a multifactorial chronic disease that is among the ten most common cancers in the world (Carvalho, 2012) predominantly affecting males (Bittar, 2010). It is generally accepted that oral cancer development may be preceded by identifiable but non-invasive precursor lesions, so could be by the World Health Organization (WHO) as oral potentially malignant lesions (OPML) (Scully, 2009). OPML comprises leukoplakia, erythroplakia, lichen planus, actin keratosis and verrucous hyperplasia. OPML can be associated with different degree of oral epithelial dysplasia, which is not related with any specific clinical aspect. It is a term related to histopathological changes, involved in kinetics of cellular proliferation and maturation of the epithelium, and associated with increased risk of malignant transformation (Pitiyage, 2009). The presence of epithelial dysplasia is generally regarded as one of the most important predictor of malignization in OPML (Hsue, 2007; Pitiyage, 2009). Indeed it has been accepted that moderate (30%) or severe (50%) dysplasia has major probability for malignant transformation. However it is currently impossible to predict accurately which lesion will progress into cancer (Ghallab, 2017; Hwang, 2017).

It is well known that ethyl substances may cause damage to the oral mucosa by decreasing the ability of DNA repair, causing problems in the immune system, and by increasing epithelial proliferation and changes in maturation processes (Carrard, 2008). Smoking, in turn, is one of the most important carcinogenic agents that man inserts voluntarily, and is one of the most significant causes of death that can be avoided if the habit ceases (Taylor, 2002). Genetic studies are being carried out in order to uncover the variety of phenotypes related to habits of dependence, which may occur due to genetic polymorphisms (Chatkin, 2006).

The human brain continuously produces neurotransmitters, which are chemicals capable of regulating mood through nerve impulses between nerve cells. The serotonin or 5-hydroxytryptamine (5-HT) molecule is derived from the amino acid tryptophan, and can be influenced by factors such as lifestyle, heredity and is part of the monoamine family along with epinephrine, norepinephrine and dopamine (Hoyer, 1994). This neurotransmitter regulates some of the brains functions by inhibiting or stimulating the GABA system (Cirrana, 2006); and thus it is able to regulate important behaviors such as alcoholism, smoking, depression, compulsion, release of some hormones, sleep, appetite and aggressiveness (Sanchez, 2015).

Serotonergic receptors are classified into seven types (5-HT1-7); type 2 receptor is divided into three subgroups (A, B and C). The 5HT2A receptor, whose coding gene (*HTR2A*) is found on chromosome 13 (13q14-q21), presents different polymorphisms such as the T102C (rs6313). Some studies have suggested that the T102C polymorphism is associated with smoking and alcohol consumption susceptibility, however others failed to prove these evidences. To the best of our knowledge no study has associated the T102C polymorphism with smoking and alcohol consumption in dysplasia in potentially malignant pathologies, especially in OPML. Considering that tobacco and alcohol consumption are considered a risk factors for OPML development, in this study we investigated the T102C polymorphism at the 5HT2A receptor in oral dysplasia in OPML and its association with smoking and alcohol habits.

Materials and Methods

Population

This case-control study included patients with OPML histopathologically diagnosed with dysplasia and within this group patients with and without smoking and alcohol consumption habits, who were attended at the Center Of Diagnosis of Mouth Diseases at the Federal University of Pelotas (CDDDB-UFPel), a regional reference center for clinical and histopathology diagnosis. Data collection was conducted from January 2009 to December 2016.

In the case group subjects with alterations in the oral mucosa for more than 15 days, exhibiting changes in shape, size, color, texture and sensitivity, were included. The exclusion criteria were: individuals with diseases of inflammatory and/or infectious nature; and vascular or collagen diseases within a period of up to one month prior to the collection of the genomic material. The control group was determined after meticulous examination, were individual did not present oral lesion and within this group patients with and without smoking and alcohol consumption habits. The study was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Pelotas (CEP 058/2008 of FO-UFPEL), and participants that agreed in participate in the study signed an informed consent form.

Both controls and OPML patients were meticulous examined by two professional with PhD in oral pathology from CDDDB-UFPel, in order to determine the clinical diagnosis. Individuals were then interviewed and had their buccal cells collected for DNA extraction by previously calibrated students. Dysplasia was determine after

indicated biopsy and histopathology diagnosis performed as routine at CDDDB-UFPeI and was classified in mild, moderate and severe.

The independent variables studied were: gender (male/female), age (mean/SD), genotype (CCCT and TT), allele (CC and CT/TT), smoking (yes/no; yes: smokers that had a daily consumption; no: individuals that were not smokers) and alcohol consumption (yes/no; yes: drinkers that had a daily consumption; no: individuals that were not drinkers).

Collection of Biological Material and Molecular Analysis

Buccal cells for DNA extraction were collected using disposable cytological brushes. For the control group cells were collected from the jugal mucosa, and for OPML patients cells were acquired from the oral lesion with the patient previously anesthetized.

DNA extraction was performed following the manufacturer's instructions. (Puregene Buccal Cell Kit- Genra Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota, USA). The T102C polymorphism (rs6313) SNP was genotyped using primers and probes contained in the 40x Human Custom TaqMan Genotyping Assay (Life Technologies, Foster City, CA, USA). The reactions were conducted in a 96-well plate, in a total 5 ml reaction volume using 2 ng of genomic DNA, TaqMan Genotyping Master Mix 1x (Applied Biosystems), and Custom TaqMan Genotyping Assay 1x. Then plates were positioned in a real-time PCR thermal cycler (7500 Fast Real PCR System; Applied Biosystems) and heated for 10 min at 95 °C, followed by 45 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. Fluorescence data files from each plate were analyzed using automated allele-calling software (SDS 2.0.1; Applied Biosystems).

Statistical analyzes

Statistical analyzes were performed using the statistical package SPSS 16.0. Genotypic and allelic frequencies were estimated by direct counting of the alleles. The Hardy-Weinberg equilibrium was evaluated by χ^2 –test. The analysis of gender, genotype, allele, smoking habits and alcohol consumption between dysplasia and controls, and the allelic distributions between smoking habits and alcohol consumption in the case group were evaluated by χ^2 –test. Multinomial logistic regression analysis was performed to evaluate the risk of T102C polymorphism SNP in dysplasia. Values of $p \leq 0.05$ were considered to be statistically significant.

Genotype distributions were in Hardy–Weinberg equilibrium in case and control groups ($p>0.05$).

Results

A total of 110 individuals were included in this study (38 cases and 72 controls). The mean age was 66.0 (SD±14.2) for the case group and 61.3 (SD±15.5) for the control group. The histopathological characteristic, in regard to the severity of epithelial dysplasia, showed that 29.7% were mild dysplasia, 54.1% were moderate dysplasia and 16.2% severe dysplasia.

The genotype ($p<0.05$), allele ($p<0.050$) and smoking habits (<0.001) distribution differed significantly between dysplasia and control group. The genotype CT and TT, and the T allele showed a higher frequency in dysplasia (65.6 18.8 and 84.4%, respectively) than in controls (55.7, 4.9 and 60.7). In regard to smoking habits the higher frequency was in the dysplasia group (Table 1).

When smoking habits and alcohol consumption, were analyzed according to allele distribution no significant differences were observed ($p>0.05$) (Table 2).

In the multivariate logistic regression analysis associating variables of interest and the presence of dysplasia (Table 3), the crude analysis showed a statistically significant difference with smoking habits ($p<0,001$) and allele distribution ($p=0.015$). This significance was maintained when variables were adjusted, were individuals with smoking habits present 7.58 increase risk (CI 95%: 2,61-22,08, $p<0,001$) to develop dysplasia, and individual carrying the T allele for the T102C polymorphism had a 4.6 increase risk (IC 95%: 2,61-22,08, $p=0,036$) to develop oral dysplasia in OPML.

Discussion

Smoking and alcohol habits have been reported to increase the risk for OPML, oral dysplasia, and neoplastic onset and promotion (Mehrotha, 2006; Shingler, 2017), and these deleterious habits have been associated with the T102C polymorphism. Here we speculated that this polymorphism could influence in smoking and alcohol consumption and therefore influence indirectly in dysplasia in OPML patients. Indeed our results showed that individuals with smoking habits have increase risk to develop dysplasia. However, no association was found between the T102C polymorphism and smoking and alcohol consumption in oral dysplasia in OPML. Yet our study showed, for the first time, a direct association between the T102C polymorphism and oral

dysplasia in OPML. It was shown that individual carrying the T allele have a 4.6 increase risk to develop oral dysplasia in OPML then C allele carriers.

Since tobacco is established as a carcinogen and epithelial dysplasia is generally regarded as one of the most important predictor of malignization in OPML, one important issue is whether smoking can increase epithelial dysplasia and therefore favor the malignant potential of OPML. In our study, individuals with smoking habits presented a 7.58 increase risk to develop dysplasia in OPML when compared to controls. In this sense a recent meta-analysis showed that tobacco smoking increases the risk of malignization of an OPML lesion (oral lichen planus) (Aghbari, 2017). This result highlights the relevance in intervening in smoking habits in patients with OPML in order to decrease the potential of dysplasia and therefore reduce the chances of OPML malignization.

Considering that tobacco and alcohol consumption are considered a risk factors for OPML development, in this study we investigated the T102C polymorphism at the 5HT2A receptor in oral dysplasia in OPML and its association with smoking and alcohol habits. Since smoking and alcohol addiction is considered a central nervous system disease that affects pathways such as the dopaminergic and serotonergic pathways in the brain, several genetic variant have been reported to be associated with the addiction suggesting, therefore, the existence of a genetic component (Sanchez, 2015).

This polymorphism accounts for a T to C (102) substitution, and does not alter the amino acid sequence. Therefore the 5HT2AR encoded by both allele variants are identical (Wrzosek, 2011). However it has been hypostasized that the expression of the 5HT2AR could vary according to the presence of C- or T-allele (Polesskaya and Sokolov, 2002; Polesskaya, 2006), throughout epigenetic DNA modifications in the methylation of cytosine residues within cytosine-guanine dinucleotides (CpG), a process known to prevent gene expression (Polesskaya and Sokolov, 2002; Polesskaya, 2006). This could underline the genetic association between this polymorphism with smoking and alcohol consumption and the controversial results shown until now. Indeed some studies have shown association between smoking and alcohol habits and the T-allele, other between the C-allele and other has shown no association.

Research suggests that the genotype CC of the T102C polymorphism is associated with a decrease in 5HT2A receptor in the central nervous system (Jakubczyk, 2012), which is related with tobacco, alcohol and drug dependence (Jakubczyk, 2013).

In the present study, no association was found between the T102C polymorphism and smoking and alcohol consumption in oral dysplasia in OPML. Research conducted by White et. al (2011), showed the importance of the T102C polymorphism for the use of tobacco, where the T102 homozygous (genotype TT) were more likely to be smokers than the homozygous CC. On the other hand, a study with male population of smokers from Malaysia found no relationship between genes and smoking behavior, in similarity to our study (Rozac, 2014).

In relation to alcohol habits Hwu, et al (2000) showed that alcohol abuse is associated with the TC genotype of the T102C polymorphism. The author speculate that the significance of the TC genotype, in the molecular biological level, may involve the translation affected by secondary structure and the stability of the mRNA, which, in turn, can decrease the activity of the receptor, causing impulsive behaviors associated with alcohol abuse (Hwu, 2000). Wrzosek, et al (2012), revealed a significant association between the T102C polymorphism and the age of drinking habits onset. Patients homozygous for the C allele had significantly lower age at the beginning of addiction than individuals with at least a T allele (Wrzosek, et al., 2012). With regard to relapse after treatment in alcohol-dependent patients, the CC genotype was significantly associated with relapse. Patients with the CC genotype presented 2.3 times more likely to resort the addiction than those with the T allele (Jakubczyk, 2013).

Although evidences indicated association between the T102C polymorphism and smoking and drinking habits our contradicting results may be related to a small sample size for these variants. In addition, our study presented the relation between this polymorphism and smoking and drinking habits in a population with OPML and oral dysplasia, on the contrary to other study where these variables were evaluated in a healthy population.

Another important result showed in our study was the direct relation between the T102C polymorphism and oral dysplasia in OPML. It was shown that individual carrying the T allele have a 4.6 increase risk to develop oral dysplasia in OPML. Considering that oral dysplasia is a potentially premalignant condition that can progress to carcinoma (Shingler, 2017) it is important to detect predictors that can increase the risk for dysplasia. Although both genetics and environmental factors contribute for OPML development and progression, the genetic components are largely unknown (Pu, 2009). In this sense, some research have been conducted in order to determine polymorphisms associated with OPML, where some have shown susceptibility towards

OPML development such as COX-2 polymorphisms (Pu, 2009), Toll-like receptors polymorphism (De Barros Gallo, 2017) GSTT1 polymorphism (Barroso Duarte, 2006) and Leptin receptor polymorphism Gln223Arg (Domingos, 2014). However, to the best of our knowledge no study has evaluated the T102C polymorphism in dysplasia and even less in OPML. Therefore the literature lacks on information regarding pathways that could relate to the 5HT2A receptor and the oral epithelium in physiological conditions and even less in pathological situation such as dysplasia and OPML.

Conclusion

Overall the results in our study indicated a relationship between smoking habits and oral dysplasia in OPML. However smoking and alcohol consumption failed to show an association with the T102C polymorphism in oral dysplasia in OPML patients. In addition our study indicated, for the first time, a possible relationship between the T102C polymorphism and oral dysplasia in OPML. This finding could encourage further studies on the 5HT2A pathway and its possible association with dysplasia in OPML.

References

AGHBARI, S.M.H; ABUSHOUK, A.I; ATTIA, A; ELMARAEZY, A; MENSHAWY, A; AHMED, M.S; ELSAADANY, B.A; AHMED, E.M. Malignant transformation of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: A meta-analysis of 20095 patient data. *Oral Oncol.*68, p.92-102, 2017.

BARROSO DUARTE, E.C; DA SILVA, M.S; GOMEZ, M.V. GSTT1 polymorphism and oral leukoplakia. *Anticancer Res.* 26(1^a), p.427-430, 2006.

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.

CHATKIN, J.M. The influence of genetics on nicotine dependence and the role of pharmacogenetics in treating the smoking habit. *J. bras. pneumol.* v.32, n.6, 2006.

CIRRANA, L. Serotonin as a Modulator of Glutamate- and GABA-Mediated Neurotransmission: Implications in Physiological Functions and in Pathology. *Current Neuropharmacology*, 4, p.101-114, 2006.

DE BARROS GALLO, C; MARICHALAR-MENDIA, X; SETIEN-OLARRA, A; ACHA-SAGREDO, A; BEDIAGA, N.G; GAINZA-CIRAUQUI, M.L; SUGAYA, N.N; AGUIRRE-URIZAR, J.M. Toll-like receptor 2 rs4696480 polymorphism and risk of

oral cancer and oral potentially malignant disorder. *Arch Oral Biol.* 6(82), p.109-114, 2017.

DOMINGOS, P.L; FARIAS, L.C; PEREIRA, C.S; DAS GRAÇAS, P.G; REIS, T.C; SILVA, R.R; FRAGA, C.A; DE SOUZA, M.G; SOARES, M.B; JONES, K.M; MENEZES, E.V; NOBRE, S.A; RODRIGUES, N.J.F; DE PAULA, A.M; VELASQUEZ-MELENDZ, J.G; SENA GUIMARÃES, A.L. Leptin receptor polymorphism Gln223Arg (rs1137101) in oral squamous cell carcinoma and potentially malignant oral lesions. *Springerplus.* 22;3:683, 2014.

GHALLAB, N.A; SHAKER, O.G. Serum and salivary levels of chemerin and MMP-9 in oral squamous cell carcinoma and oral premalignant lesions. *Clin Oral Investig.* 21(3), p.937-947, 2017.

HOYER, D; CLARKE, D.E; FOZARD, J.R; HARTIG, P.R; MARTIN, G.R. et al. International union of pharmacology classification of receptors for 5-Hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacological Reviews.* V.46, n.2, p.157-203, 1994.

HSUE, S.S; WANG, W.C; CHEN, C.H; LIN, C.C; CHEN, Y.K; LIN, L.M. Malignant transformation in 1458 patients with potentially malignant oral mucosal disorders: a follow-up study based in a Taiwanese hospital. *J Oral Pathol Med.* v. 36, n.1, p.25-29, 2007.

HWANG, J.T.K; GU, Y.R; DICKSON, B.J; SHEN, M; RALHAN, R; WALFISH, P.G; MOCK, D; PRITZKER, K.P.H. Straticyte demonstrates prognostic value over oral epithelial dysplasia grade for oral potentially malignant lesion assessment. *Oral Oncol.* p.1-6, 2017

HWU, H.G.; CHEN, C.H. Association of 5HT2A Receptor Gene Polymorphism and Alcohol Abuse With Behavior Problems. *American Journal of Medical Genetics (Neuropsychiatric Genetics)* 96, p.797–800, 2000.

JAKUBCZYK, A.; WRZOSEK, M.; LUKASZKIEWICZ, J.; SADOWSKA-MAZURYK, J.; MATSUMOTO, H.; SLIWERSKA, E.; GLASS, J.; BURMEISTER, M.; BROWER, K.; WOJNAR, M. The CC genotype in HTR2A 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 HTR2A polymorphism predicts relapse in individuals after alcohol treatment. *J Psychiatr Res.* v. 47, n.4, p. 527–533, 2013.

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.

PITIYAGE, G; TILAKARATNE, W.M; TAVASSOLI, M; WARNAKULASURIYA, S. Molecular markers in oral epithelial dysplasia: review. *J Oral Pathol Med.* v.38, n.10, p.737-52, 2009.

POLESSKAYA, O.O; SOKOLOV, B.P. Differential expression of the “C” and “t” alleles of the 5-HTR2A receptor gene in the temporal cortex of normal individuals and schizophrenics. *Journal of Neuroscience Research,* 67, p.812-822, 2002.

POLESSKAYA, O.O; ASTON, C; SOKOLOV, B.P. Allele C-specific methylation of the 5-HT2A receptor gene: evidence for correlation with its expression and expression of DNA methylase DNMT1. *Journal of neuroscience research* 83, p. 362-373, 2006.

PU, X; LIPPMAN, S.M; YANG, H; LEE, J.J; WU, X. Cyclooxygenase-2 gene polymorphisms reduce the risk of oral premalignant lesions. *Cancer.* 2009.

ROZAK, N.I.A.; AHMAD, I.; GAN, S.H.; BAKAR, R.A. Lack of Association between the Serotonin Transporter (5-HTT) and Serotonin Receptor (5-HT2A) Gene Polymorphisms with Smoking Behavior among Malaysian Malays. *Sci Pharm.* 82, p.631–642, 2014.

SANCHEZ, C.L; BISKUP, M.D; HERPERTZ, MD; GABER, T.J; KUHN, C.M. et al. The Role of Serotonin (5-HT) in Behavioral Control: Findings from Animal Research and Clinical Implications. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, p.1–3, 2015.

SHINGLER, E; ROBLES, L.A; PERRY, R; PENFOLD, C; NESS, A; THOMAS, S; ATHENE, L.J; MARTIN, R.M. Tobacco and alcohol cessation or reduction interventions in people with oral dysplasia and head and neck cancer: systematic review protocol. *Syst Rev*. 6(1), 2017

SCULLY, C; BAGAN, J. Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncol*. 45. P. 301-308, 2009.

TAYLOR, D.H; HASSELBLAD, V; HENLEY, S; THUN, M.; SLOAN, F. Benefits of Smoking Cessation for Longevity. *Am J Public Health*. 92(6), p.990–996, 2002.

WHITE, M.J.; YOUNG, R.M.; MORRIS, C.P.; LAWFORD, B.R. Cigarette smoking in young adults: The influence of the HTR2A T102C polymorphism and punishment sensitivity. *Drug and Alcohol Dependence* 114, p.140–146, 2011.

WRZOSEK, M.G.; LUKASZKIEWICZ, J.; WRZOSEK, M.; JAKUBCZYK, C; et al. Association of polymorphisms in HTR2A, HTR1A and TPH2 genes with suicide attempts in alcohol dependence: a preliminary report. *Psychiatry Res*. 190(1), p. 149–151, 2011.

WRZOSEK, M.G.; JAKUBCZYK, A.; WRZOSEK, M.; MATSUMOTO, H.; LUKASZKIEWICZ, J.; KIRK, B.; WOJNAR, M. Serotonin 2A receptor gene (HTR2A) polymorphism in alcohol-dependent patients. *Pharmacological Reports*. 64, p.449–453, 2012.

Tables:

Table 1. Distribution and analysis of variables of interest between dysplasia and control group.

Variables	Dysplasia N (%)	Control N (%)
Gender		
Female	27(32.9)	55(67.1)
Male	11(39.3)	17(60.7)
Genotype		
CC	5(15.6)	24(39.4)*
CT	21(65.6)	34(55.7)
TT	6(18.8)	3(4.9)
Allele		
CC	5(15.6)	24(39.3)*
CT+TT	27(84.4)	37(60.7)
Smoking Habits		
No	12(18.5)	53(81.5)**
Yes	21(65.6)	11(34.4)
Alcohol Consumption		
No	23(35.4)	42(64.6)
Yes	10(31.3)	22(68.8)

Analyzed by χ^2 -test. * p-value < 0.05; ** p-value < 0.001

Table 2. Analysis of variables of interest according to allele distribution in the presence of dysplasia.

Variables	Allele		p-value*
	CC	CT+TT	
Smoking Habits			
No	0(0.0)	10(100.0)	0.532
Yes	3(15.8)	16(84.2)	
Alcohol Consumption			
No	1(5.0)	19(95.0)	0.220
Yes	2(22.2)	7(77.8)	

*Analyzed by χ^2 -test. Significant p-value < 0.05.

Table 3. Crude (c) and adjusted (a) association between variables of interest and the presence of dysplasia.

Variables	OR ^c	95% CI	p-value*	OR ^a	95%CI	p-value*
Gender			0.542			-
Female	1					
Male	1.32	0.54-3.20				
Genotype			0.250			-
CC	1					
CT	9.6	1.78-51.92				
TT	3.2	0.73-14.35				
Allele			0.015			0.036
CC	1			1		
CT/TT	3.50	1.19-10.35		4.60	2.61-22.08	
Smoking Habits			<0.001			<0.001
No	1			1		
Yes	8.43	3.22-22.05		7.58	2.61-22.08	
Alcohol Consumption			0.685			-
No	1					
Yes	0.83	0.34-2.05				

OR^c=odds ratio crude; OR^a=odds ratio adjusted; CI=confidence interval.

*Analyzed by multivariate logistic regression analysis. Significant p-value< 0.05.

10. CONCLUSÃO

Em geral, os resultados do nosso estudo indicaram uma relação entre hábitos de tabagismo e displasia oral em lesões orais potencialmente malignas (LOPM). Contudo, o hábito de fumar e o consumo de álcool não mostraram associação com o polimorfismo T102C na displasia oral em pacientes com LOPM. Além disso, nosso estudo indicou, pela primeira vez, uma possível relação entre o polimorfismo T102C e a displasia oral em lesões orais potencialmente malignas. Esta descoberta poderia estimular novos estudos sobre a via 5HT2A e sua possível associação com displasia em LOPM.

ANEXOS

Anexo A – Carta de informação ao paciente

**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 (CDDB), 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 _____

ANEXO B: Termo de consentimento livre e esclarecido**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

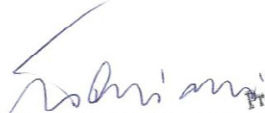
Anexo C – Carta de aprovação do comitê de ética em pesquisa

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

PELOTAS, 19 de novembro de 2008.

PARECER N° 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

Prof. Marcos A. Torriani
Coordenador
Comitê de Ética e Pesquisa

ANEXO D: 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/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°DIA
<input type="checkbox"/> XÍCARA	
<input type="checkbox"/> MEIA TAÇA	
<input type="checkbox"/> XÍCARA 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 ALCOOL (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/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°DIA	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 DA 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	NºDIA
<input type="checkbox"/> Vinho		
<input type="checkbox"/> Cerveja		
<input type="checkbox"/> Bebidas destiladas (aguardente, vodca, uisque...)		

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!!!

ANEXO E: 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.

