

**EVANDRO NEVES ABDO**

**FREQÜÊNCIA DE POLIMORFISMO  
FUNCIONAL DA REGIÃO PROMOTORA DO  
GENE 5-HTT COMO FATOR DE RISCO PARA O  
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DA  
CAVIDADE BUCAL: UM ESTUDO CASO-CONTROLE**

**BELO HORIZONTE  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UFMG  
2006**

**EVANDRO NEVES ABDO**

**FREQÜÊNCIA DE POLIMORFISMO FUNCIONAL  
DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE 5-HTT COMO  
FATOR DE RISCO PARA O CARCINOMA DE CÉLULAS  
ESCAMOSAS DA CAVIDADE BUCAL.**

**UM ESTUDO CASO-CONTROLE**

**TESE APRESENTADA AO PROGRAMA DE  
DOUTORADO DA FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DA UFMG, COMO REQUISITO  
PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE  
DOUTOR EM ODONTOLOGIA.**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ESTOMATOLOGIA**

**ORIENTADORES:**

**PROF. DR. RICARDO SANTIAGO GOMEZ**

**PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. ISABELA ALMEIDA PORDEUS**

**BELO HORIZONTE**

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UFMG**

**2006**

**COLABORADORES****PROFESSOR ALVIMAR AFONSO BARBOSA****Faculdade de Medicina da UFMG****Cirurgião de Cabeça e Pescoço****JEANE DE FÁTIMA CORREIA-SILVA****Doutoranda em Farmacologia Bioquímica e Molecular (UFMG)**

## DEDICATÓRIA

À minha esposa, Maria Goretti Ferraz Abdo, a pessoa que mais acreditou em mim. A você dedico esta e todas as outras conquistas da minha vida.

Aos meus filhos, André Ferraz Abdo e Patrícia Ferraz Abdo, nos quais eu me espelho na busca pela esperança e pela alegria de viver.

Aos meus pais, Salomão Abdo (*in memorian*) e Dalva Neves Abdo, os meus maiores marcos de referência na vida.

Aos meus sogros, Anselmo Ferraz (*in memorian*) e Ady Pereira Ferraz (*in memorian*), pelo afeto que sempre me dedicaram.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez e Profa. Dra. Isabela Almeida Pordeus, pela confiança que depositaram em mim, pela amizade e pelo muito que me ensinaram.

## **AGRADECIMENTOS**

À toda minha família, irmão, irmãs, sobrinhos, sobrinhas, cunhados, cunhadas, concunhados e concunhadas pelo apoio que sempre demonstraram.

Um agradecimento especial à Jeane de Fátima Correia-Silva pela inestimável ajuda.

À turma do Laboratório de Biologia Molecular da FOUFMG: André Luiz Sena Guimarães, Elisa Barroso Duarte, Carolina Cavaliéri Gomes, Luciano Marques Silva, Flávio Juliano Santos Garcia Pimenta.

À Dra. Maria Letícia Ramos Jorge, pela orientação na análise estatística.

**NÃO DIGAIS: “ENCONTREI A VERDADE”.**  
**DIZEI DE PREFERÊNCIA: “ENCONTREI UMA**  
**VERDADE”.**

**GIBRAN KHALIL GIBRAN**  
**(06/12/1883 – 10/04/1931)**

**..... E CANTAR A BELEZA DE SER UM**  
**ETERNO APRENDIZ.**

**LUIZ GONZAGA DO NASCIMENTO JÚNIOR (GONZAGUINHA)**  
**(22/09/1945 - 24/04/1991)**

## RESUMO

O fumo e o álcool são considerados os principais fatores de risco para o carcinoma de células escamosas de boca. Tem-se demonstrado uma relação entre os polimorfismos da região promotora do transportador de serotonina (5-HTTLPR) com o consumo de fumo e álcool, principalmente o alelo curto (s) que é associado com uma reduzida transcrição do 5-HTT. Com objetivo de verificar a frequência desses polimorfismos em pacientes com carcinoma de células escamosas de boca, um estudo do tipo caso-controle incluiu 103 pacientes com o carcinoma e 103 indivíduos saudáveis, pareados por sexo, idade e consumo de fumo. Após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais as entrevistas foram realizadas e o material coletado por raspagem da mucosa bucal em todos os pacientes. Os dados foram analisados pelo teste do qui-quadrado de Pearson (valor de  $p \leq 0,05$ ). A frequência alélica entre os grupos caso e controle foi respectivamente: alelo longo (l) (55,8% e 49,5%); alelo curto (s) (44,2% e 50,5%), não sendo estatisticamente significativa ( $p=0,118$ ). A distribuição dos genótipos foi: grupo caso (l/s 51,5%; l/l 30,1%; s/s 18,4%) e controle (l/s 42,7%; l/l 33,0%; s/s 24,3%), não sendo diferente estatisticamente ( $p=0,408$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa na distribuição dos genótipos, entre casos e controles, com as variáveis: fumantes e não fumantes; etilistas e não etilistas; consumo de fumo e etanol; tempo de duração dos hábitos. Concluiu-se que na população estudada o hábito de fumar e/ou beber não foi relacionado com os polimorfismos da região promotora do gene 5-HTT. Este polimorfismo não foi um fator de risco para o carcinoma de células escamosas de boca.

### **Palavras-chave:**

transportador de serotonina; 5-HTT; carcinoma de células escamosas de boca.

## ABSTRACT

Even though tobacco and alcohol are considered risk factors for oral carcinoma, depression has also been identified as an important determinant. An association between polymorphism of the promoter region of serotonin transporter (5-HTTLPR) and tobacco and alcohol consumption has been demonstrated. The short allele (s) has been associated with a reduction in 5-HTT transcription. With the objective of assessing the frequency of such polymorphism in subjects with oral squamous cell carcinoma, a case-control study was carried out. One hundred and three subjects with oral carcinoma were paired for gender, age and tobacco use with 103 healthy controls. After approval by the Ethics Committee, interviews were conducted and mucous swabs collected from all subjects. Data analysis involved Pearson's chi-squared test ( $p\text{-value} \leq 0.05$ ). No statistical differences ( $p= 0.118$ ) were observed between allelic frequencies for case and control groups: long allele (l) (55.8% and 49.5%), short allele (s) (44.2% and 50.5%). No statistical differences ( $p= 0.408$ ) were detected between genotypes distribution for cases (l/s 51.5%; l/l 30.1%; s/s 18.4%) and controls (l/s 42.7%; l/l 33.0%; s/s 24.3%). No statistical differences were identified between genotype distributions amongst cases and controls in relation to smokers and non-smokers, alcohol consumers and non-consumers, amount of tobacco and alcohol consumption and duration of such habits. It was therefore concluded that smoking and alcohol habits were not associated with polymorphisms of the promoter region of serotonin transporter (5-HTTLPR). This polymorphism was not a risk factor to oral squamous cell carcinoma.

### **Key words:**

Serotonin transporter; 5-HTT; oral squamous cell carcinoma.



## LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

- ALDH2: aldeído desidrogenase tipo 2
- CCE: Carcinoma de células escamosas
- CCEB: Carcinoma de Células Escamosas Bucal
- CID-10: Classificação Internacional de Doenças – 10ª revisão
- Cl: cloro
- COEP: Comitê de Ética em Pesquisa
- COMT: catechol-O- methyltransferase
- DNA: *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucléico)
- DP: desvio padrão
- DRD2: receptor de dopamina tipo 2
- EBV: Epstein-Barr Vírus (*Virus Epstein-Barr*)
- EUA: Estados Unidos da América
- FOUFMG: Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais
- FR: Fator de Risco
- GLB: gel loading buffer
- HCV: *Hepatitis C virus* (Vírus da Hepatite C)
- HIV: *Human immunodeficiency virus* (Vírus da Imunodeficiência Humana)
- HPV: *Human papilloma virus* (Vírus do Papiloma Humano)
- HSV: *Herpes simplex virus* (Vírus do Herpes Simples)
- HT: hidroxitriptamina (serotonina)
- HTT: hidroxitriptamina transproter -serotonin transproter (transportador de serotonina)
- HTTLPR: Sertotonin transporter-linked polymorfism region
- IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- INCA: Instituto Nacional de Câncer
- Kb: quilobase
- L: long (longo)
- MAO: monoaminaoxidase
- mRNA: ribonucleic acid messenger (RNA mensageiro)
- Na: sódio

OMS: Organização Mundial de Saúde

PB: pares de base

PCR: Polymerase chain reaction – reação em cadeia da polimerase

S: short (curto)

SNC: sistema nervoso central

SSRIs: selective serotonin reuptake inhibitors (inibidor seletivo de recaptação de serotonina)

SUS: Sistema Único de Saúde

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

VNTRs: variable number of tandem repeat (nº variável de repetições em tandem)

8-OH-dG: 8-dihydroxydeoxyguanosine (dihidroxiguanosina)

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1- Definição de categorização das variáveis independentes relacionadas aos pacientes .....	35
QUADRO 2- Definição de categorização das variáveis independentes relacionadas com o polimorfismo do gene 5-HTT .....	36
QUADRO 3- Definição de categorização das variáveis independentes relacionadas aos fatores de exposição .....	36
QUADRO 4- Iniciadores utilizados na reação de PCR .....	38
QUADRO 5- Condições de PCR com indicação dos componentes da reação.....	38
QUADRO 6- Protocolo para coloração do gel de poliacrilamida pela prata.....	39

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Parte da região promotora do gene que codifica 5-HTT .....	38
FIGURA 2- Gel de poliacrilamida corado pela prata .....	40

**LISTA DE TABELAS**

TABELA 1- Caracterização da amostra quanto ao gênero, idade e hábitos.....	41
TABELA 2- Distribuição do grupo casos de acordo com o sítio anatômico .....	41
TABELA 3- Distribuição dos grupos quanto ao consumo de fumo.....	42
TABELA 4- Distribuição dos grupos quanto ao consumo de etanol... ..	42
TABELA 5- Distribuição dos genótipos de acordo com o sítio anatômico. ....	43
TABELA 6- Frequência alélica dos sítios anatômicos e dos grupos casos e controles..	44
TABELA 7- Frequência dos genótipos l/s+s/s em comparação com o genótipo l/l.....	44
TABELA 8- Frequência dos genótipos l/l+l/s em comparação com o genótipo s/s.....	45
TABELA 9- Frequência dos genótipos em relação ao tempo de tabagismo .....	45
TABELA 10- Frequência dos genótipos em relação ao número de cigarros por dia .....	46
TABELA 11- Frequência dos genótipos em relação à duração do etilismo.....	46
TABELA 12- Frequência dos genótipos em relação ao consumo diário de etanol.....	47
TABELA 13- Frequência dos genótipos dos pacientes fumantes e nunca fumantes .....	47
TABELA 14- Frequência dos genótipos dos pacientes etilistas e não etilistas .....	48

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	14
2 OBJETIVOS .....	16
3 REVISÃO DA LITERATURA .....	17
4 METODOLOGIA .....	31
5 RESULTADOS .....	41
6 DISCUSSÃO .....	49
7 CONCLUSÕES .....	55
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	56
9 ANEXOS .....	65

## 1 INTRODUÇÃO

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o câncer bucal no Brasil, ocupa o 6º lugar entre o sexo masculino e o 7º lugar entre as mulheres em relação aos cânceres que acometem os seres humanos, sendo estimados para o ano de 2006, uma incidência de 13.470 novos casos (BRASIL, 2006).

Embora a expressão “câncer de boca” seja utilizada para definir qualquer neoplasia maligna da cavidade bucal, o Carcinoma de Células Escamosas (CCE) corresponde à cerca de 90% dos cânceres que acometem a boca (LEITE e KOIFMAN, 1998).

O Carcinoma de Células Escamosas Bucal (CCEB) é uma doença multifatorial, com diversos fatores de risco envolvidos em sua ocorrência, tais como alterações genéticas; exposições a agentes de comprovada ação carcinogênica, como radiação solar, tabaco, álcool; avitaminoses; imunossupressões (Aids e outras formas). Tem sido relacionado com infecções como a candidíase ou associado a vírus como o da imunodeficiência humana (HIV), do herpes simples tipo 1 (HSV), do papiloma humano (HPV) e Epstein-Barr (EBV) (FRANCO *et al.*, 1989; JOKELAINE *et al.*, 1996; D’COSTA *et al.*, 1998; LLEWELLYN *et al.*, 2004; MORENO-LÓPEZ *et al.*, 2000; SHIMA *et al.*, 2000).

O avanço do conhecimento sobre a biologia molecular tem proporcionado a realização de inúmeros trabalhos sobre a participação de genes no desenvolvimento do câncer. Vários genes têm sido correlacionados com o CCEB, no intuito de desvendar o complexo mecanismo da carcinogênese, tais como: p53, p16/INK4A, GSTM1 entre outros (DRUMMOND *et al.*, 2002; DRUMMOND *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2004; NAGAI *et al.*, 1995).

Estudos com base na biologia molecular têm correlacionado o gene transportador de serotonina – *hidroxitriptamina transporter* (5-HTT) com a tendência ao tabagismo e ao etilismo (HAMMOUMI *et al.*, 1999; KONISHI *et al.*, 2004; LERMAN *et al.*, 2000; MATSUSHITA *et al.*, 2001; PREUSS *et al.*, 2001). A literatura consultada registra trabalhos sugerindo que os polimorfismos da região promotora do 5-HTT possam estar também relacionados como responsável por alterações do humor,

agressividade, depressão entre outros fatores através do estudo de seu polimorfismo entre diversas populações (LESCH *et al.*, 1996; HERMAN *et al.*, 2003; JERNEJ *et al.*, 2004; THOMPSON *et al.*, 2000).

Tendo em vista a possível relação do 5-HTT com fatores de risco associados ao CCEB (alcooolismo e tabagismo), o objetivo deste trabalho foi investigar a frequência de polimorfismos da região promotora desse gene em pacientes portadores do carcinoma de células escamosas bucal.

## **2 OBJETIVOS**

### 2.1 Objetivo geral

- Investigar a ocorrência de polimorfismos na região promotora do gene 5-HTT em pacientes com CCEB.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a frequência de polimorfismos na região promotora do gene 5-HTT em relação ao uso de álcool e fumo.

- Comparar a frequência de polimorfismos na região promotora do gene 5-HTT entre os pacientes portadores e não-portadores de CCEB.



### 3 REVISÃO DA LITERATURA

O CCEB é uma neoplasia que tem sido descrita como associada ao estilo de vida de uma pessoa. Dessa forma sua prevalência está relacionada com aspectos comportamentais, como o consumo de bebidas alcoólicas, tabagismo, fatores culturais, educacionais e socioeconômicos (DAY *et al.*, 1993; FRANCO *et al.*, 1989; GÜNERI *et al.*, 2005; HASHIBE *et al.*, 2003; SCIUBBA, 2001).

Em função dessas características o CCEB apresenta taxas de incidência variáveis de um país para outro ou até mesmo dentro do próprio país. Enquanto a Índia apresenta uma incidência de 21,1 casos por 100.000 habitantes (D' COSTA *et al.*, 1998), no Brasil o INCA estima para o ano de 2006 uma taxa de 15,01 por 100.000 habitantes para o sexo masculino e de 4,92 para o sexo feminino (BRASIL, 2006). Por outro lado na Escócia a incidência de câncer de boca e faringe apresenta uma taxa de 3,9 homens por 100.000 habitantes. Para mulheres o valor estimado é de 1,9 (LLEWELYN e MITCHELL, 1994).

Tem-se observado ao longo das últimas décadas, uma incapacidade de diagnosticar precocemente as doenças malignas, entre elas o câncer de boca, fato este evidenciado pelo grande número de tumores diagnosticados em estágio tardio (ABDO *et al.*, 2002; ANTUNES *et al.*, 2000; GERVÁZIO *et al.*, 2001). Isto tem refletido no índice de mortalidade que tem permanecido estacionário, sem evidências de uma regressão do quadro (ANTUNES *et al.*, 2000).

O gene do 5-HTT tem sido relacionado com o consumo de fumo e etanol que são considerados os dois principais fatores de risco para o CCEB (HAMMOUMI *et al.*, 1999; GERRA *et al.*, 2005; SURTEES *et al.*, 2006). A literatura também relata uma relação desse gene com alterações comportamentais e estas por sua vez têm sido relacionadas como possíveis fatores de risco para o câncer de uma maneira geral.

#### 3.1 Os fatores de risco para o CCEB

Embora o CCEB seja uma doença multifatorial vamos considerar os dois principais fatores de risco, ou seja, o consumo de fumo e de bebidas alcoólicas. Uma vez que os polimorfismos da região promotora do 5-HTT também estão relacionados

com alterações comportamentais, teceremos algumas considerações sobre a possível relação entre a depressão e o câncer de uma maneira geral.

### 3.1.1 O consumo de álcool e fumo como fatores de risco para o câncer bucal

O consumo de álcool e de fumo tem sido considerado como os dois maiores fatores de risco para o desenvolvimento do CEEB conforme tem sido observado em pesquisas realizadas em diversos países.

#### 3.1.1.1 O fumo como fator de risco

A correlação entre o fumo e o câncer bucal foi primeiramente observada por Sir James Paget em 1870, que notificou a relação entre o uso de cachimbo e o câncer de palato, conforme relatou Bouquot (1999).

O tabagismo e o etilismo têm sido considerados universalmente como os principais fatores de risco para o câncer do aparelho aero-digestivo superior, estando associados com aproximadamente 75% dos casos (GARROTE *et al.*, 2001; OGDEN, 2005; OGDEN e WIGHT, 1998).

O risco para o desenvolvimento do CCEB entre pacientes fumantes é estimado entre 10,0 a 20,0 vezes maior do que em pacientes não fumantes, variando de acordo com os hábitos regionais, ao tipo, ao tempo e a quantidade de fumo utilizado, conforme observado em diversos trabalhos publicados no mundo (ANDRE *et al.*, 1995; FRANCO *et al.*, 1989; GARROTE *et al.*, 2001; MORENO-LÓPEZ, *et al.*, 2000).

#### 3.1.1.2 O álcool como fator de risco

O álcool puro não tem sido reconhecido como carcinogênico em animais de laboratório, porém as bebidas alcoólicas tem sido associadas ao desenvolvimento do CCEB, podendo este hábito ser um potencializador para outros fatores de risco (BLOT, 1992; DU *et al.*, 2000; OGDEN e WIGHT, 1998).

O consumo de álcool nas suas mais diversas formas aumenta o risco para o desenvolvimento do CCEB de 5,0 a 30,0 vezes em relação à ausência de consumo,

dependendo do tipo de bebida, da quantidade ingerida de etanol e do tempo de uso, conforme tem sido observado mundialmente (ALTIERI *et al.*, 2004; ANDRE *et al.*, 1995; FRANCO *et al.*, 1989; LEWIN *et al.*, 1998; MORENO-LÓPEZ, *et al.*, 2000; ZAVRAS *et al.*, 2001).

### 3.1.1.3 Associação do álcool com o fumo como fatores de risco

O risco ao CCEB é consideravelmente aumentado quando ocorre a associação do consumo de fumo e álcool, sendo maior que a soma dos valores individuais. Blot *et al.* (1988), em estudo de caso-controle com 1.114 pacientes e 1.268 controles em quatro áreas dos Estados Unidos, concluíram que o fumo e o álcool associados estavam relacionados com aproximadamente  $\frac{3}{4}$  dos casos de CCEB e CCE da orofaringe, sendo assim os principais fatores responsáveis por esses tumores.

Pesquisa realizada no Brasil concluiu que entre não fumantes, os etilistas inveterados apresentam 9,2 vezes mais risco de desenvolverem o CCEB e o câncer de faringe e supraglote que os não etilistas. Concluiu-se que o álcool pode atuar como um co-fator com o fumo ou como um fator de risco independente (SCHLECHT *et al.*, 1999).

Em trabalho realizado em Madrid, comparando o risco de CCEB entre consumidores de álcool, fumantes e os hábitos de higiene bucal, concluiu-se que o consumo de 6 a 20 cigarros/dia apresenta um odds ratio (OR) de 3,1 e de 7,96 para o consumo de mais de 20 cigarros/dia. O consumo de mais de 50 g de álcool/dia resultou em um OR de 5,3. Concluiu-se que o maior risco está relacionado com o consumo de fumo e álcool e não com hábitos de higiene bucal (MORENO-LÓPEZ *et al.*, 2000).

Llewellyn *et al.* (2004), em um estudo realizado no Sul da Inglaterra, encontraram que, mesmo entre jovens, o consumo de álcool e fumo associados aumenta em quatro vezes o risco para o CCEB.

Zeka *et al.* (2004) realizaram uma meta-análise com 14 estudos epidemiológicos sobre os fatores de risco para o câncer do trato aerodigestivo superior e concluíram que os efeitos carcinogênicos do álcool e do fumo tendem a multiplicar o risco relativo para o desenvolvimento do carcinoma.

### 3.1.2 Alterações comportamentais como fator de risco para o câncer

Apesar de nenhum dos artigos pesquisados relacionar especificamente o câncer bucal com alterações comportamentais, a hipótese de que a depressão e outras alterações afetivas sejam fatores de risco para o desenvolvimento do câncer em geral tem sido levantada por vários autores, através de estudos epidemiológicos, com resultados diversos.

Um estudo com base nos dados do *National Health and Nutrition Examination Survey I Epidemiologic Follow-up Study*, nos Estados Unidos da América (EUA), concluiu que nenhum risco significativo de morbidade ou mortalidade por câncer foi associado a sintomas depressivos (ZONDERMAN *et al.*, 1989).

Spielger e Kato (1996), em uma revisão sistemática da literatura, concluíram que pesquisas epidemiológicas proporcionam suporte para uma ligação entre variáveis psicossociais e a progressão do câncer mas não encontraram ligação entre estas variáveis e o desenvolvimento do câncer.

Contrários aos resultados acima, outros trabalhos epidemiológicos têm investigado esta hipótese mostrando um aumento da incidência de câncer em pessoas deprimidas (DENOLLET, 1999).

McGee *et al.* (1994), em uma meta-análise de 7 estudos longitudinais prospectivos, concluíram que há uma pequena associação entre depressão e o desenvolvimento de câncer.

Uma relação entre os efeitos da depressão crônica sobre a incidência de câncer em geral foi encontrada, mesmo após o controle estatístico do efeito do cigarro como fator de risco. Foi observada uma incidência de câncer de 30,5 por 1000 pessoas/ano entre indivíduos com depressão crônica e de 21,9 por 1000 pessoas/ano entre pessoas não deprimidas cronicamente. A depressão quando presente por ao menos 6 anos aumentou o risco para o desenvolvimento de câncer (PENNINX *et al.*, 1998).

Um estudo com base populacional, com 13 anos de acompanhamento de uma população de 3.109 pessoas vivendo em Baltimore, concluiu que não houve uma associação de depressão maior com o aumento de risco para o desenvolvimento de câncer. Os autores ressaltam que se constatou um aumento de risco para o câncer de mama entre as mulheres com depressão (GALLO *et al.*, 2000).

Dalton *et al.* (2002), em um estudo com base em registros de pacientes hospitalizados com desordens afetivas, no período de 1969 a 1993 na Dinamarca, não encontraram nenhuma evidência que a depressão possa aumentar o risco para o desenvolvimento do câncer.

Ollonen *et al.* (2005) não encontraram evidências que associassem a ansiedade, depressão e sintomas psiquiátricos ao desenvolvimento do câncer de mama, em um estudo de caso-controle realizado na Finlândia.

Irie *et al.* (2005) avaliaram a atuação do *8-dihydroxydeoxyguanosine* (8-OH-dG), um radical oxidativo que tem sido associado ao início do câncer como também ao estado depressivo. Com base nos resultados os autores concluíram que a depressão é um fator de risco para o início do câncer devido aos danos oxidativos no DNA.

Alguns autores, no entanto, constataram que o efeito da depressão sobre o desenvolvimento do câncer está associado também ao alto consumo de fumo. O hábito de fumar e o de ingerir álcool podem ser olhados como um fator de confundimento na possível associação entre depressão e câncer. A depressão pode levar o indivíduo a fumar e/ou a beber e indiretamente levar a um aumento do risco para o câncer (DALTON *et al.*, 2002; LINKINS e COMSTOCK, 1990).

Garssen (2004), revendo 70 estudos longitudinais prospectivos sobre a influência de fatores psicológicos no desenvolvimento do câncer, realizados nos últimos 30 anos, concluíram que nenhum fator psicológico que possa influenciar no desenvolvimento do câncer foi convincentemente comprovado.

### 3.2 O gene do transportador de serotonina (5-HTT)

O papel desempenhado pelo gene 5-HTT no mecanismo que envolve a neurotransmissão tem sido pesquisado de uma maneira intensa.

#### 3.2.1 A serotonina

A serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT) é uma monoamina neurotransmissora, sintetizada a partir do aminoácido triptofano em neurônios chamados serotoninérgicos, no sistema nervoso central (SNC) e nas células

enterocromafins no trato gastrintestinal. A serotonina é transformada em um metabólito inativo pela monoaminaoxidase (MAO). Acredita-se que a serotonina tenha um importante papel na bioquímica da depressão, desordem bipolar e ansiedade, bem como se supõe ter influência sobre a sexualidade. A serotonina (5-HT) é lançada das vesículas terminais dos neurônios serotoninérgicos dentro da fenda sináptica, onde ela ativa receptores de serotonina nos dendritos nos neurônios adjacentes. A ação serotoninérgica é controlada, tanto em intensidade como em tempo de duração, fundamentalmente pela recaptação de 5-HT das sinapses. Isto é feito principalmente por uma monoamina específica transportadora de 5-HT, conhecida como 5-HT recaptadora transportadora-*serotonin transporter* (5-HTT), na sinapse neural (OWENS e NEMEROFF, 1994; OGILVIE *et al.*, 1996).

### 3.2.2 O gene codificador do transportador de serotonina

O gene codificador do transportador de serotonina (5-HTT) foi identificado como SLC6A4 e apresenta uma seqüência de 31 kb organizada em 14 exons, estando localizado no cromossomo 17q12, provavelmente flanqueado por D17S58 e D17S73. (LESCH *et al.*, 1994; OGILVIE *et al.*, 1996).

O 5-HTT é membro da família dos genes transportadores de membrana dependentes de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  e controladores da propagação do sinal serotoninérgico pela recaptação de 5-HT da fenda sináptica imediatamente após a sua liberação e retornando-a para o terminal pré-sináptico aonde é metabolizada pela MAO e armazenada em vesículas secretoras. O 5-HTT está localizado na membrana de neurônios serotoninérgicos e é a chave reguladora da neurotransmissão serotoninérgica (HEILS *et al.*, 1996; OWENS e NEMEROFF, 1994).

Heils *et al.* (1996) descreveram um polimorfismo, que consiste em uma série de repetições dentro da região promotora do gene (região ondulatória 5'), denominado *Serotonin transporter-linked polymorphism region* (5-HTTLPR). Esse polimorfismo (5-HTTLPR) apresenta duas variantes alélicas que diferem entre si por 44 pares de base (pb). A variante alélica longa (l) é composta pelos 6 elementos de repetição e a variante curta (s) é gerada pela deleção de 44 pares de base. Dessa forma o alelo longo possui 528 pb e a variante curta, 484 pb.

Indivíduos com o alelo longo (l) desse polimorfismo têm uma transcrição mais eficiente da região promotora do que os portadores do alelo curto (s), levando a uma maior expressão e captação celular de serotonina no neurônio serotoninérgico pré-sináptico. Esta maior captação celular de serotonina resulta em uma rápida remoção de 5-HT na fenda sináptica e reduz a neurotransmissão por serotonina. A variante alélica curta aparentemente está associada com uma redução da eficiência de transcrição do 5-HTT base (HEILS *et al.*, 1996; LESCH *et al.*, 1996).

Experimentos têm mostrado que o alelo l do 5-HTTLPR é mais eficiente promotor que o alelo s e que as células com genótipo l/l produzem mais mRNA transportador de serotonina que as células com genótipo l/s e s/s (HEILS *et al.*, 1996).

O alelo curto (s) aparenta ser funcionalmente dominante sobre o alelo longo (l). Assim células heterozigotos comportam-se como células homozigotos para o alelo s (LESCH *et al.*, 1996).

### 3.2.3 Conceito de polimorfismo

Existem duas categorias de variação descontínua com base em simples diferenças alélicas. Em uma população natural, a existência de duas ou mais variantes descontínuas comuns é chamada de polimorfismo. Variantes excepcionais e raras são chamadas de mutantes. Assim, o polimorfismo tem sido conceituado como a ocorrência em uma população (ou entre populações) de várias formas fenotípicas associadas a alelos de um gene ou homólogos de um cromossomo (GRIFFITHS *et al.*, 2002).

### 3.2.4 Frequência alélica do polimorfismo do 5-HTTLPR entre as populações

As pesquisas sobre o envolvimento do 5-HTTLPR em diversas situações utilizam grupos controle não expostos aos fatores estudados. A frequência dos alelos do gene nesses grupos mostra uma variabilidade na distribuição de acordo com as características das populações em estudo.

Gelernter *et al.* (1999) encontraram uma frequência do alelo longo em torno de 70% em populações africanas e afro-americanas. Já em populações européias a frequência do alelo longo foi de 50% e entre japoneses foi encontrado o valor de 30%.

Lerman *et al.* (1998) em um trabalho sobre o polimorfismo do 5-HTTLPR realizado nos EUA, envolvendo 424 caucasianos e 74 afro-americanos, observaram uma distribuição dos genótipos entre caucasianos e afro-americanos respectivamente de: 52,6% e 37,8% (l/s); 30,7% e 50,0% (l/l); 16,7% e 12,2% (s/s).

Thompson *et al.* (2000) encontraram no Canadá, entre 152 controles descendentes de europeus, uma frequência alélica de 61% (l) e de 39% (s). A frequência de genótipos foi de 44% (l/s), 41% (l/l) e 15% (s/s).

Kranzler *et al.* (2002) estudando o alcoolismo em uma amostra de europeus-americanos e afro-americanos, encontraram no grupo controle uma frequência alélica, respectivamente de: 58% (l) e 42% (s); 82% (l) e 18% (s).

Kim, W.K. *et al.* (2005) pesquisaram a relação entre o polimorfismo do 5-HTTLPR com a ocorrência de enxaqueca em uma população coreana. Em 170 controles saudáveis os autores encontraram uma frequência alélica de 75,6% (s) e 24,4% (l). A distribuição do genótipo entre os controles foi 38,2% (l/s) e 5,3% (l/l), 56,5% (s/s).

No Brasil poucos trabalhos têm mostrado a distribuição dos genótipos do 5-HTTLPR na população.

Oliveira *et al.* (1998) estudaram o polimorfismo da região promotora do gene 5-HTT em uma população brasileira de pacientes afetados por esquizofrenia e desordem bipolar. Os genótipos encontrados no grupo controle, formado por pacientes saudáveis, foram l/s (43%), l/l (39%) e s/s (16%). A frequência alélica observada foi de: l (62%) e s (38%).

Victória *et al.* (2005), em um estudo sobre a relação do 5-HTTLPR com a ocorrência de estomatite aftosa recorrente em uma população brasileira, encontraram a seguinte frequência alélica no grupo controle: longo (58%); curto (42%). Os genótipos encontrados apresentaram a seguinte distribuição: l/s (42,8%), l/l (37,2%) e s/s (20,0%).

A frequência dos genótipos do 5-HTTLPR em relação ao gênero não tem sido estatisticamente significativa em estudos de caso-controle. Em uma meta-análise sobre uma possível diferença entre os sexos na associação entre o gene 5-HTT e o neuroticismo, Munafó *et al.* (2004) não encontraram nenhuma interação significativa entre sexo e genótipo. Da mesma forma Limosin *et al.* (2005), em um estudo sobre suicídio e alcoolismo e Sjöberg *et al.* (2005) em um estudo sobre o desenvolvimento de depressão, não observaram uma diferença entre os gêneros nas populações estudadas.



### 3.2.5 Associação do 5-HTTLPR com alterações comportamentais, tabagismo e alcoolismo.

A hipótese que o polimorfismo da região promotora do gene que codifica o 5-HTT esteja associado a alterações do comportamento tem sido investigada. Os estudos com bases moleculares sobre as alterações psicológicas e comportamentais têm evidenciado um papel importante do Gene Transportador de Serotonina (5-HTT) na depressão, alterações de humor, esquizofrenia, tendência a suicídio, alcoolismo e tabagismo (HERMAN *et al.*, 2003; JERNEJ *et al.*, 2004; PREUSS *et al.*, 2001; SANJUAN *et al.*, 2005; THOMPSON *et al.*, 2000).

Lesch *et al.* (1996), em um estudo com base em uma amostra composta por caucasianos, predominantemente formada por indivíduos do sexo masculino, concluíram que os participantes com a variante curta (s) do 5-HTTLPR apresentaram uma maior nível de neuroticismo. Os autores concluíram que indivíduos com uma ou duas cópias do alelo curto (l/s e s/s) exibiram níveis mais elevados de neuroticismo que os homozigotos para o alelo longo (l/l).

Gorwood *et al.* (2000) analisaram o papel do polimorfismo do 5-HTTLPR no risco para tentativa de suicídio em uma população de indivíduos álcool-dependentes do sexo masculino. Os autores concluíram que o alelo curto (s) não apresentou relação com a dependência alcoólica e depressão mas foi associado com um risco aumentado para a tentativa de suicídio.

Conflitante com esses resultados, Williams *et al.* (2001) encontraram em um estudo sobre o papel do estresse em doenças cardiovasculares, uma maior relação da alteração emocional com o alelo longo.

Joiner *et al.* (2003) realizaram um estudo para verificar a relação entre o 5-HTT e uma história familiar para depressão. Os autores encontraram uma significativa relação entre a história familiar de depressão e o genótipo s/s.

Wilhelm *et al.* (2006) estudaram a relação entre os polimorfismos do 5-HTT com o início da depressão, em um trabalho realizado em Sydney. Os autores concluíram que os eventos adversos da vida têm um grande impacto sobre o início da depressão em indivíduos com o genótipo s/s.

Surtees *et al.* (2006) estudaram a associação do alelo curto (s) da região polimórfica associada ao gene transportador de serotonina (5-HTT) com o aumento de risco para desordem depressiva entre indivíduos expostos à adversidade social. Embora a experiência de adversidades tenha sido associada à desordem depressiva maior nenhuma associação com o genótipo do 5-HTTLPR foi observada.

A interação entre o gene 5-HTT e o neuroticismo associado à dependência nicotínica e ao hábito de fumar é sugerida em um trabalho multicêntrico realizado em uma amostra de 185 fumantes (46% homens, 54% mulheres, 85% caucasianos e 15% afro-americanos). Os resultados sugeriram que o neuroticismo foi positivamente associado com o hábito de fumar entre fumantes com o genótipo 5-HTTLPR-S. Os autores concluíram que a avaliação do genótipo 5-HTTLPR e neuroticismo pode ser útil para identificar fumantes que respondem melhor à medicação psicotrópica, tal como os inibidores seletivos de recaptção de serotonina (*selective serotonin reuptake inhibitors* – SSRIs) (LERMAN *et al.*, 2000).

Hu *et al.* (2000), em um estudo com gêmeos idênticos, pesquisaram a interação entre o gene 5-HTT e o neuroticismo no comportamento tabagista entre fumantes, nunca fumantes e ex-fumantes. O neuroticismo foi positivamente relacionado com o hábito de fumar e a dificuldade em interromper o hábito e o genótipo 5-HTTLPR-S. Somente os indivíduos com o genótipo s do 5-HTTLPR e um alto nível de neuroticismo tiveram o risco de fumar aumentado e uma dificuldade de parar de fumar. Não foi encontrada uma relação direta entre o hábito de fumar e os polimorfismos do 5-HTTLPR, na ausência do neuroticismo.

Munafò *et al.* (2003), em uma meta-análise incluindo 79 estudos sobre polimorfismos genéticos e características da personalidade, concluíram que somente o polimorfismo do 5-HTTLPR apresentou associação estatisticamente significativa com aspectos associados a desordens afetivas.

Munafò *et al.* (2004) realizaram uma meta-análise com base em 22 estudos sobre polimorfismos genéticos e características de personalidade e não encontraram elementos que confirmem o efeito moderador do gênero sobre a associação do alelo curto (s) do gene 5-HTT com o neuroticismo.

Os resultados conflitantes sobre a relação entre as duas variantes do polimorfismo do 5-HTTLPR e a vulnerabilidade para desordens psiquiátricas podem ser

devido a fatores ligados ao gênero e/ou questões étnicas sobre a neurotransmissão por serotonina (MIZUNO *et al.*, 2006).

Alguns artigos têm relacionado positivamente o polimorfismo do 5-HTTLPR com o hábito de consumir bebidas alcoólicas.

Türker *et al.* (1998), em um estudo do tipo caso-controle com 713 indivíduos de origem caucasiana, observaram que uma maior frequência do alelo curto (s) está associada com uma maior tolerância ao etanol. Os homozigotos para a variante s do 5-HTTLPR apresentaram uma frequência de 32,8% entre os adultos com alta tolerância ao etanol comparada com 18,0% no grupo controle.

Hammoumi *et al.* (1999), pesquisando a frequência do alelo curto (5-HTTLPR) em estudo caso-controle envolvendo indivíduos álcool-dependentes, encontraram uma prevalência significativa de 45,5% ( $p=0,0081$ ). Os autores acreditam que seja possível usar esta detecção do alelo curto como uma ferramenta clínica para o diagnóstico e recuperação de alcoólatras.

Twitchell *et al.* (2001), em um estudo sobre etilismo em filhos de alcoólatras, observaram que os portadores do genótipo l/l relataram um início mais precoce do hábito de beber do que os indivíduos portadores dos genótipos s/s ou l/s.

A frequência do alelo curto (5-HTTLPR- s) foi significativamente mais alta em indivíduos alcoólatras (61,5%) do que entre não alcoólatras (52,8%) ( $p= 0,02$ ) em um trabalho realizado no México (KONISHI *et al.*, 2004).

Estudos sobre a participação do polimorfismo 5-HTTLPR no alcoolismo, demonstram que o alelo curto (s) influencia no consumo de álcool predispondo os indivíduos homozigotos para este alelo a uma maior ingestão de bebidas alcoólicas (HERMAN *et al.*, 2003; MATSUSHITA *et al.*, 2001; THOMPSON *et al.*, 2000).

Lichtermann *et al.* (2000), em um trabalho com base familiar, estudaram a associação entre o risco para a álcool-dependência e o polimorfismo do 5-HTTLPR na região promotora do gene 5-HTT. Com uma amostra de 92 indivíduos álcool-dependentes e seus pais, os autores testaram a transmissão de alelos paternos para os filhos. De um total de 184 transmissões paternas, 102 eram de pais heterozigotos e o alelo curto (s) foi transmitido 65 vezes e não transmitido em 37 ocasiões, sendo a diferença estatisticamente significativa ( $p<0,006$ ). Os autores concluíram que os

resultados suportam a associação alélica da variante curta do 5-HTTLPR com a dependência alcoólica.

O alelo curto (s) foi associado ao início do alcoolismo e comportamento violento entre populações européias enquanto que, em populações japonesas, o alelo longo (l) esteve associado com comportamento anti-social relacionado com uso de álcool (HAMMOUMI *et al.*, 1999).

Resultado semelhante foi observado por Ishiguro *et al.* (1999) que encontraram uma menor frequência do genótipo s/s e do alelo curto (s) em alcoólatras em comparação com o grupo controle. Os alcoólatras com presença do alelo longo (l) tiveram um início mais precoce da dependência do hábito do que os pacientes com genótipo s/s ( $p=0,01$ ).

Em estudo caso-controle realizado em uma população coreana, a frequência do alelo longo do 5-HTTLPR foi significativamente mais alta em pacientes álcool-dependentes do que na população controle (KWEON *et al.*, 2005).

Kim, J.W. *et al.* (2006), em um estudo sobre características clínicas e genéticas em uma população masculina coreana álcool-dependente, ressaltam que a dependência de bebidas alcoólicas pode estar associada, além do 5-HTT, com vários genes tais como: gene aldeído desidrogenase tipo 2 (ALDH2), gene receptor de dopamina tipo 2 (DRD2) e gene catechol-O- methyltransferase (COMT).

Outras pesquisas, entretanto, não conseguiram correlacionar o consumo de etanol com o polimorfismo do gene 5-HTTLPR.

Em uma meta-análise sobre a associação do polimorfismo do 5-HTTLPR com a dependência do álcool, Feinn *et al.* (2005) encontraram que a frequência do alelo curto (s) foi significativamente associada à dependência do álcool. Os autores no entanto constataram que a maior associação do alelo curto foi vista em indivíduos álcool-dependentes com uma comorbidade psiquiátrica associada.

Kranzler *et al.* (2002), em uma pesquisa com 438 pacientes álcool-dependentes sendo 249 com dependência associada com outras drogas, não encontraram diferença estatisticamente significativa na frequência alélica com o grupo controle formado por pessoas não dependentes do álcool. Não se encontrou diferença em relação ao tipo de droga associada, ao sexo e à idade de início da dependência. Os autores revendo a literatura sobre a relação entre o 5-HTTLPR e o alcoolismo mostraram que

enquanto 7 estudos não evidenciaram uma associação entre o polimorfismo e o consumo de etanol, outros 3 artigos concluíram que existe uma relação entre a dependência alcoólica e o polimorfismo.

Nelissery *et al.* (2003) estudaram a associação do polimorfismo da região 5-HTTLPR na comorbidade da dependência do álcool e da depressão maior. Os autores encontraram uma frequência de 45,8% do alelo s entre pacientes com depressão maior em associação com o alcoolismo. Já entre pacientes não dependentes do álcool e sem antecedentes de depressão, a frequência do alelo curto foi de 39,8% ( $p=0,045$ ). Porém, com respeito à frequência do alelo curto do 5-HTTLPR, a depressão maior em alcoólatras é semelhante à depressão maior em não alcoólatras.

A relação entre o polimorfismo do gene 5-HTTLPR com o tabagismo tem sido pesquisada e os resultados são contraditórios.

Lerman *et al.* (1998) avaliaram a associação do tabagismo e do abandono do hábito com o polimorfismo do 5-HTT. Através de um caso-controle com 268 fumantes e 230 não fumantes os autores não encontraram uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos com relação ao fato de ser ou não fumante, idade de início do hábito ou a duração da interrupção do hábito.

Lerman *et al.* (2000) observaram a relação do 5-HTTLPR com o tabagismo e com o neuroticismo, em um estudo com 185 fumantes. Os resultados sugeriram que o neuroticismo estava positivamente associado com o comportamento tabagista entre os fumantes com o genótipo 5-HTTLPR-S (s/s ou s/l) e não com o genótipo homozigoto longo (l/l). Os autores não encontraram uma relação direta entre o genótipo homozigoto curto (s) e o hábito de fumar.

Um estudo realizado entre homens japoneses encontrou que o alelo longo (l/l + l/s) foi significativamente associado com o hábito de fumar (37% entre fumantes e 24% entre não fumantes;  $p= 0,003$ ). O estudo concluiu que os indivíduos com o genótipo s/s eram menos inclinados a fumar (ISHIKAWA *et al.*, 1999).

Gerra *et al.* (2005), em um estudo realizado na Itália com 103 estudantes não fumantes e 107 fumantes, encontraram que o genótipo s/s foi significativamente maior entre os fumantes quando comparados aos não fumantes ( $p= 0,023$ ). Comparando-se o padrão de consumo do fumo, a frequência do alelo curto foi

significativamente maior entre os fumantes inveterados do que entre os moderados ( $p=0,04$ ).

Munafò *et al.* (2006), em um estudo com 197 fumantes descendentes de europeus, avaliaram o papel do 5-HTTLPR no abandono do hábito de fumar, em um programa de tratamento por substituição da nicotina. Os autores não encontraram nenhuma associação entre o genótipo do 5-HTTLPR e o abandono do tabagismo.

### 3.2.6 Relação do 5-HTTLPR com o câncer

O consumo de fumo e/ou álcool, os principais fatores de risco para o CCEB, podem ser considerados como fatores de confundimento em uma possível associação entre depressão e câncer. A depressão pode levar um indivíduo a fumar e/ou a beber e indiretamente levar a um aumento do risco para o câncer (DALTON *et al.*, 2002).

Os estudos clínicos e epidemiológicos apresentam alguma relação entre alterações comportamentais e o câncer (DALTON *et al.*, 2002; DENOLLET, 1999; LINKINS e COMSTOCK, 1990; McGEE *et al.*, 1994; PENNINX *et al.*, 1998), e os estudos com bases na biologia molecular têm associado o gene 5-HTT com o desenvolvimento de alterações comportamentais (HERMAN *et al.*, 2003; PREUSS *et al.*, 2001; THOMPSON *et al.*, 2000). A relação do álcool e do fumo com o CCEB é bem estabelecida pela literatura pertinente e uma associação do 5-HTTLPR com o tabagismo e o alcoolismo tem sido mostrada e discutida em trabalhos científicos (HAMMOUMI *et al.*, 1999; ISHIKAWA *et al.*, 1999; KWEON *et al.*, 2005; TÜRKER *et al.*, 1998). Apesar disso a literatura consultada não evidencia trabalhos que associem diretamente esse gene com o câncer.

## **4 METODOLOGIA**

O trabalho foi desenvolvido na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (FOUFMG) localizada no *campus* universitário situado em Belo Horizonte.

A FOUFMG presta um amplo atendimento odontológico através do curso de graduação, projetos de extensão e dos diversos cursos de pós-graduação, atingindo uma população de todas as faixas etárias, através dos seguintes serviços e projetos:

- 1- Serviço de Estomatologia que é centro de referência para doenças bucais.
- 2- Projeto de extensão em Estomatologia no Hospital Odilon Behrens.
- 3- Projeto de extensão de atendimento odontológico a pacientes irradiados de cabeça e pescoço.
- 4- Atendimento odontológico à população, através das diversas disciplinas de graduação e pós-graduação, abrangendo todas as especialidades e faixas etárias.

### **4.1 Desenho do estudo**

Foi realizado um estudo do tipo caso-controle, utilizando uma amostra de pacientes portadores de carcinomas de células escamosas primários da cavidade bucal (casos) e pacientes não portadores de tumores malignos (controles).

### **4.2 População de estudo**

A população do estudo foi composta de 103 pacientes adultos (casos), atendidos durante o período de maio/2005 a março/2006, sem distinção de idade ou sexo, que estavam em consulta para diagnóstico e/ou tratamento odontológico na FOUFMG. Todos tiveram o diagnóstico de CCEB confirmado através de exame histopatológico e que concordaram em participar da pesquisa.

O grupo Controle foi composto de 103 pacientes inscritos para tratamento na FOUFMG, em suas diversas clínicas, que preencheram os critérios de inclusão e concordaram em participar da pesquisa.

### **4.3 Critérios de elegibilidade**

4.3.1 Os casos foram selecionados conforme os critérios que se seguem:

#### 4.3.1.1 Critérios de inclusão

a) Serem portadores de CCEB nos sub-sítios intrabuciais confirmados através de exame histopatológico.

b) Estarem em condição de prestar informações por si mesmos.

#### 4.3.1.2 Critérios de exclusão

a) Pacientes debilitados física ou emocionalmente.

4.3.2 Os controles foram selecionados dentro dos seguintes critérios:

#### 4.3.2.1 Critérios de inclusão

a) Pacientes que relataram não serem ou terem sido portadores de doenças malignas em qualquer sítio anatômico.

b) Estarem em condição de prestar informações por si mesmos.

#### 4.3.2.2 Critérios de exclusão

a) Pacientes que relataram ter ou já terem tido algum tumor maligno.

### **4.4 Seleção da amostra**

A amostra foi selecionada entre os pacientes encaminhados para exame e/ou tratamento odontológico na FOUFMG pelos postos de referência, sem nenhuma interferência do pesquisador responsável. Os casos foram selecionados entre os pacientes portadores de CCEB, confirmados por exame histopatológico, e pareados com o grupo controle de acordo com o sexo, idade e consumo de tabaco. Todos concordaram com os termos do consentimento livre e esclarecido (ANEXOS A e B) aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP-UFMG) através do parecer número 104/05 de 11 de maio de 2005.

### **4.5 Instrumentos de coleta de dados**

Os dados foram coletados mediante entrevista com o uso de formulário, da análise dos prontuários e do exame clínico do paciente.



#### 4.5.1 Entrevistas

As entrevistas foram realizadas em local cedido pela Faculdade de Odontologia da UFMG, o que possibilitou a privacidade ao paciente. A entrevista foi conduzida empregando formulários previamente testados e objetivando a obtenção dos dados pessoais do paciente, bem como das demais observações relacionadas aos hábitos do paciente, não encontradas nos prontuários.

Os pacientes participantes foram devidamente informados do teor e objetivos da pesquisa, sendo-lhes resguardado o direito de não identificação e à privacidade de acordo com o termo de Consentimento Livre e Esclarecido e do informativo ao paciente (ANEXOS A e B). As entrevistas foram todas realizadas pelo pesquisador responsável após calibração e padronização de critérios através de estudo piloto.

##### 4.5.1.1 Hábitos nocivos associados ao CCEB (ANEXO C)

a) Fumo: é ou foi fumante; tipo de uso do fumo; quantidade diária em número de cigarros; idade em que começou a fumar; no caso de ex-fumante, há quanto tempo abandonou o vício.

b) Álcool: é ou foi usuário de álcool; tipo de bebida consumida; quantidade diária ingerida; idade em que começou a beber; no caso de ex-usuário, há quanto tempo abandonou o vício.

c) Critérios:

O consumo de cigarro foi avaliado de acordo com os critérios utilizados por Franco et al. (1989) e Schlecht et al. (1999), estabelecendo-se a seguinte equivalência: 20 cigarros industrializados = 04 cigarros de palha com fumo de rolo = 04 charutos = 05 cachimbos = 01 maço. Consideramos como cigarro industrializado aqueles vendidos em maços de 20 unidades, com ou sem filtro, enrolados em papel. O consumo diário foi calculado em número cigarros fumados tendo-se como padrão de referência o cigarro industrializado. Para análise dos resultados a quantidade de cigarro consumida diariamente foi dicotomizada com base na mediana, equivalendo 16 cigarros. O tempo de consumo foi também analisado dicotomizando a amostra com base na mediana, ou

seja 34 anos. O tempo de uso do fumo foi calculado levando-se em conta a idade de início de hábito até a idade de permanência (QUADRO 3).

O consumo de bebidas alcoólicas foi também calculado pelos critérios adotados por Franco et al. (1989) e Schlecht et al. (1999), estabelecendo-se a seguinte equivalência: Cachaça/destilados = 50%, cerveja = 5%, vinho = 10% de concentração de etanol. A quantidade de bebida foi avaliada tendo-se como referência os seguintes padrões: dose = 70 ml; copo = 200 ml; garrafa de cerveja = 600 ml. Os indivíduos, que relataram uso esporádico de bebida, foram considerados junto com os que nunca beberam. A partir destes dados foi calculada a quantidade em mililitros de etanol ingerido diariamente. Para análise dos resultados a quantidade de etanol consumida diariamente foi dicotomizada com base na mediana, equivalendo 60 ml. O tempo de consumo foi também analisado dicotomizando a amostra com base na mediana, ou seja 20 anos. O tempo de uso de bebidas alcoólicas foi calculado levando-se em conta a idade de início de hábito até a idade de permanência (QUADRO 3).

#### 4.5.2 Análise de prontuários.

A análise dos prontuários permitiu a obtenção dos dados referentes ao tumor, tais como a localização e o diagnóstico histológico.

##### 4.5.2.1 Dados avaliados

A localização da lesão primária foi classificada de acordo com a Classificação Internacional de Doenças-10<sup>a</sup> edição (CID-10), da Organização Mundial de Saúde (OMS, 1997). Os locais analisados foram:

##### a) Língua: CID.C02

Inclui a face dorsal da língua, borda, face ventral, 2/3 anteriores, amígdala lingual

Exclui a base da língua.

##### b) Gengiva: CID.C03

Inclui gengiva superior e inferior e mucosa do rebordo alveolar

Exclui tuberosidade da maxila

##### c) Assoalho bucal: CID.C04

Inclui o assoalho bucal anterior e lateral

Exclui o ventre da língua

##### d) Palato duro: CID.C05-0

e) Mucosa bucal: CID.C06-0

Exclui comissura labial e sulco vestibular

f) Vestíbulo: CID.C06-1

Inclui os sulcos labiais superior e inferior e os sulcos bucais superior e inferior

g) Retromolar: CID.C06-2

Inclui tuberosidade da maxila e área retromolar mandibular.

As lesões invasivas comprometendo dois ou mais locais contíguos, impossibilitando a determinação de seu local de origem foram classificadas de acordo com a subcategoria 8 da CID-10, e analisadas como um grupo à parte das demais. As lesões de lábio foram excluídas em função de estarem associadas a fatores de risco diferentes das lesões intrabucais.

#### 4.6.3 Coleta de material da mucosa bucal

O material foi coletado dentro dos padrões de biossegurança, com o uso de escovas descartáveis para coleta de esfregaço de mucosas (*Citobrush*). Foi realizado um raspado na mucosa bucal para obtenção de células, em uma área oposta a localização da neoplasia. O material obtido foi conservado em solução de Krebs contida em recipiente apropriado (*Eppendorf*) e posteriormente congeladas a -20°C.

### 4.6 Elenco de variáveis

O estudo da prevalência do polimorfismo do gene 5-HTT em pacientes com CCEB foi associado com as seguintes variáveis independentes, categorizadas nos QUADROS 1 a 3:

**QUADRO 1** –Categorização das variáveis independentes relacionadas aos pacientes

Tipo de variável	Desmembramento da variável	Categorizações
Gênero	Sexo	1-masculino 2-feminino

**QUADRO 2**– Categorização das variáveis independentes relacionadas com o polimorfismo do gene 5-HTT

Tipo de variável	Desmembramento da variável	Categorizações
5HTTLPR	Polimorfismo	1- Heterozigoto l/s 2- Homozigoto variante l/l 3- Homozigoto variante s/s

**QUADRO 3** – Categorização das variáveis independentes relacionadas aos fatores de exposição.

Tipo de variável	Desmembramento da variável	Categorizações
Fumo	Presença do hábito	1- não 2- sim
	Tempo de exposição	1- nenhum 2- menos que 34 anos 3- mais que 34 anos
	Intensidade da exposição	1- nenhuma 2- menos que 16 cigarros/dia 3- mais que 16 cigarros/dia
Álcool	Presença do hábito	1- não 2- sim
	Tempo de exposição	1- nenhum 2- menos que 20 anos 3- mais que 20 anos
	Intensidade da exposição	1- nenhuma 2- menos que 60 ml/dia 3- mais que 60 ml/dia

#### 4.7 Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada segundo técnica descrita por Boom *et al.* (1990). O produto da raspagem da mucosa normal foi adicionado a 900µl de tampão de lise (970 mg/ml Gu HCl, 0,1 mol/l Tris-HCl pH 6,4, 0,2 mol/l EDTA pH 8,0, 26 mg/ml Triton X-100) e a 40 µl de suspensão de sílica. A mistura foi agitada em Vortex por alguns segundos, incubada em banho seco a 56° C por 10 minutos e posteriormente centrifugada em microcentrífuga (12000 rpm). Após o descarte do sobrenadante, o *pellet* de sílica foi lavado duas vezes com tampão de lavagem (970 mg/ml GuHCL, 0,1 mol/l Tris HCl pH 4,0), repetindo-se a centrifugação entre cada lavagem. Outras duas lavagens sucessivas foram realizadas com etanol 70% e uma última com acetona. O sobrenadante foi descartado e a sílica seca a 56° C (3 a 5 minutos). Posteriormente adicionou-se 100 µl de tampão TE, agitando-se em Vortex e incubando-se a 56° C por 10 minutos. Finalmente, a mistura foi centrifugada por 2 minutos e o sobrenadante contendo o DNA transferido para outro tubo e armazenado a -20°C.

#### 4.8 Amplificação do DNA pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

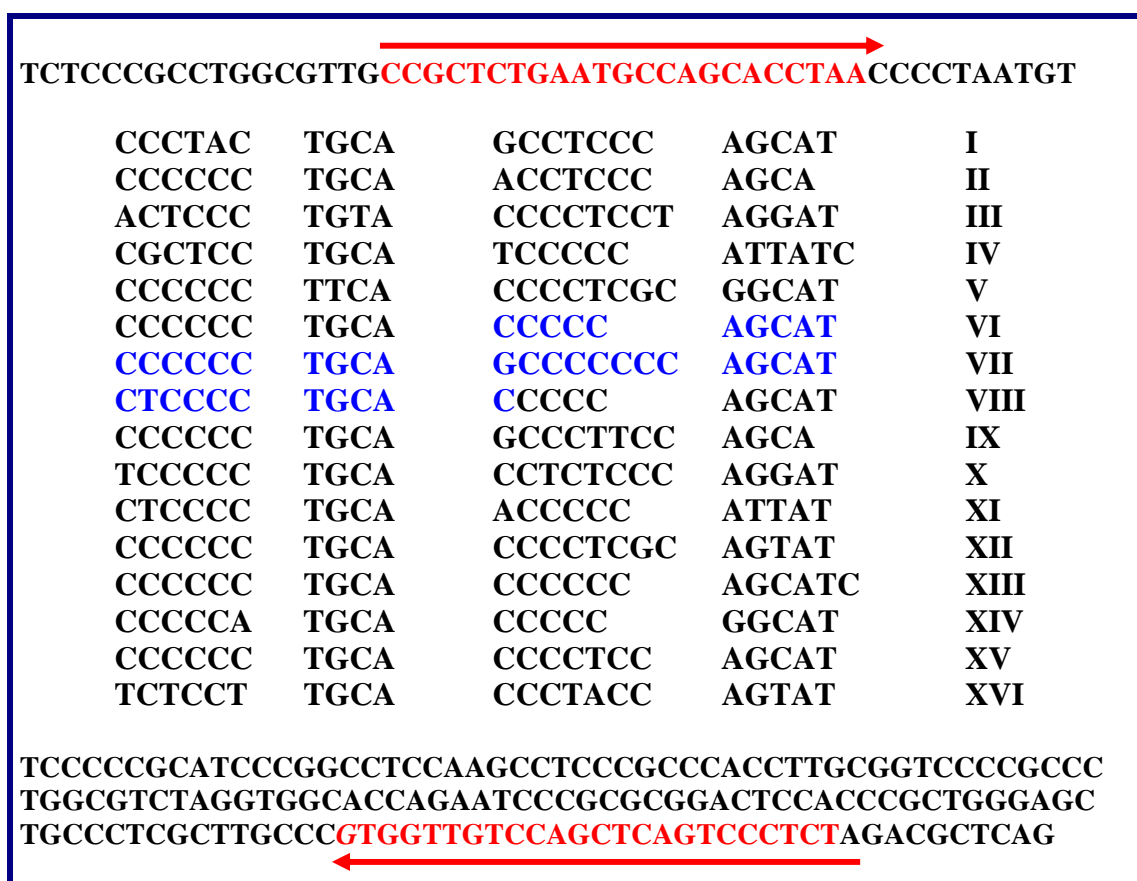
O DNA, obtido pelas extrações, foi utilizado na reação em cadeia da polimerase (PCR) para produzir cópias da região promotora do gene que codifica o transportador de serotonina (5-HTT). Para cada reação da PCR, foi utilizada uma solução de tampão contendo 1,0 unidade de Taq polimerase, 20 pmoles/µl de iniciadores (QUADRO 4; FIG. 1), 0,2 mM dNTPs e o volume de DNA variou de 5-10% do volume final da reação (QUADRO 5). A desnaturação inicial foi de 2 minutos à 94°C, seguida por 40 ciclos de 30 segundos à 94°C, 30 segundos a 68°C e 45 segundos à 72°C. A extensão terminal foi de 5 minutos a 72°C e o produto de PCR mantido a 4°C por tempo indeterminado. A variante alélica longa (l), após amplificação apresenta 528 pares de base; e a variante alélica curta (s), 484 pares de base. Para cada reação de PCR, a fim de verificar-se a ausência de contaminação dos componentes da cadeia, foi feito um controle negativo contendo todos os reagentes necessários, com exceção da amostra do DNA.

**QUADRO 4:** Iniciadores utilizados na reação da PCR

Iniciadores	
F- 5'	CCGCTCTGAATGCCAGCACCTAAC 3'
R-5'	AGAGGGACTGAGCTGGACAACCAC 3'

**QUADRO 5:** Condições da PCR com indicação dos componentes da reação

Tampão	
Desoxinucleotídeos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0.2 mM de cada
Iniciadores	20 pmol de cada
Taq DNA polimerase	1 ou 2 unidades
DNA	6 µl
Volume final	50 µl

**FIGURA 1:** Parte da região promotora do gene 5-HTT.

Os números romanos representam os 16 elementos de repetição. Os números em azul: região deletada na variante alélica curta; os números em vermelho: região de ligação dos iniciadores.

#### 4.9 Eletroforese em gel de poliacrilamida e coloração pela prata

Os produtos da PCR foram verificados através da eletroforese em gel de poliacrilamida (MANIATIS *et al.*, 1982). Foram aplicados 3µl de cada produto juntamente com 1 µl de gel *loading buffer* (GLB) no gel a 6,5%. A corrida foi realizada em tampão TBE 1x, a 160V, durante aproximadamente 30 minutos, utilizando-se cuba específica (minivertical gel electrophoresis GibcoBRL). Posteriormente, cada gel foi corado por prata para verificação e análise do material amplificado, seguindo-se uma adaptação do método descrito por Bassam *et al.* (1991), que consiste na imersão de cada gel em uma serie de soluções específicas, numa ordem definida (QUADRO 6). Após o término do processo, os géis foram secos em papel celofane. A verificação do produto amplificado da PCR foi realizada em gel de poliacrilamida não desnaturante (PAGE), de acordo com o protocolo sugerido por Maniatis *et al.* (1982). Utilizamos 1 µl do padrão de peso molecular de 100pb (6 µl de 100 pb DNA *ladder* – *Invitrogen*, 72 µl de tampão de amostra e 72 µl de H<sub>2</sub>O). Aliquotas de 3 µl do produto de PCR, adicionadas a 1 µl de tampão de amostra (0,25% Azul de Bromofenol, 0,25% Xileno Cianol, 30% Glicerol) foram aplicadas no gel de poliacrilamida. O produto final está ilustrado pela FIG. 2.

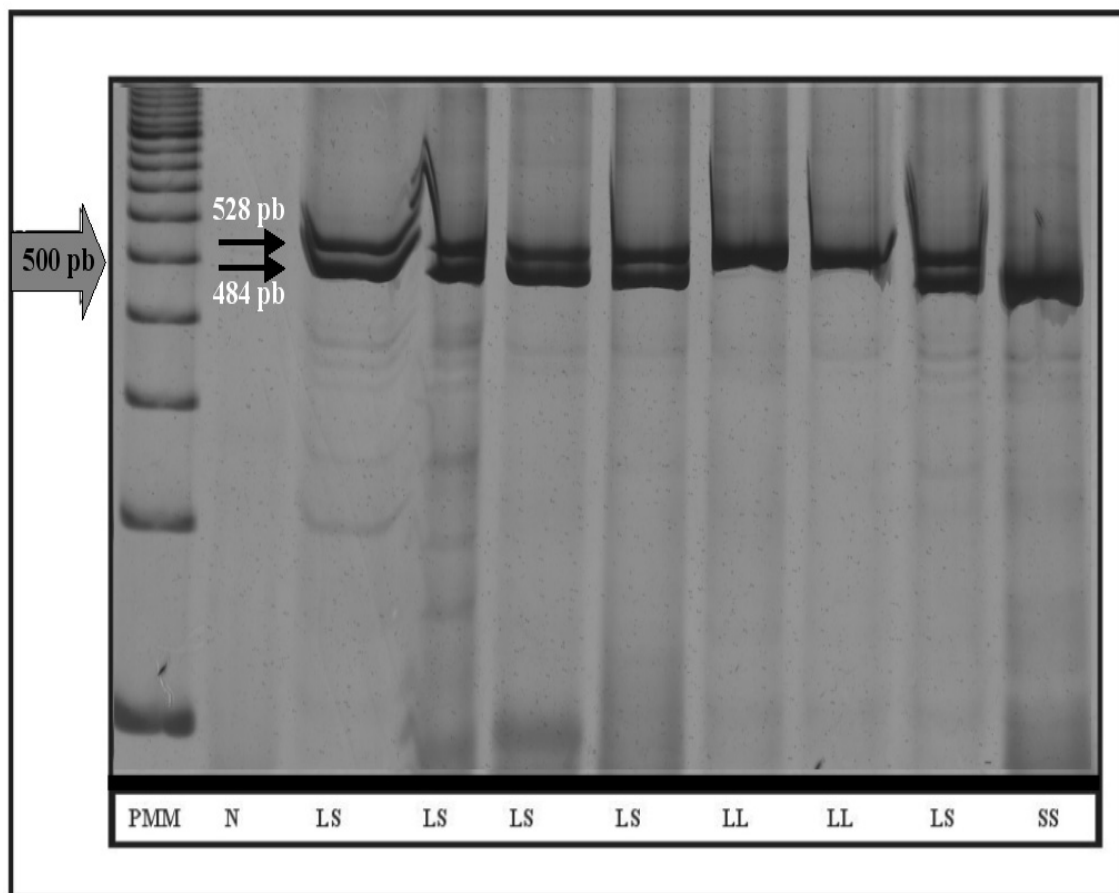
**QUADRO 6:** Protocolo para coloração do gel de poliacrilamida pela prata

Soluções	Tempo regular
Acido acético 10%	10 minutos
Água destilada	3 minutos
Solução de prata	8 a 10 minutos
Água destilada	30 segundos (2 lavagens)
Solução reveladora	xx

#### 4.10 Análise dos dados

Os dados foram analisados através do programa estatístico SPSS 12.0 for Windows, através do teste do qui-quadrado de Pearson. Com um intervalo de confiança de 95% e o nível de significação de  $p= 0,05$ .

**FIGURA 2:** Gel de poliacrilamida corado pela prata.



PPM: padrão de peso molecular; N: controle negativo; l/s: heterozigoto; l/l: homozigoto longo; s/s: homozigoto curto.

#### 4.11 Aprovação pelo Comitê de Ética

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP-UFMG) em 11 de maio de 2005 através do parecer nº ETIC 104/05 (ANEXO E).



## 5 RESULTADOS

A amostra foi constituída de 206 pacientes sendo 103 casos e 103 controles pareados quanto ao gênero, faixa etária e tabagismo. A TAB. 1 apresenta uma caracterização da amostra evidenciando um equilíbrio entre os dois grupos. O número de indivíduos etilistas e não etilistas, tabagistas e não tabagistas detectados na amostra estão também expostos na TAB. 1. A distribuição dos casos de CCEB quanto aos sítios anatômicos está apresentada na TAB. 2, mostrando que a língua e assoalho bucal foram os dois locais de maior ocorrência da lesão primária.

TABELA 1: Caracterização da amostra quanto ao gênero, idade e hábitos

	Categoria		X <sup>2</sup>	Valor de p
	Caso	Controle		
<b>Gênero: n (%)</b>				
Masculino	77 (74,8)	76 (73,8)	-	-
Feminino	26 (25,2)	27 (26,2)	-	-
<b>Idade em anos</b>				
Média (dp)	57,2 (10,4)	57,3 (10,4)	-	-
Máxima	82	82	-	-
Mínima	36	36	-	-
<b>Tabagismo: n (%)</b>				
Sim	92 (89,3)	90 (87,4)	-	-
Não	11 (10,7)	13 (12,6)	-	-
<b>Etilismo: n (%)</b>				
Sim	75 (72,8)	63 (61,2)	3,161	0,05
Não	28 (27,2)	40 (38,8)		

Qui-quadrado de Pearson. DP= desvio padrão.

TABELA 2: Distribuição do grupo casos de acordo com o sítio anatômico.

Sítio anatômico	Frequência	Porcentagem
Mucosa	6	5,8
Zona retromolar	7	6,8
Língua	25	24,3
Assoalho bucal	30	29,1
Palato duro	5	4,9
Gengiva	14	13,6
Em mais de um local	16	15,5
<b>Total</b>	<b>103</b>	<b>100,0</b>

O padrão de consumo de fumo entre os dois grupos não evidenciou diferenças estatisticamente significativas nem com relação ao tempo de duração do hábito nem com relação à quantidade de cigarros fumados por dia (TAB. 3). Já o consumo diário de etanol e o tempo de permanência no hábito de beber foram maiores no grupo de pacientes portadores de CCEB, sendo a diferença estatisticamente significativa (TAB. 4).

TABELA 3: Distribuição dos grupos quanto ao consumo de fumo.

	Categoria		X <sup>2</sup>	Valor de p
	Caso	Controle		
<b>Quantidade de cigarros consumidos por dia: n (%)</b>				
< 16 cigarros	41 (39,8)	51 (49,5)	1,575	0,132
> 16 cigarros	62 (60,2)	52 (50,5)		
<b>Tempo de consumo de cigarros: n (%)</b>				
< 34 anos	49 (47,6)	58 (56,3)	1,954	0,104
> 34 anos	54 (52,4)	45 (43,7)		

Qui-quadrado de Pearson.

TABELA 4: Distribuição dos grupos quanto ao consumo de etanol.

	Categoria		X <sup>2</sup>	Valor de p
	Caso	Controle		
<b>Quantidade de etanol consumida por dia: n (%)</b>				
< 60 ml	36 (35,0)	68 (66,0)	12,210	0,0001
> 60 ml	67 (65,0)	35 (34,0)		
<b>Tempo de uso de etanol: n (%)</b>				
< 20 anos	43 (41,7)	68 (66,0)	19,885	0,0001
> 20 anos	60 (58,3)	35 (34,0)		

Qui-quadrado de Pearson.

A distribuição dos genótipos em relação aos grupos caso e controle, bem como em relação aos sítios anatômicos está demonstrada na TAB. 5. Não se observou diferença estatisticamente significativa na distribuição dos genótipos entre os pacientes com CCEB e os pacientes do grupo controle. A distribuição dos genótipos observados nos pacientes de acordo com o sítio anatômico também não evidenciou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. Para essa análise os sítios anatômicos de menor prevalência (palato duro, zona retromolar e mucosa) foram agrupados como “outros sítios”.

TABELA 5: Distribuição dos genótipos de acordo com o sítio anatômico.

	Genótipos			Total n (%)	X <sup>2</sup>	Valor de p
	l/s n (%)	l/l n (%)	s/s n (%)			
Casos	53 (51,5)	31 (30,1)	19 (18,4)	103 (100,0)	1,792	0,408
Controle	44 (42,7)	34 (33,0)	25 (24,3)	103 (100,0)	-	-
Sítios anatômicos						
Língua	10 (40,0)	7 (28,0)	8 (32,0)	25 (100,0)	0,659	0,719
Assoalho bucal	18 (60,0)	7 (23,3)	5 (16,7)	30 (100,0)	2,790	0,248
Gengiva	5 (35,7)	4 (28,6)	5 (35,7)	14 (100,0)	0,848	0,654
Em mais de um sítio	9 (56,3)	6 (37,5)	1 (6,3)	16 (100,0)	2,711	0,258
Outros sítios	11 (61,1)	7 (38,9)	-	18 (100,0)	5,666	0,06

Qui-quadrado de Pearson: os valores de p referem-se a comparação com o grupo controle.

A frequência alélica analisada na TAB. 6 mostra não haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos caso e controle. A comparação da frequência alélica do grupo controle àquela relacionada aos sítios anatômicos não mostrou uma diferença estatisticamente significativa, exceto na comparação de “outros sítios” com o grupo controle.

A frequência dos genótipos entre os grupos caso e controle não mostrou desvio em relação ao esperado, de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (X<sup>2</sup>:

0,193,  $p=0,66$  para o grupo caso;  $X^2: 1,991$ ,  $p=0,158$  para o grupo controle), mostrando uma distribuição homogênea.

TABELA 6: Frequência alélica dos sítios anatômicos e dos grupos casos e controles.

	Alelo longo (%)	Alelo curto (%)	$X^2$	Valor de p
Casos	55,8	44,2	1,645	0,118
Controles	49,5	50,5		-
Sítios anatômicos				
Língua	48,0	52,0	0,037	0,486
Assoalho bucal	53,3	46,7	0,603	0,354
Gengiva	46,4	53,6	0,759	0,459
Em mais de um sítio	65,6	34,3	0,090	0,065
Outros sítios	67,6	32,4	0,043	0,032

Qui-quadrado de Pearson: os valores de p referem-se a comparação com o grupo controle.

A distribuição dos polimorfismos comparando-se o genótipo homocigoto longo (l/l) com uma associação dos genótipos homocigoto curto (s/s) com o heterocigoto, também não evidenciou diferença entre casos e controles (TAB. 7). Da mesma forma uma associação dos genótipos heterocigoto e homocigoto longo (l/l) comparada ao homocigoto s/s também não mostrou diferença significativa (TAB. 8).

TABELA 7: Frequência dos genótipos l/s+s/s em comparação com o genótipo l/l.

Genótipos	Caso n (%)	Controle n (%)	Total n (%)	$X^2$	Valor de p
l/s + s/s	72 (69,9)	69 (67,0)	141 (68,4)		
l/l	31 (30,1)	34 (33,0)	65 (31,6)	0,202	0,382
<b>TOTAL</b>	<b>103 (100,0)</b>	<b>103 (100,0)</b>	<b>206 (100,0)</b>		

Qui-quadrado de Pearson.

TABELA 8: Frequência dos genótipos l/l+l/s em comparação com o genótipo s/s.

Genótipos	Caso n (%)	Controle n (%)	Total n (%)	X <sup>2</sup>	Valor de p
l/s + l/l	84 (81,6)	78 (75,7)	162 (78,6)		
s/s	19 (18,4)	25 (24,3)	44 (21,4)	1,040	0,198
<b>TOTAL</b>	<b>103 (100,0)</b>	<b>103 (100,0)</b>	<b>206 (100,0)</b>		

Qui-quadrado de Pearson.

A análise do polimorfismo do 5-HTTLPR não evidenciou diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos, em relação ao consumo de fumo e de bebidas alcoólicas, tanto em relação ao tempo de permanência no hábito quanto em relação à quantidade do consumo (TAB. 9, 10, 11, 12)

TABELA 9: Frequência dos genótipos em relação ao tempo de tabagismo.

Categoria	Genótipos	Tempo de duração do hábito		X <sup>2</sup>	Valor de p
		< 34 anos n (%)	> 34 anos n (%)		
Casos					
	l/s	21 (42,9)	32 (59,3)		
	l/l	15 (30,6)	16 (29,6)	4,662	0,097
	s/s	13 (26,5)	6 (11,1)		
	Total	49 (100,0)	54 (100,0)		
Controles					
	l/s	23 (39,7)	21 (46,7)		
	l/l	21 (36,2)	13 (28,9)	0,704	0,703
	s/s	14 (24,1)	11 (24,4)		
	total	58 (100,0)	45 (100,0)		

Qui-quadrado de Pearson.

TABELA 10: Frequência dos genótipos em relação ao número de cigarros por dia.

Categoria	Genótipos	Quantidade diária		X <sup>2</sup>	Valor de p
		< 16 cigarros n (%)	> 16 cigarros n (%)		
Casos					
	l/s	23 (56,1)	30 (48,4)		
	l/l	8 (19,5)	23 (37,1)	4,125	0,127
	s/s	10 (24,4)	9 (14,5)		
	Total	41 (100,0)	62 (100,0)		
Controles					
	l/s	20 (39,2)	24 (46,2)		
	l/l	17 (33,3)	17 (32,7)	0,714	0,700
	s/s	14 (27,5)	11 (21,2)		
	Total	51 (100,0)	52 (100,0)		

Qui-quadrado de Pearson.

TABELA 11: Frequência dos genótipos em relação à duração do etilismo.

Categoria	Genótipos	Tempo de duração do hábito		X <sup>2</sup>	Valor de p
		< 20 anos n (%)	> 20 anos n (%)		
Casos					
	l/s	22 (51,2)	31 (51,7)		
	l/l	11 (25,6)	20 (33,3)	1,427	p= 0,490
	s/s	10 (23,3)	9 (15,0)		
	Total	43 (100,0)	60 (100,0)		
Controles					
	l/s	29 (42,6)	15 (42,9)		
	l/l	24 (35,3)	10 (28,6)	0,720	p= 0,698
	s/s	15 (22,1)	10 (28,6)		
	Total	68 (100,0)	35 (100,0)		

Qui-quadrado de Pearson.

TABELA 12: Frequência dos genótipos em relação ao consumo diário de etanol.

Categoria	Genótipos	Quantidade diária em mililitros de etanol		X <sup>2</sup>	Valor de p
		<60 ml n (%)	> 60 ml n (%)		
Casos					
	l/s	19 (52,8)	34 (50,7)	0,924	0,630
	l/l	9 (25,0)	22 (32,8)		
	s/s	8 (22,2)	11 (16,4)		
	Total	36 (100,0)	67 (100,0)		
Controles					
	l/s	30 (44,1)	14 (40,0)	0,536	0,765
	l/l	23 (33,8)	11 (31,4)		
	s/s	15 (22,1)	10 (28,6)		
	Total	68 (100,0)	35 (100,0)		

Qui-quadrado de Pearson.

Da mesma forma uma comparação entre os grupos com relação ao uso ou não de fumo não evidenciou diferença significativa. O mesmo foi observado em relação ao consumo ou não de bebidas alcoólicas (TAB. 13, 14).

TABELA 13: Frequência dos genótipos dos pacientes fumantes e nunca fumantes.

Genótipos	Consumo de cigarros		Total n (%)	X <sup>2</sup>	Valor de p
	Nunca fumou n (%)	Fuma ou já fumou n (%)			
l/s	9 (37,5)	88 (48,4)	97 (47,0)	1,003	0,606
l/l	9 (37,5)	56 (30,8)	65 (31,6)		
s/s	6 (25,0)	38 (20,8)	44 (21,4)		
<b>Total</b>	<b>24 (100,0)</b>	<b>182 (100,0)</b>	<b>206 (100,0)</b>		

Qui-quadrado de Pearson.

TABELA 14: Frequência dos genótipos dos pacientes etilistas e não etilistas.

Genótipos	Consumo de bebidas alcoólicas		Total n (%)	X <sup>2</sup>	Valor de p
	Nunca bebeu n (%)	Bebe ou já bebeu n (%)			
l/s	32 (47,0)	65 (47,1)	97 (47,0)		
l/l	23 (33,8)	42 (30,4)	65 (31,6)	0,305	0,859
s/s	13 (19,1)	31 (22,5)	44 (21,4)		
<b>Total</b>	<b>68 (100,0)</b>	<b>138 (100,0)</b>	<b>206 (100,0)</b>		

Qui-quadrado de Pearson.



## 6 DISCUSSÃO

O presente trabalho apresenta uma limitação imposta pelo tamanho da amostra, porém, apesar disso os dados são sugestivos e indicam a necessidade de novos trabalhos que investiguem a participação dos polimorfismos da 5-HTTLPR na determinação do comportamento tabagista e etilista. Em função disso, outros estudos deverão ser realizados em grupos populacionais brasileiros, nas várias regiões geográficas do país, tendo em vista a grande diversidade étnica da população, buscando conhecer-se a distribuição dos genótipos e a frequência alélica entre os vários segmentos populacionais.

O pareamento entre os dois grupos (caso/controle) foi feito procurando o equilíbrio com relação ao gênero, faixa etária e consumo de tabaco. Os resultados evidenciaram que não houve uma diferença estatisticamente significativa entre casos e controles com relação a essas variáveis.

O não pareamento dos grupos com relação à cor da pele dos pacientes foi amparado no trabalho de Parra *et al.* (2003) que estudaram a correlação entre as características físicas e o genótipo em uma população brasileira. Os autores concluíram que não existe uma associação entre a cor da pele e o genótipo dos indivíduos caracterizados como afro-descendentes.

A análise do uso de fumo, tanto em relação à quantidade consumida por dia como ao tempo de permanência do hábito, foi feita dicotomizando a amostra com base na mediana. Os dois grupos (caso/controle) não mostraram diferenças estatisticamente significativas em relação à distribuição dos pacientes nem quanto ao consumo nem quanto ao tempo de permanência como tabagista.

Semelhante ao uso de cigarros, o tempo de permanência no hábito de beber e a quantidade de etanol ingerida diariamente foram analisados dicotomizando a amostra com base na mediana. O consumo ou não de bebidas alcoólicas mostrou uma diferença entre os dois grupos. A maior frequência de etilistas entre os pacientes com CCEB está de acordo com outros levantamentos epidemiológicos sobre o perfil do paciente portador de câncer de boca (ALTIERI *et al.*, 2004; ANDRE *et al.*, 1995; FRANCO *et al.*, 1989; LLEWELLYN *et al.*, 2004; LEWIN *et al.*, 1998; ZAVRAS *et al.*, 2001). Em nossa metodologia não houve uma preocupação com o pareamento pelo consumo de bebida alcoólica, apesar disso o grupo controle apresentou um número significativo de

etilistas, o que permitiu algumas comparações. A análise do consumo de bebidas alcoólicas mostrou uma diferença estatisticamente significativa entre casos e controles em relação à quantidade diária ingerida de etanol e ao tempo de duração do hábito de beber. Os pacientes portadores de CCEB relataram um consumo diário de etanol e um tempo de aderência ao hábito maior que o observado nos indivíduos do grupo controle. Este fato está de acordo com a literatura consultada que mostra um consumo maior de bebidas pelos pacientes portadores de CCEB quando comparados com indivíduos de um grupo controle (ANDRE *et al.*, 1995; BLOT, 1992; FRANCO *et al.*, 1989; LEITE e KOIFMAN, 1998; MORENO-LÓPEZ *et al.*, 2000; ZAVRAS *et al.*, 2001).

A frequência alélica encontrada de 55,8% (l) e 44,2% (s) entre os casos, 49,5% (l) e 50,5% (s) entre os controles, também não apresentaram diferença estatisticamente significativa. Tal distribuição é semelhante a encontrada por Victória *et al.* (2005) em uma população brasileira saudável usada como controle em um trabalho sobre estomatite aftosa recorrente, que observaram uma frequência de 58% (l) e de 42% (s). Deve-se observar que esse trabalho também foi realizado na FOUFGM e portanto estudando uma população de características semelhantes a do nosso estudo.

A análise dos genótipos constatou uma distribuição entre casos e controles, respectivamente de l/s (51,5% e 42,7%), l/l (30,1% e 33,0%), s/s (18,4% e 24,3%), também sem diferença estatística. Victória *et al.* (2005) também encontraram uma distribuição semelhante em uma população brasileira: l/s (42,8%), l/l (37,2%) e s/s (20,0%). Embora pequenas diferenças sejam observadas nos valores, as duas amostras mostraram um perfil semelhante. Mesmo analisando a distribuição dos genótipos entre todos os indivíduos da amostra, considerando casos e controles juntos, os valores de 47,0% (l/s), 31,6% (l/l) e 21,4% (s/s) são semelhantes aos encontrados por Victória *et al.* (2005) no grupo controle de sua pesquisa, reforçando a sugestão de um perfil semelhante da nossa amostra com o perfil encontrado em pacientes não expostos aos fatores de risco para o CCEB.

Resultado semelhante foi também encontrado por Oliveira *et al.* (1998) no grupo controle, composto de pacientes saudáveis, em um estudo sobre esquizofrenia no Brasil. Os autores encontraram os genótipos l/s (43%), l/l (39%) e s/s (16%) e uma frequência alélica observada de: alelo longo (62%) e alelo curto (38%).

A análise dos resultados permite deduzir que não houve diferença entre os portadores de CCEB e os pacientes do grupo controle com relação ao polimorfismo da região promotora do transportador de serotonina.

Os dois grupos também não mostraram diferença estatisticamente significativa quando se analisou a associação dos genótipos l/s+s/s em comparação com o genótipo l/l. O efeito dominante do alelo curto sobre o alelo longo, sugerido por Lesch *et al.* (1996), nos levou a esta análise. Da mesma forma a associação dos genótipos l/s+l/l em comparação com o genótipo s/s também não mostrou diferença significativa.

A distribuição dos alelos com relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg também não mostrou relação de desequilíbrio no grupo de pacientes com CCEB e no grupo controle, sugerindo não existir a participação de um fator que determine um desequilíbrio na frequência dos genótipos.

Os trabalhos envolvendo populações caucasianas (GELERNTER *et al.*, 1999; KRANZLER *et al.*, 2002; LERMAN *et al.*, 1998; THOMPSON *et al.*, 2002), americanos afro-descendentes (LERMAN *et al.*, 1998; GELERNTER *et al.*, 1999) e orientais (GELERNTER *et al.*, 1999; KIM W.K. *et al.*, 2005) mostram que a frequência alélica e os genótipos do 5-HTTLPR apresentam diferenças quanto à distribuição em função da população em estudo. A existência de poucos trabalhos sobre a distribuição dos genótipos e da frequência alélica do polimorfismo da região promotora do 5-HTT na população brasileira dificulta uma comparação de resultados.

A distribuição dos genótipos em relação aos sítios anatômicos não evidenciou nenhuma diferença estatisticamente significativa. Pode-se deduzir que o polimorfismo da região promotora do 5-HTT não se apresentou, em nosso estudo, como um determinante para a localização da lesão primária, mesmo entre os sítios de maior risco como a língua e assoalho bucal. A comparação da frequência alélica observada nos sítios anatômicos com a frequência encontrada no grupo controle mostrou uma diferença estatisticamente significativa em “outros sítios” ( $p= 0,032$ ). Observou-se também uma tendência em relação a “em mais de um sítio” ( $p= 0,065$ ). Embora essa análise sugira um envolvimento da frequência alélica como determinante na localização da lesão primária, deve-se ressaltar que a estratificação dos sítios anatômicos formou grupos com poucos indivíduos. Além disso não houve diferença estatisticamente significativa entre os sítios de maior prevalência em relação ao grupo controle, tanto na

análise da frequência alélica como na distribuição dos genótipos. O resultados obtidos devem ser reavaliados com grupos amostrais maiores.

Não foi encontrada também nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos com relação à distribuição dos genótipos levando-se em conta o consumo e o tempo de utilização do fumo e do álcool. Esses resultados nos levam a algumas reflexões sobre o papel do 5-HTTLPR como determinante de risco para os hábitos associados ao CCEB, ou seja, o etilismo e o tabagismo, que têm sido considerados mundialmente como os dois mais importantes fatores de risco para o CCEB, independente da região geográfica aonde a pesquisa tenha sido desenvolvida (ANDRE *et al.*, 1995; FRANCO *et al.*, 1989; LEWIN *et al.*, 1998; SCIUBBA, 2001; ZAVRAS *et al.*, 2001; ZEKA *et al.*, 2003).

A associação do polimorfismo da região promotora do 5-HTTLPR com o tabagismo tem sido pesquisada apresentando resultados contraditórios. Enquanto alguns autores não encontraram correlação entre o polimorfismo com o hábito de fumar (LERMAN *et al.*, 1998; LERMAN *et al.*, 2000), outros pesquisadores mostraram uma associação do consumo de fumo com o 5-HTTLPR-S (GERRA *et al.*, 2005) ou com o 5-HTTLPR-L (ISHIKAWA *et al.*, 1999).

O fato dos resultados não apresentarem uma associação dos genótipos ou da frequência alélica do 5-HTTLPR com o tabagismo não elimina o papel desse fator de risco no desenvolvimento do CCEB. O que os resultados sugerem é uma falta de associação do tabagismo com os polimorfismos do gene, na população estudada, estando este resultado de acordo com alguns trabalhos (HU *et al.*, 2000; LERMAN *et al.*, 1998; LERMAN *et al.*, 2000). Provavelmente o comportamento tabagista não esteja associado a um genótipo específico do 5-HTTLPR.

A literatura consultada tem mostrado de uma maneira mais constante uma associação dos polimorfismos do 5-HTTLPR com o a dependência ou uso de bebidas alcoólicas (HAMMOUMI *et al.*, 1999; HERMAN *et al.*, 2003; KWEON *et al.*, 2005; KONISHI *et al.*, 2004; LICHTERMANN *et al.*, 2000; MATSUSHITA *et al.*, 2001; PREUSS *et al.*, 2001; THOMPSON *et al.*, 2000; TÜRKER *et al.*, 1998; TWITCHELL *et al.*, 2001). Embora os resultados tenham mostrado um maior consumo de etanol entre os pacientes portadores de CCEB em relação aos pacientes do grupo controle e esta diferença tenha sido estatisticamente significativa, não se encontrou também uma

associação do consumo de bebidas alcoólicas com os polimorfismos do 5-HTTLPR. Esses resultados estão de acordo com outros autores que também não encontraram uma relação entre os polimorfismos do 5-HTTLPR e o consumo de bebidas alcoólicas (FEINN *et al.*, 2005; GORWOOD *et al.*, 2000; KRANZLER *et al.*, 2002; NELISSERY *et al.*, 2003). Da mesma forma que o tabagismo, a não relação entre o etilismo e os polimorfismos do 5-HTTLPR não elimina o importante papel do consumo de etanol como fator de risco para o CCEB.

Comparando-se os genótipos dos pacientes fumantes e não fumantes, etilistas e não etilistas no total da amostra, também não encontramos diferenças estatisticamente significativas. Esses resultados são coincidentes com os apresentados em outros trabalhos (FEINN *et al.*, 2005; LERMAN *et al.*, 1998; LERMAN *et al.*, 2000;). e contrários aos obtidos em outras pesquisas (GERRA *et al.*, 2005; HAMMOUMI *et al.*, 1999; HERMAN *et al.*, 2003; ISHIKAWA *et al.*, 1999; KIM J.W., 2006; KONISHI *et al.*, 2004; KRANZLER *et al.*, 2002; MATSUSHITA *et al.*, 2001; NELISSERY *et al.*, 2003; THOMPSON *et al.*, 2000; TÜRKER *et al.*, 1998). O real papel do 5-HTTLPR no tabagismo e etilismo continua em aberto.

A ausência de diferenças entre os dois grupos estudados em relação aos polimorfismos do 5-HTTLPR leva também a uma reflexão sobre a participação da depressão como fator de risco para o desenvolvimento do CCEB. A participação da depressão como determinante de risco para o câncer, de uma maneira geral, é controvertido. Alguns artigos contestam a participação da depressão como fator de risco para o desenvolvimento do câncer (DALTON *et al.*, 2002; GALLO *et al.*, 2000; GARSSEN, 2004; LINKINS e COMSTOCK, 1990; OLLONEN *et al.*, 2005; SPIELGER e KATO, 1996; ZONDERMAN *et al.*, 1989), enquanto outros trabalhos estabeleceram uma relação positiva entre depressão e câncer (DENOLLET, 1999; IRIE *et al.*, 2005; MCGEE *et al.*, 1994; PENNINX *et al.*, 1998;).

Embora alguns artigos não tenham encontrado uma associação entre o polimorfismo do 5-HTTLPR e a depressão (GORWOOD *et al.*, 2000; SURTEES *et al.*, 2006), existe uma grande quantidade de artigos que estabelecem esta associação com o alelo curto (s) (HERMAN *et al.*, 2003; JOINER *et al.*, 2003; LESCH *et al.*, 1996; SANJUAM *et al.*, 2005; THOMPSON *et al.*, 2000; WILHELM *et al.*, 2006). Em um

outro estudo a associação foi estabelecida com o alelo longo (l) (WILLIAMS *et al.*, 2001).

Embora a expressão de um genótipo não signifique obrigatoriamente a existência de depressão clinicamente manifestada, a falta de associação dos polimorfismos e da frequência alélica do gene em questão com os pacientes portadores de CCEB permite-nos refletir sobre a relação existente entre depressão e câncer.

Dalton *et al.* (2002) só encontraram uma associação da depressão com os cânceres relacionados com o tabagismo, entre eles o CCEB. No entanto mesmo sendo a nossa amostra (caso/controle) composta por um número significativo de indivíduos fumantes que relataram um consumo alto de cigarro, tanto a distribuição dos genótipos como a frequência alélica, não evidenciaram uma associação dos polimorfismos do 5-HTTLPR com o CCEB.

Seria de se supor que, sendo a depressão um fator de risco para o câncer e estando ela associada ao alelo 5-HTTLPT-S, a frequência do alelo s e o genótipo s/s fossem diferentes entre casos e controles.

Nosso modelo de estudo não permitiu estabelecer uma relação da depressão como fator de risco para o desenvolvimento do CCEB, pois para isso seria necessário o diagnóstico dessa alteração antes do aparecimento da neoplasia. Os transtornos depressivos comumente surgem em comorbidade com o câncer e isso gera muitas vezes um viés ao tentar-se estabelecer uma relação entre os dois eventos.

Os polimorfismos do 5-HTTLPR têm sido relacionados com alterações comportamentais e hábitos associados ao estilo de vida. Tradicionalmente o CCEB é considerado como uma doença relacionada a um estilo de vida que inclui o indivíduo em uma população de risco (BLOT *et al.*, 1988; DAY *et al.*, 1993; FRANCO *et al.*, 1989; GARROTE *et al.*, 2001; GÜNERI *et al.*, 2005; HASHIBE *et al.*, 2003; MORENO-LÓPEZ *et al.*, 2000), porém os resultados não evidenciaram uma associação dos polimorfismos do gene 5-HTT com o carcinoma de boca.

A relação entre os polimorfismos da região promotora do 5-HTT com o tabagismo e o alcoolismo bem como em relação às alterações comportamentais precisa ser melhor estudado.

## 7 CONCLUSÕES

Com base em nossos resultados concluímos que na população estudada:

- 1- Não houve uma associação dos polimorfismos da região promotora do 5-HTT com o CCEB.
- 2- Não houve diferença na frequência dos polimorfismos da região promotora do 5-HTT em relação ao consumo de álcool e fumo.
- 3- O polimorfismo do 5-HTTLPR não foi um fator de risco para o desenvolvimento do CCEB.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDO, E.N. *et al.* Tempo decorrido para o diagnóstico e tratamento do carcinoma epidermóide intrabucal num hospital público de Belo Horizonte. **Pesq Odontol Bras**, São Paulo, v.16, supl., p. 205, 2002.
2. ALTIERI, A. *et al.* Wine, beer and spirits and risk of oral and pharyngeal câncer: a case-control study from Italy and Switzerland. **Oral Oncol**, Oxford, v. 40, n. 9, p. 904-09, Oct. 2004.
3. ANDRE, K. *et al.* Role of alcohol and tobacco in the aetiology of head and neck cancer: a case-control study in the Doubs Region of France. **Oral Oncol**, Eur J Cancer, London, v. 31B, n. 5, p. 301-09, Sept. 1995.
4. ANTUNES, J.L. *et al.* Trends and spatial distribution of oral cancer mortality in São Paulo, Brazil, 1980-998. **Oral Oncol**, Oxford, v. 37, n. 4, p. 345-350, June. 2001.
5. BASSAM, B.J.; CAETANO-ANOLLÉS, G.; GRESSHOFF, P.M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrilamide gels. **Anal Biochem**, New York, v. 196, n. 1, p. 80-83, July. 1991.
6. BLOT, W.J. Alcohol and cancer. **Cancer Res**, Baltimore, v. 52, suppl., p. 2119s-23s, Apr. 1992.
7. BLOT, W.J. *et al.* Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. **Cancer**, Baltimore, v. 48, n. 11, p. 3282-87, June. 1988.
8. BOOM, R. *et al.* Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 28, n. 3, p. 495-503, Mar. 1990.
9. BOUQUOT, J.E. Oral cancer with leukoplakia. **Oral Dis**, Houndmills, v. 5, n. 3, p. 183-84, July. 1999.
10. BRASIL. Ministério da Saúde. **Estimativa 2006 – Incidência de Câncer no Brasil – INCA**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2006>>. Acesso em: 07 jun. 2006.
11. DALTON, S.O. *et al.* Depression and cancer risk: a register-based study of patients hospitalized with affective disorder, Denmark, 1969-1993. **Am J Epidemiol**, Baltimore, v. 115, n. 12, p. 1088-95, June 2002.
12. DAY, G.L. *et al.* Racial differences in risk of oral and pharyngeal cancer: alcohol, tobacco, and other determinants. **J Natl Cancer Inst**, Washington, v. 85, n. 6, p. 465-73, Mar. 1993.



13. D’COSTA, J. *et al.* Epstein-Barr virus in tobacco-induced oral cancers and oral lesions in patients from India. **J Oral Pathol. Med**, Copenhagen, v. 27, n. 2, p.78-82, Feb. 1998.
14. DENOLLET, J. Personality and cancer. **Curr Opin Psychiatr**, Philadelphia, v.12, n. 6, p. 743-48, Nov. 1999.
15. DRUMMOND, S.N. *et al.* GSTM1 polymorphism and oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, Oxford, v. 40, n. 1, p. 52-55, Jan. 2004.
16. DRUMMOND, S.N. *et al.* TP53 Codon 72 polymorphism in oral squamous cell carcinoma. **Anticancer Res**, Athens, v. 22, n. 6A, p. 3379-82, Nov.-Dec. 2002.
17. DU, X. *et al.* Penetration of N-nitrosornicotine (NNN) across oral mucosa in the presence of etanol and nicotine. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v. 29, n.2, p. 80-85, Feb. 2000.
18. FEINN, R.; NELLISSERY, M.; KRANZLER, H.R. Meta-analysis of the association of a functional serotonin transporter promoter polymorphism with alcohol dependence. **Am J Med Genet Part B**, New York, v.133B, n. 1, p. 79-84, Feb. 2005.
19. FRANCO, E.L. *et al.* Risk factors for oral cancer in Brazil: a case-control study. **Int J Cancer**, New York, v.43, n. 6, p. 992-1000, June 1989.
20. GALLO, J.J. *et al.* Major depression and cancer: the 13-year follow-up of the Baltimore epidemiologic catchment area sample (United States). **Cancer Causes Control**, Oxford, v. 11, n. 8, p. 751-58, Sept. 2000.
21. GARROTE, L.F. *et al.* Risk factors for cancer of the oral cavity and oropharynx in Cuba. **Br J Cancer**, London, v. 85, n. 1, p .46-54, July. 2001.
22. GARSSEN, B. Psychological factors and cancer development: evidence after 30 years of research. **Clin Psych Rev**, Tarrytown NY, v.24, n.3, p. 315-38, July. 2004.
23. GELERNTER, J.; KRANZLER, H.; CUBELLS, J.F. Serotonin transporter protein (SLC6A4) allele and haplotype frequencies and linkage disequilibria in African- and European- American and Japanese populations and in alcohol-dependent subjects. **Hum Genet**, Berlin, v. 101, n. 2, p. 243-46, Nov. 1997.
24. GERRA, G. *et al.* Association of the serotonin transporter promoter polymorphism with smoking behavior among adolescents. **Am J Med Genet Part B**, New York, v.135B, n. 1, p. 73-78, May 2005.
25. GERVÁSIO, O.L.A.S. *et al.* Oral squamous cell carcinoma: A retrospective study of 740 cases in a Brazillian population. **Braz Dent J**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 1, p. 57-61, Jan. 2001.

26. GORWOOD, P *et al.* Serotonin transporter gene polymorphisms, alcoholism, and suicidal behavior. **Biol Psychiatry**, New York, v. 48, n. 4, p. 259-64, Aug. 2000.
27. GRIFFITHS, A.J.F. *et al.* **Introdução à genética**. 7ª ed. Rio de Janeiro; Guanabara-Koogan, 2002. Cap. 1, p. 1-24.
28. GÜNERI P. *et al.* Primary oral cancer in a Turkish population sample: association with sociodemographic features, smoking, alcohol, diet and dentition. **Oral Oncol**, Oxford, v. 41, n. 10, p. 1005-12, Nov. 2005.
29. HAMMOUMI, S. *et al.* Does the short variante of the serotonin transporter linked polymorphic region constitute a marker of alcohol dependence? **Alcohol**, New York, v. 17, n.2, p. 107-12, Feb. 1999.
30. HASHIBE, M. *et al.* Socioeconomic status, lifestyle factors and oral premalignant lesions. **Oral Oncol**, Oxford, v. 39, n. 7, p. 664-71, Oct. 2003.
31. HEILS, A. *et al.* Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. **J Neurochem**, Oxford, v. 66, n. 6, p. 2621-64, June 1996.
32. HERMAN, A.I. *et al.* Serotonin transporter promoter polymorphism and differences in alcohol consumption behaviour in a college student population. **Alcohol Alcohol**, Oxford, v. 38, n. 5, p. 446-49, Sept.-Oct. 2003.
33. HU, S. *et al.* Interaction between the serotonin transporter gene and neuroticism in cigarette smoking behavior. **Mol Psychiatr**, Houndmills, v.5, n.2, p. 181-88, Mar. 2000.
34. IRIE, M.; MIYATA, M.; KASAI, H. Depression and possible cancer risk due to oxidative DNA damage. **J Psychiatr Res**, Oxford, v. 39, n. 6, p. 553-60, Nov. 2005.
35. ISHIGURO, H. *et al.* Association between drinking-related antisocial behavior and a polymorphism in the serotonin transporter gene in a Japanese population. **Alcohol Clin Exp Res**, New York, v. 23, n. 7, p. 1281-84, July. 1999.
36. ISHIKAWA, H. *et al.* Association between serotonin transporter gene polymorphism and smoking among japanese males. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, Baltimore, v. 8, n. 9, p. 831-33, Sept. 1999.
37. JERNEJ, B. *et al.* Intronic polymorphism of tryptophan hydroxylase and serotonin transporter: indication for combined effect in predisposition to suicide. **J Neural Transm**, Wien, v.111, n. 6, p. 733-38, June 2004.
38. JOINER, T. E. *et al.* Is there an association between serotonin transporter gene polymorphism and family history of depression? **J Affect Disord**, Amsterdam, v. 77, n. 3, p. 273-75, Dec. 2003.

39. JOKELAINEN, K. *et al.* Increased acetaldehyde production by mouthwashings from patients with oral cavity, laryngeal, or pharyngeal cancer. **Alcohol Clin. Res.** Baltimore, v. 20, n. 7, p. 1206-1210, Oct. 1996.
40. KIM, J.W. *et al.* Clinical and genetic characteristics of Korean male alcoholics with and without attention deficit hyperactivity disorders. **Alcohol Alcohol**, Oxford, May 2006. Disponível em: <www. Alcalc.oxfordjournals.org>. Acesso em: 11 maio 2006.
41. KIM, W.K. *et al.* Serotonin transporter gene polymorphism and migraine in Korean population. **Headache**, St Louis, v. 45, n. 8, p. 1056-60, Sept. 2005.
42. KONISHI, T. *et al.* Polymorphism of the dopamine D2 receptor serotonin transporter and GABA (A) receptor beta (3) submit genes and alcoholism in Mexican-Americans. **Alcohol**, New York, v.32, n.11, p. 45-52, Jan. 2004.
43. KRANZLER, H. *et al.* Association study of alcoholism subtypes with a functional promoter polymorphism in the serotonin transporter protein gene. **Alcohol Clin Exp Res**, New York, v.26, n. 9, p. 1330-35, Sept. 2002.
44. KWEON, Y.S. *et al.* Association of the serotonin transporter gene polymorphism with Korean male alcoholics. **J Psychiatr Res**, Oxford, v. 39, n. 4, p. 371-76, July. 2005.
45. LEE J.K. *et al.* Inactivation patterns of p16/INK4A in oral squamous cell carcinomas. **Exp Mol Med**, Seoul, v. 36, n. 2, p. 165-71, Apr. 2004.
46. LEITE, I.C.G.; KOIFMAN, S. Survival analysis in a sample of oral cancer patients at a reference hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Oral Oncol**, Oxford, v.34, n.5, p. 347-52, Sept. 1998.
47. LERMAN, C. *et al.* The role of the serotonin transporter gene in cigarette smoling. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, Baltimore, v. 7, n. 3, p. 253-55, Mar. 1998.
48. LERMAN, C. *et al.* Interacting effects of the serotonin transporter gene and neuroticism in smoling practices and nicotine dependence. **Mol Psychiatry**, Houndmills, v.5, n.2, p. 189-92, Mar. 2000.
49. LESCH, K.P. *et al.* Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. **Science**, Washington, v. 274, n. 5292, p. 1527-35, Nov. 1996.
50. LESCH K.P. *et al.* Organization of the human serotonin transporter gene. **J Neural Transm Gen Sect**, Wien, v. 95, n. 2, p. 157-62, Feb. 1994.
51. LEWIN, F. *et al.* Smoking tobacco, oral snuff, and alcohol in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. **Cancer**, New York, v.82, n.7, p. 1367-75, Apr. 1998.

52. LICHTERMANN, D. *et al.* Support for allelic association of a polymorphic site in the promoter region of the serotonin transporter gene with risk for alcohol dependence. **Am J Psychiatr**, Washington, v. 157, n. 12, p. 2045-47, Dec. 2000.
53. LIMOSIN, F. *et al.* Male-specific association between the 5-HTTLPR S allele and suicide attempts in alcohol-dependent subjects. **J Psychiatr Res**, Oxford, v. 39, n. 2, p. 179-82, Mar. 2005.
54. LINKINS, R.W.; COMSTOCK, G.W. Depressed mood and the development of cancer. **Am J Epidemiol, Baltimore**, v.132, n.5, p. 962-72, Nov. 1990.
55. LLEWELLYN, C.D.; JOHNSON N.W.; WARNAKULASURIYA, K.A. Risk factors of oral cancer in newly diagnosed patients aged 45 years and younger: a case-control study in Southern England. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v. 33, n. 9, p. 525-32, Oct. 2004.
56. LLEWELYN, J.; MITCHELL, R. Smoking, alcohol and oral cancer in South East Scotland: a 10-year experience. **Br J Oral Maxillofac Surg**, Edinburgh, v. 32, n. 3, p. 146-52, June. 1994.
57. MANIATIS, S.E. *et al.* **Molecular cloning – a laboratory manual**. 1 ed. New York; Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. Cap. 5, p.173-78.
58. MATSUSHITA, S. *et al.* Association study of transporter gene regulatory region polymorphism and alcoholism. **Am J Med Genet**, New York, v.105, n.5, p. 446-50, May 2001.
59. MCGEE, R.; WILLIAMS, S.; ELWOOD, M. Depression and the development of cancer: a meta-analysis. **Soc Sci Med**, Great Britain, v. 38, n.1, p. 187-92, Jan. 1994.
60. MIZUNO, T. *et al.* Gender difference in association between polymorphism of serotonin transporter gene regulatory region and anxiety. **J Psychosom Res**, Oxford, v. 60, n. 1, p. 91-7, Jan. 2006.
61. MORENO-LÓPEZ, L.A. *et al.* Risk of oral cancer associated with tobacco smoking, alcohol consumption and oral hygiene: a case-control study in Madrid, Spain. **Oral Oncol**, Oxford, v. 36, n. 2, p. 170-74, Mar. 2000.
62. MUNAFÒ, M.R.; CLARK, T.G.; FLINT, J. Are there sex differences in the association between the 5HTT gene and neuroticism? A meta-analysis. **Pers Individ Dif**, Oxford, v. 37, n. 3, p. 621-26, Aug. 2004.
63. MUNAFÒ, M.R. *et al.* Genetic polymorphisms and personality in healthy adults: A systematic review and meta-analysis. **Mol Psychiatry**, Houndmills, v. 8, n. 5, p. 471-84, May 2003.

64. MUNAFÒ, M.R. *et al.* Lack of association of 5-HTTLPR genotype with smoking cessation in a nicotine replacement therapy randomized trial. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, Baltimore, v. 15, n. 2, p. 398-400, Feb. 2006.
65. NAGAI, M.A. *et al.* TP 53 mutations in upper aerodigestive squamous cell carcinoma from a group of Brazilian patients. **Am J Surg**, Belle N J, v. 170, n. 5, p. 492-94, Nov. 1995.
66. NELLISSERY, M. *et al.* Alleles of a functional serotonin transporter promoter polymorphism are associated with major depression in alcoholics. **Alcohol Clin Exp Res**, New York, v. 27, n. 9, p. 1402-08, Sept. 2002.
67. OGDEN, G.R. Alcohol and oral cancer. **Alcohol**, New York, v. 35, n. 3, p. 169-73, Apr. 2005.
68. OGDEN, G.R.; WIGHT, A.J. Aetiology of oral cancer: alcohol. **British J Oral Maxillofac Surg**, Edinburgh, v. 36, n. 4, p. 247-51, Aug. 1998.
69. OGILVIE, A.D. *et al.* Polymorphism in serotonin transporter gene associated with susceptibility to major depression. **Lancet**, London, v. 347, n. 3, p. 731-33, Mar. 1996.
70. OLIVEIRA, J.R.M. *et al.* Analysis of a novel functional polymorphism within the promoter region of the serotonin transporter gene (5-HTT) in Brazilian patients affected by bipolar disorder and schizophrenia. **Am J Med Genet**, New York, v. 81, n. 3, p. 225-27, May 1998.
71. OLLONEN P.; LEHTONEN, J.; ESKELINEN, M. Anxiety, depression, and history of psychiatric symptoms in patients with breast disease: a prospective case-control study in Kuopio, Finland. **Anticancer Res**, Athens, v. 25, n. 3c, p. 2527-33, May-June. 2005.
72. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **CID-10**, 5 ed. São Paulo: Editora da USP, 1997. v. 1, p. 181-187.
73. OWENS, M.J.; NEMEROFF, C.B. Role of serotonin in the pathophysiology of depression: focus on the serotonin transporter. **Clin Chem**, New York, v. 40, n. 2, p. 288-95, Feb. 1994.
74. PARRA, F.C. *et al.* Color and genomic ancestry in Brazilians. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, v. 100, n. 1, p. 177-82, Jan. 2003.
75. PENNINX, B.W.J.H. *et al.* Chronically depressed mood and cancer risk in older persons. **J Ntl Cancer Inst**, Washington, v. 90, n.24 , p. 1888-93, Dec. 1998.
76. PREUSS, U.W. *et al.* Association between suicide attempts and 5-HTTLPR-S-allele in alcohol-dependent and control subjects: further evidence from a German alcohol-dependent in patient sample. **Biol Psychiatry**, New York, v. 50, n.8, p. 636-39, Oct. 2001.

77. SANJUAN, J. *et al.* Serotonin transporter gene polymorphism (5-HTTLPR) and emotional response to auditory hallucinations in schizophrenia. **Int J Neuropsychopharmacol**, Cambridge, v. 9, n. 1, p. 131-33, Feb. 2006.
78. SCHLECHT, N.F. *et al.* Interaction between tobacco and alcohol consumption and risk of cancers of the upper aerodigestive tract in Brazil. **Am J Epidemiol**, Baltimore, v. 150, n. 11, p. 1129-37, Dec. 1999.
79. SCIUBBA, J.J. Oral cancer and its detection. **JADA**, Chicago, v.132, suppl., p. 125-85, Nov. 2001.
80. SHIMA, K. *et al.* Incidence of human papillomavirus 16 and 18 infection and p53 mutation in patients with oral squamous cell carcinoma in Japan. **Br J Oral Maxillofac Surg**, London, v. 38, n. 5, p. 445-50, Oct. 2000.
81. SJÖRBERG, R.L. *et al.* Development of depression: sex and the interaction between environment and a promoter polymorphism of the serotonin transporter gene. **Int J Neuropsychopharmacol**, Cambridge, v. 9, p. 1-7, Sept. 2005.
82. SPIELGER, D.; KATO, P.M. Psychosocial influences on cancer incidence and progression. **Harvard Rev Psychiatry**, St. Louis, v. 4, n. 1, p. 10-26, May-June. 1996.
83. SURTEES, P.G. *et al.* Social adversity, the serotonin transporter (5-HTTLPR) polymorphism and major depressive disorder. **Biol Psychiatry**, New York, v. 59, n. 3, p. 224-29, Feb. 2005.
84. THOMPSON, M.D. *et al.* Serotonin transporter gene polymorphisms in alcohol dependence. **Alcohol**, New York, v. 22, n. 2, p. 61-67, Oct. 2000.
85. TÜRKER, T. *et al.* High ethanol tolerance in young adults is associated with the low-activity variant of the promoter of human serotonin transporter gene. **Neurosci Lett**, New York, v. 248, n. 3, p. 147-51, June. 1998.
86. TWITCHELL, G.R. *et al.* Serotonin transporter promoter polymorphism genotype is associated with behavioral disinhibition and negative affect in children of alcoholics. **Alcohol Clin Exp Res**, New York, v. 25, n. 7, p. 953-59, July. 2001.
87. VICTÓRIA, J.M.N. *et al.* Serotonin transporter gene polymorphism (5-HTTLPR) in patients with recurrent aphthous stomatitis. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v. 34, n. 8, p. 494-7, Sept. 2005.
88. WILHELM, K. *et al.* Life events, firsts depression onset and the serotonin transporter gene. **Br J Psychiatry**, London, v. 188, n. 3, p. 210-15, Mar. 2006.
89. WILLIAMS, R.B. *et al.* Central nervous system serotonin function and cardiovascular response to stress. **Psychosom Med**, New York, v. 63, n. 2, p. 300-05, Mar.-Apr. 2001.

90. ZAVRAS, A.I. *et al.* Smoking and alcohol in the etiology of oral cancer: gender-specific risk profiles in the south of Greece. **Oral Oncol**, Oxford, v. 37, n. 1, p. 28-35, Jan. 2001.
91. ZEKA, A.; GORE, R.; KRIEBEL, D. Effects of alcohol and tobacco on aerodigestive cancer risks: a meta-regression analysis. **Cancer Causes Control**, Oxford, v. 14, n. 9, p. 897-906, Nov. 2003.
92. ZONDERMAN, A.B.; COSTA, P.T. Jr.; McCRAE, R.R. Depression as a risk for cancer morbidity and mortality in a Nationally representative sample. **JAMA**, Chicago, v.262, n.9, p. 1191-95, Sept. 1994.

## **9 ANEXOS**



## **Anexo A**

### **Informações ao paciente - (casos)**

Estou realizando uma pesquisa que se intitula “Frequência de polimorfismo na região promotora do gene 5-htt em pacientes portadores de carcinoma de células escamosa da cavidade bucal”, com o objetivo de estudar fatores que possam interferir no aparecimento dessa doença.

Os genes são moléculas existentes dentro das células e que são responsáveis pela formação de todas as partes do nosso corpo. Algumas alterações em nossos genes são responsáveis pelo aparecimento de certas doenças.

Estamos querendo estudar as alterações dos genes que possam estar relacionadas com algumas doenças para tentar conhece-las melhor e para realizar meu trabalho é necessário realizar um raspado na bochecha, para obter algumas células e assim poder retirar delas o DNA, que é uma substância onde estão os genes. Este exame não causa dor nem outros incômodos e não acarretará qualquer forma de despesa para você. O material obtido será utilizado exclusivamente para esta pesquisa. As informações e os dados obtidos no exame são confidenciais e em hipótese alguma seu nome será divulgado. Os resultados serão publicados em revistas científicas e apresentados em congressos sem que seu nome seja revelado.

Caso não queira participar você não será prejudicado em seu atendimento e poderá se retirar da pesquisa no momento que quiser.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP-UFMG). Você poderá obter mais informações neste comitê, que funciona no 7º andar do prédio da Reitoria da UFMG, na Avenida Antônio Carlos, 6667, Pampulha, Belo Horizonte, ou com o pesquisador responsável, no endereço abaixo.

### **Termo de consentimento livre e esclarecido**

Eu, \_\_\_\_\_, identidade nº \_\_\_\_\_, declaro que fui devidamente informado e esclarecido dos objetivos da pesquisa e concordo em participar do trabalho, por minha livre vontade.

Belo Horizonte, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura

**Pesquisador responsável: Professor Evandro Neves Abdo.**

**Faculdade de Odontologia da UFMG. Avenida Antonio Carlos, 6.627. Pampulha.**

**Telefones: (31) 3499-2427 ou 3499-2447**

## Anexo B

### Informações ao paciente – (Controle)

Estou realizando uma pesquisa que se intitula “Frequência de polimorfismo na região promotora do gene 5-htt em pacientes portadores de carcinoma de células escamosa da cavidade bucal”, com o objetivo de estudar fatores que possam interferir no aparecimento dessa doença.

Os genes são moléculas existentes nas células, responsáveis pela formação de todas as partes do nosso corpo. Algumas alterações nos genes são responsáveis pelo aparecimento de certas doenças. Estamos querendo estudar as alterações dos genes que possam estar relacionadas com algumas doenças para tentar conhecê-las melhor e para isso precisamos também estudar os genes de pessoas que não estejam doentes.

Para realizarmos o trabalho é necessário fazer um raspado na bochecha, para obter algumas células para retirar delas o DNA, que é uma substância onde estão os genes. Este exame não causa dor nem outros incômodos e não acarretará qualquer forma de despesa para você. O material obtido será utilizado exclusivamente para esta pesquisa. As informações e os dados obtidos no exame são confidenciais e em hipótese alguma seu nome será divulgado. Os resultados serão publicados em revistas científicas e apresentados em congressos sem que seu nome seja revelado, e caso não queira participar você não será prejudicado em seu atendimento e poderá se retirar da pesquisa no momento que quiser.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP-UFMG). Você poderá obter mais informações neste comitê, que funciona no 7º andar do prédio da Reitoria da UFMG, na Avenida Antônio Carlos, 6667, Pampulha, Belo Horizonte, ou com o pesquisador responsável, no endereço abaixo.

#### Termo de consentimento livre e esclarecido

Eu, \_\_\_\_\_, identidade nº \_\_\_\_\_, declaro que fui devidamente informado e esclarecido dos objetivos da pesquisa e concordo em participar do trabalho, por minha livre vontade.

Belo Horizonte, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura

**Pesquisador responsável: Professor Evandro Neves Abdo.**

**Faculdade de Odontologia da UFMG. Avenida Antonio Carlos, 6.627. Pampulha.**

**Telefones: (31) 3499-2427 ou 3499-2447**

**Anexo C**  
**(Ficha clínica: Casos)**

1- Nome: \_\_\_\_\_ código: \_\_\_\_\_

2- Data do nascimento: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ Cor da pele: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_

3- Profissão: \_\_\_\_\_

4- Hábitos:

    Tabagismo:

        Tipo: \_\_\_\_\_

        Frequência diária: \_\_\_\_\_

        Duração: \_\_\_\_\_

    Etilismo:

        Tipo: \_\_\_\_\_

        Frequência diária: \_\_\_\_\_

        Duração: \_\_\_\_\_

5- Localização da lesão: \_\_\_\_\_

6- Tempo de evolução: \_\_\_\_\_

7- Diagnóstico histopatológico: \_\_\_\_\_

8- Local da coleta: \_\_\_\_\_

9- Prontuário n°: \_\_\_\_\_

10- Data: \_\_\_\_\_

**Anexo D**  
**(Ficha clínica: Controles)**

1- Nome: \_\_\_\_\_ código: \_\_\_\_\_

2- Data do nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Cor da pele: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_

3-Profissão: \_\_\_\_\_

4- Hábitos:

    Tabagismo:

        Tipo: \_\_\_\_\_

        Frequência diária: \_\_\_\_\_

        Duração: \_\_\_\_\_

    Etilismo:

        Tipo: \_\_\_\_\_

        Frequência diária: \_\_\_\_\_

        Duração: \_\_\_\_\_

5-Prontuário nº: \_\_\_\_\_

6- Local da coleta de dados: \_\_\_\_\_

7- Data: \_\_\_\_\_