

ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS DO GENE GSTM1 EM AMOSTRAS DE PTERÍGIO
Anicezio de Paula Ribeiro Junior, Guilherme Miranda Reis, Andreia Luiza Pereira, Dairici Honorato
Alves Melgar,
Kátia Karina Verolli de O. Moura
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM GENÉTICA

Introdução

O pterígio (do grego pterygion, "asa pequena") caracteriza-se por massa fibrovascular, triangular e elevada, crescendo a partir da conjuntiva em direção à córnea. Sua forma varia de acordo com seu estágio de evolução. Inicialmente, observa-se um pequeno crescimento da conjuntiva em direção a córnea, através do limbo (transição entre o "branco" e o "colorido" do olho). Esta forma incipiente possui poucos vasos. Com a progressão, os vasos sanguíneos tornam-se dilatados e congestos, a córnea torna-se irregular, podendo haver comprometimento do eixo visual se o pterígio atinge o centro da córnea. Um depósito de ferro pode ser observado na borda do pterígio (linha de Stocker) significando cronicidade. O pterígio geralmente invade a córnea por seu lado nasal (lado voltado para o nariz), mas pode ocorrer também do lado temporal (na direção da orelha) ou em outras localizações. Em superfície é dividido em três porções: corpo, cabeça e capuz. (Chui, Budak, BARRAQUER, Hoffman et al, 2008) Inflamação crônica, angiogênese e proliferação descontrolada são suas peculiaridades. (Chui, Bradley, Di Girolamo, Todani et al 2009). Os aspectos clínicos são importantes para estabelecer a classificação e o tratamento. Atualmente o tratamento do pterígio é baseado em aspectos como a evolução da córnea, progressão, fatores de risco, sintomas e idade do paciente (Christov et al 1991). Apesar de o tratamento cirúrgico ser relativamente simples, as complicações e recidivas preocupam e estimulam novas técnicas e uso de drogas coadjuvantes (Solomon et al 2000). É popularmente conhecido como "carne no olho" e erroneamente confundido com a "catarata". Há muito fora considerado uma doença ocular degenerativa. Porém, pterígios exibem propriedades semelhantes às de tumores como invasão local, metaplasias de células epiteliais, presença de vírus oncogênicos (Papiloma Vírus Humano – HPV), a inativação do gene supressor de tumor (p53) e perda de heterozigosidade. Essas características sugerem a possível natureza neoplásica da afecção. (Gallagher, Detorakis et al 2001). Diversas teorias procuram explicar a patogênese do pterígio, porém há muita controvérsia sobre a etiologia, fatores de risco podem ser divididos em: extrínsecos que incluem exposição crônica à luz ultravioleta (UV), microtraumatismo de repetição, infecções oculares e ceratite solar; e intrínsecos incluindo a hereditariedade sugerida por alguns estudos com herança autossômica dominante e penetrância incompleta, além da expressão variável, alterações lacrimais, deficiência de vitamina A e etnia. (Buratto et al, 2000). Vários genes e proteínas estão relacionados com metabolização/detoxificação de xenobióticos, que são usualmente utilizados em estudos de marcadores potenciais de suscetibilidade para desenvolvimento de várias doenças, inclusive câncer, nas quais a etiologia está relacionada à exposição ambiental. Genes que codificam as enzimas de ativação (reação de fase I) ou detoxificação (reação de fase II) de xenobióticos são alvos potenciais para estudos de suscetibilidade genética. Muitos estudos mostram que a detoxificação celular feita por enzimas está relacionada com a proteção celular. A inativação de xenobióticos e de toxinas endógenas possibilita a preservação da integridade celular, além da inibição dos eventos de citotoxicidade provocados por estas substâncias e que podem ser a causa de algumas doenças, como o câncer (Miller et al, 1997, Wilkinson e Clapper 1997). As glutionas transferases ou glutathione S-transferase, compreendem uma família de enzimas multifatoriais que catalisam o ataque nucleofílico da forma reduzida da glutathione (GSH) a compostos que apresentam um carbono, um hidrogênio, ou um átomo de enxofre eletrofílico. Nos mamíferos são encontradas três famílias de GST: citossólica, mitocondrial e microsomal. (Hayes et al, 2005). Sete classes distintas foram identificadas nas glutathione S-transferase, diferenciadas pelas sequência.

Métodos, procedimentos e materiais

Serão avaliados portadores de pterígio em diferentes hospitais de Goiânia que estão na Rede Goiana de Pesquisa de Marcadores Moleculares para Alterações Genéticas Humanas durante o ano de 2012. Os parâmetros estudados serão: idade, sexo, profissão (atividade laborativa ao sol ou não), as queixas dos pacientes, além dos hábitos sociais como tabagismo, consumo de álcool e DST. A técnica cirúrgica utilizada será ressecção de pterígio com transplante de conjuntiva. Serão excluídos de amostra pacientes cuja patologia seja recidivante (não primária), e também aqueles que já tenham sido submetidos a qualquer tipo de tratamento para esta mesma moléstia. O material coletado será submetido à extração de DNA e análise molecular. A extração do DNA inicia-se com a purificação das amostras, prosseguindo com as instruções do Kit GFX™ (Amersham Pharmacia Biotech). Após a extração do DNA, as amostras serão submetidas à amplificação, visando à detecção do polimorfismo do p53, gene GSTM1 e do gene GSTT1 utilizando os primers. TP53 ARG F-5'CTG GTG CAG GGGCCA CGC-3', R-5'CGT

GCA AGT CAC AGA CTT-3', e TP53 PRO F-5'GCC AGA GGC TGC TCC CCC-3', R-5'ATC TAC AGT CCC CCT TGC CG-3'. Como controle interno para presença de DNA humano, será utilizado o primer ZFX/ZFY que amplifica sequências específicas dos cromossomos sexuais. Para a técnica de imunoistoquímica serão utilizados cortes de tecidos que foram previamente fixados em formol tamponado a 10%, que serão incluídos em blocos de parafina para, em seguida serem cortados em micrótomo manual rotativo na espessura de três micras, em lâminas previamente silanizadas. Lâminas com cortes controle imunoistoquimicamente reativos, serão confeccionadas para evitar falsos negativos. Em seguida, as lâminas, com cortes histológicos serão colocadas em estufa a 60°C por uma hora, para serem desparafinizadas em três banhos, de cinco minutos cada, em xilol, seguido pela desidratação em três banhos em álcool absoluto, 90% e 70%, respectivamente, de um minuto cada. Após a desidratação, as lâminas serão lavadas em água corrente, suavemente, e em água destilada por um minuto. Para a recuperação antigênica será usado um tampão citrato pH 6,0, em panela de pressão elétrica por um minuto. O bloqueio da peroxidase endógena se dará pelo banho em peróxido de hidrogênio volume 10 a 3%, por dez minutos. Em seguida, as lâminas serão lavadas em água corrente, água destilada por um minuto e colocadas em solução tamponada (PBS), durante 5 minutos. O anticorpo primário p53 D07 (DAKO), será aplicado sobre o corte histológico e incubado por 12 horas (overnight) em câmara úmida e escura a uma temperatura de 4 a 8°C. As lâminas serão lavadas em solução PBS e o anticorpo secundário será aplicado (complexo avidina-biotinae-streptoavidina Kit peroxidase – DAKO®). Em seguida, procede-se a revelação em liq DAB +DAKO® (3468) e contracoloração em hematoxilina. O resultado negativo será definido como ausência de núcleos corados ou imunoexpressão inferior a 10% nas células para o marcador p53. As amostras acondicionadas em salina e congeladas serão maceradas e submetidas a digestão inicial com proteinase K, prosseguindo as instruções do kit PureGene, protocolo para tecido fresco. A integridade do DNA será certificada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio (0,5mg/mL) e será visualizado no sistema de video documentação (Image Master VDS – Amersham Pharmacia Biotech, EUA). Os resultados serão tabulados em planilhas, constituindo um banco de dados. Os resultados obtidos dos questionários dos pacientes voluntários serão utilizados na realização de estudos epidemiológicos da associação entre o estilo de vida e o resultado da análise molecular.

Resultados e discussão

Espera-se encontrar correlações positivas entre o polimorfismo do gene P53, GSTT1 e GSTM1 relacionando ao pterígio. Sistematização de procedimentos experimentais para a triagem do pterígio por exames moleculares. Desenvolvimento de marcadores moleculares para análise de pterígio, a fim de tornar o diagnóstico, o tratamento e o prognóstico mais eficiente. Formar especialistas, mestres e doutores durante a execução do projeto; Publicar artigos em periódicos de ampla circulação nacional e internacional.

Conclusão e referências

Espera-se encontrar correlações positivas entre o polimorfismo do gene P53, GSTT1 e GSTM1 relacionando ao pterígio. Sistematização de procedimentos experimentais para a triagem do pterígio por exames moleculares. Desenvolvimento de marcadores moleculares para análise de pterígio, a fim de tornar o diagnóstico, o tratamento e o prognóstico mais eficientes. Formar especialistas, mestres e doutores durante a execução do projeto; Publicar artigos em periódicos de ampla circulação nacional e internacional.

Alves MRA. Pterígio In: Alves MR. Conjuntiva cirúrgica. São Paulo: Roca;1999. p.59-66. BARRAQUER J I. Etiology, pathogenesis, and treatment of the pterygium. Transactions of the New Orleans Academy of Ophthalmology, Symposium on Medical and Surgical Diseases of the Cornea. Mosby, St. Louis, 1980; 167-78. Bradley JC, yang W, Bradley RH, Reid TW, schwab IR. The science of pterygia. Br J Ophthalmol. 2010;94:815-20. Budak K, Khater TT, Friedman NJ, Koch DD. Corneal topographic changes induced by excision of perilimbal lesions. Ophthalmic Surg Lasers 1999; 30: 458-64. CHEN, F et al. Current strategies to target p53 in cancer. Biochemical Pharmacology. 2010. vol. 80, pp. 724-730. Chi-Hsien Young, Yu-Lun Lo, Yi-Yu Tsai, Tung-Sheng Shih, Huei Lee, Ya-Wen Cheng. CYP1A1 gene polymorphisms as a risk factor for pterygium. Mol Vis. 2010; 16: 1054–1058. Published online 2010 June 9. Christov R, Forno EA, Campagna CM, Bechara SJ, José NK. Análise histopatológica de pterígios primários e recidivados. Rev Bras Oftalmol. 1991;50(4):59-62. Detorakis ET, Sourvinos G, Spandidos DA. Detection of herpes simplex virus and human papilloma virus in ophthalmic pterygium. Cornea 2001; 20: 164–167. Di Girolamo N, Chui J, Coroneo MT, Wakefield D. Pathogenesis of pterygia: role of cytokines, growth factors, and matrix metalloproteinases. Prog Retin Eye Res. 2004;23:195–228. Ferreira, CG & Rocha, JC. Suscetibilidade Genética ao Câncer. In: Oncologia Molecular. Parte III:

Oncogenética, 3ed, Atheneu Editora 2005, págs. 295:305. Gallagher MJ, Giannoudis A, Herrington CS, Hiscott P. Human papillomavirus in pterygium. *Br J Ophthalmol* 2001; 85: 782–784. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 45:51-88. 2005. Hoffman RS, Power WJ. Current options in pterygium management. *Int Ophthalmol Clin.* 1999; 39 (1): 15-26. Iam N, Wakefield D, Coroneo MT. The pathogenesis of pterygium: current concepts and their therapeutic implications. *Ocul Surf* 2008; 6:24-43. Liang X, Li F, Qiu W. An epidemiological survey of blindness and low vision cula: the blue mountains eye study. *Aust N Z J Ophthalmol.* 1998;26 Suppl 1:S2-5. Miller MS, Mccarver DG, Bell DA, Eaton DL, Goldstein JA. Genetic polymorphisms in human drug metabolic enzymes. *Fundamental and applied toxicology.* 40: 1-14. 1997. Panchapakesan J, Hourihan F, Mitchell P. Prevalence of pterygium and pinguecula:the blue mountains eye study. *Aust N Z J Ophthalmol.* 1998;26 Suppl 1:S2-5. Rebbeck TR. Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.* September, 6: 733-743. 1997. SCHELLINI, S et al. Matrix metalloproteinase – 9 expression in pterygium. *Brasil. Arq. Bras. Oftalmol.* 2006. vol. 69, pp. 161-164. SCHNEIDER, B et al. Accumulation of p53 protein in pterygia is not accompanied by TP53 gene mutation. 2006. *Exp Eye Res.* Vol. 82, pp. 91-98. Scianni, L et al. polymorphisms GSTM1 and GSTT1 and sporadic breast cancer mammographic features. 2008. *Rev. Assoc. Med. Bras.* Vol.54, pp2. Singh MM, Murthy GV, Venkatraman R, Rao SP, et al. (1997). A study of ocular morbidity among elderly population in a rural area of central India. *Indian J Ophthalmol.* 45: 61-65. Solomon A e Tseng SCG. (2000). Amniotic transplantation in pterygium surgery. In: Buratto L, Phillips RL, Carito G. *Pterygium surgery.* Philadelphia:Slack. 143-56. SOLOZOB, V et al. Regulation of p53 in embryonic stem cells. *Experimental cell research.* 2010. Vol. 316, pp. 2434-2446.

Palavras-chave: Pterígio; gene gstM1

Contato: aniceziojunior@gmail.com