



**UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS**

Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu

Mestrado em Genética

**Análise da expressão do gene *TP53*, polimorfismo do  
codon 72 e HPV em amostras de pterígio**

Francisco Weliton Rodrigues

Goiânia-GO

2008



**UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS**

Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu

Mestrado em Genética

**Análise da expressão do gene *TP53*, polimorfismo do  
codon 72 e HPV em amostras de pterígio**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Genética da Universidade Católica de Goiás, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Genética.

Francisco Weliton Rodrigues

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Katia Karina Verolli de Oliveira Moura

Goiânia-GO

2008

*Dedico...*

*À minha esposa Fernanda e à  
minha filha Giovanna por todo carinho,  
apoio e compreensão durante minha  
trajetória necessária para a realização  
deste trabalho.*

## **Agradecimentos**

Considero que a elaboração de uma dissertação de mestrado é um produto coletivo embora sua redação, responsabilidade e estresse, seja predominantemente individual. Várias pessoas contribuíram para que este trabalho chegasse a bom termo, em especial a bióloga Jalsi Tacon Arruda e ao oftalmologista Rodrigo Egídio da Silva, aos quais deixo registrada minha gratidão.

Agradecimento especial à Dra. Katia Karina V. O. Moura, minha querida orientadora, por sua disponibilidade irrestrita, sua forma exigente, crítica e criativa de argüir as idéias apresentadas que nortearam este trabalho, facilitando o alcance dos objetivos.

*“Não há nenhum segredo para o sucesso. É o resultado de preparação, trabalho duro e aprender com o fracasso.”*

Gen. Colin L. Powell

## Sumário

	Página
<b>INTRODUÇÃO</b>	09
Pterígio	09
Gene supressor de tumor TP53	13
Papilomavírus humano – HPV, polimorfismo do gene TP53 e Pterígio	15
<b>OBJETIVO GERAL</b>	18
Objetivos Específicos	18
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	19
Imunohistoquímica	19
Análise molecular	20
Análise estatística	23
<b>RESULTADOS</b>	24
<b>DISCUSSÃO</b>	30
<b>CONCLUSÕES</b>	34
<b>REFERÊNCIAS</b>	35
Anexos	44

## RESUMO

O pterígio é uma doença de origem e patogênese desconhecida que pode comprometer a visão. Vários pesquisadores acreditam que o pterígio está relacionado à luz UV e a expressão anormal da proteína p53, além da presença do papilomavírus humano (HPV), como fatores de risco para o seu desenvolvimento, mas os resultados são inconclusivos. Investigamos a expressão da proteína p53, o polimorfismo do codon 72 do gene *TP53* e a presença do HPV. Amostras de pterígio foram obtidas de 36 pacientes e 21 escleras normais formaram o grupo controle. A expressão de p53 foi analisada por imunohistoquímica usando anticorpo DO-7. Análise do genótipo de p53 foi realizada por PCR com primers específicos para os alelos arginina e prolina e a presença do HPV foi analisada nos dois grupos. Quatorze amostras de pterígio (39%) foram positivas para expressão anormal de p53. O polimorfismo foi observado em 31 (86%) amostras heterozigotas, 03 (8%) homozigotas para prolina e 02 (6%) homozigotas para arginina, enquanto que no grupo controle foi observado 12 (57%) amostras heterozigotas, 07 (33%) homozigotas para prolina e 02 (10%) homozigotas para arginina. 21 pterígios (59%) foram positivos para HPV e o tipo 01 foi encontrado em 43% (9/21), tipo 02 em 34% (7/21) e os dois tipos simultaneamente em 23% (5/21) amostras do grupo pterígio. O grupo controle mostrou 9.5% (2/21) amostras positivas para HPV e o tipo 16 nas duas amostras. Nossos dados sugerem que a expressão anormal de p53, o polimorfismo do codon 72 e a presença do HPV podem estar relacionados com o desenvolvimento do pterígio.

Palavras Chave: pterígio, oftalmologia, mutações.

## ABSTRACT

Pterygium is a disease of unknown origin and pathogenesis that can be vision threatening. Several researchers believe that pterygium is UV-related and that abnormal expression of p53 protein and infection with human papillomavirus (HPV) are risk factors for pterygium, but their experiments have been inconclusive. We investigated its relation with p53 protein expression, p53 gene codon 72 polymorphism and infection with HPV DNA. Pterygial samples were obtained from 36 patients; 21 normal conjunctival samples were used as controls. Expression of p53 protein was studied by Immunohistochemistry, using the antibody DO-7. Analysis for the p53 genotype was made with PCR, using specific primers for the arginine and proline alleles, and an analysis for HPV was made of the pterygium patients and control group. Fourteen of the 36 pterygia specimens were positive for abnormal p53 expression. Thirty one of the patients were heterozygotic and three were homozygotic for the proline allele; two were homozygotic for the arginine allele; in the control group 12 of 21 were heterozygotic and seven of these 21 were homozygotic for the proline allele; two were homozygotic for the arginine allele. Twenty-one of the pterygia patients were positive for HPV; HPV type 1 was found in nine of these, type 2 in seven and both types in five. Only two of the 21 controls had HPV; both had type 16. We suggest that abnormal expression of p53, p53 codon 72 polymorphisms and HPV DNA are required cofactors for the development of pterygium.

Key words: pterygia, ophtalmology, mutations.



## INTRODUÇÃO

### Pterígio

O pterígio, do grego *pterygion* – pequena asa – é uma displasia da conjuntiva bulbar sobre o limbo corneal, de tecido fibrovascular que delamina centrípeta e superficialmente a córnea (Figura 1). É triangular ou trapezoidal e localiza-se ao longo do eixo horizontal da fenda palpebral, sendo mais freqüente no setor nasal (Serracarbassa e Dantas, 1999). Apesar de ser uma lesão benigna, é também causador potencial de cegueira, uma vez que seu crescimento pode obstruir a zona óptica; podendo desencadear astigmatismo e conseqüente alteração visual, além de sintomas como sensação de corpo estranho, ardor, irritação e lacrimejamento (Garrido Neto et al., 1996). Dada sua aparência estética facilmente visível, o pterígio é uma das mais antigas doenças oculares relatadas.



**Figura 1.** Foto do olho esquerdo de um paciente do gênero masculino com pterígio primário grau III, sobre o ângulo nasal – local de maior incidência – no pré-operatório. Fonte: Rodrigues, FW.

A característica clínica do pterígio varia de acordo com seu estágio de evolução. Em sua forma inicial, observa-se um pequeno crescimento da conjuntiva em direção à córnea, através do limbo, e essa 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 atingir o centro da córnea. Um depósito de ferro pode ser observado na borda do pterígio (linha de Stocker) significando cronicidade (Christov et al., 1991).

Histologicamente caracteriza-se por um tecido fibrilar e fibrovascular, degenerativo, basofílico e subepitelial que invade a córnea, destruindo a camada de Bowman em decorrência da “degeneração pseudo-elástica” que as fibras colágenas denominadas elastóticas causam na área afetada (Christov et al., 1991).

Os aspectos clínicos são importantes para estabelecer a classificação e o tratamento. Atualmente o tratamento do pterígio é baseado em aspectos clínicos como evolução na córnea, progressão, fatores de risco, sintomas e idade do paciente (Buratto et al, 2000). Apesar de o tratamento cirúrgico ser relativamente simples, as complicações e recidivas preocupam e estimulam novas técnicas e uso de drogas coadjuvantes (Solomon e Tseng, 2000).

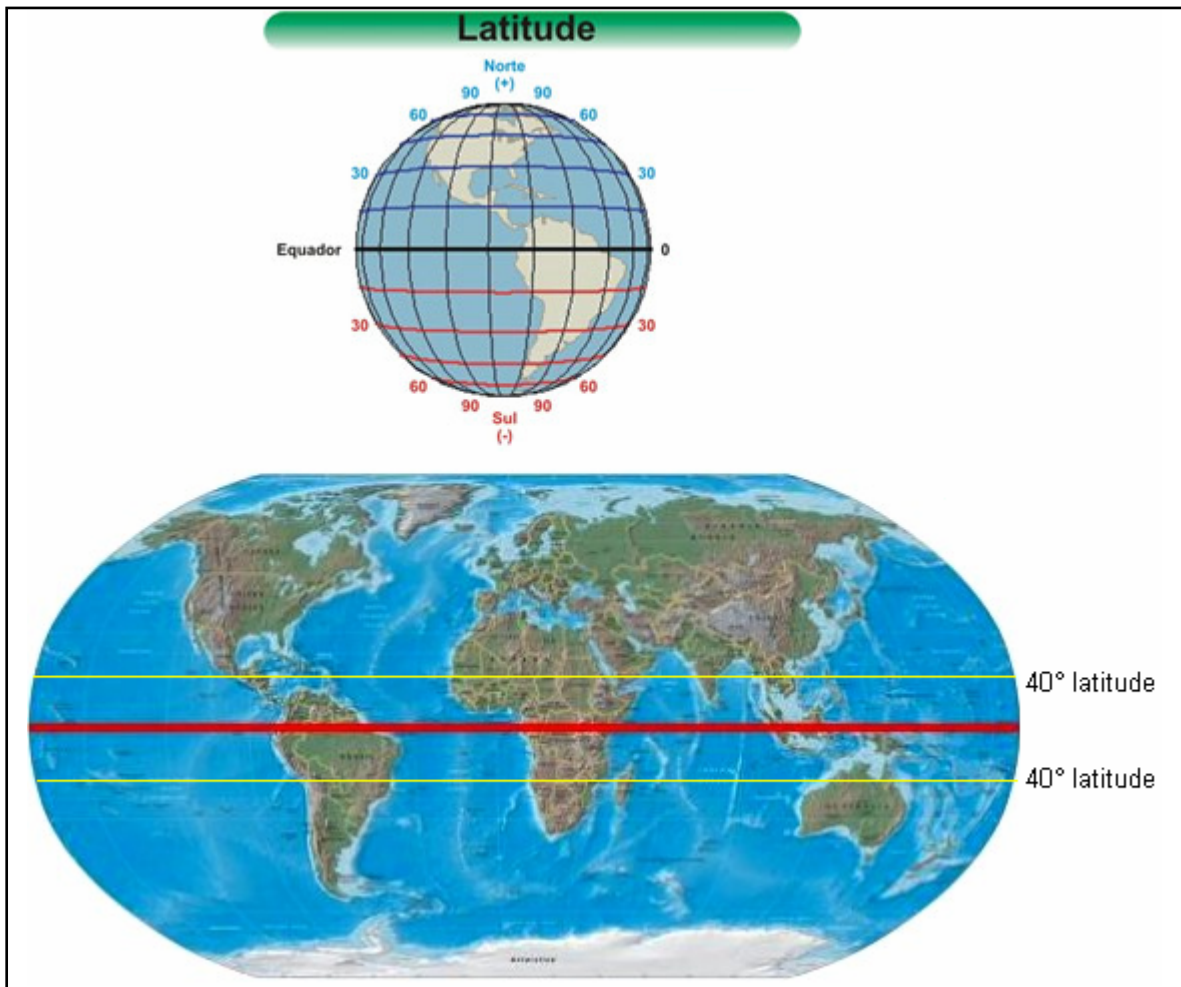
Diversas teorias procuram explicar a patogênese do pterígio, porém há muita controvérsia sobre a etiologia. Fatores de risco podem ser divididos em: extrínsecos que incluem exposição crônica à luz ultravioleta (UV), microtraumatismo de repetição, infecções oculares e ceratite solar; e intrínsecos incluindo a hereditariedade sugerida por alguns estudos com herança autossômica dominante e penetrância incompleta, além da expressão variável

(Maeda et al, 1996), alterações lacrimais, deficiência de vitamina A e etnia (Buratto et al, 2000).

A maior incidência ocorre entre os 20 e 50 anos e, raramente, em indivíduos de faixa etária inferior a 15 anos. Segundo estudos prévios, o pterígio ocorre preferencialmente em indivíduos adultos, do sexo masculino, acima dos 30 anos (Panchapakesan et al., 1998). Entretanto, pesquisas brasileiras mostraram acometimento de ambos os sexos, nas mesmas proporções (Garrido Neto et al., 1996).

O pterígio está fortemente relacionado à exposição ao sol, com pouca evidência de que esta exposição, em qualquer período particular da vida, seja mais importante. Países de clima tropical, localizados próximo à região entre 40° de latitude (ao norte e ao sul da linha do Equador) e populações que habitam ilhas e altas latitudes, apresentam maior ocorrência de pterígio (Maeda et al., 1996; Saw e Tan, 1999; Saw et al., 2000) [Figura 2].

A distribuição pelo mundo apresenta uma prevalência de até 22,5% nas regiões equatoriais, e nas regiões abaixo do paralelo 40 a prevalência diminui para 2% (Piras et al., 2003). Foi observada incidência de 5,2% na Índia (Singh et al., 1997), 6,2% na Austrália (Taylor, 1980), 8,2% na Nigéria (Nwosu, 1998) e 11,2% no Texas (Anyanwu e Nnadozie, 1993) sendo que a prevalência aumenta linearmente com a idade (Wong et al., 2001). Isto indica que pessoas expostas à luz solar, a vento, poeira, poluição e outros fatores irritativos são mais propensas a desenvolver o pterígio (Ateenyi-Agaba et al., 2004).



**Figura 2.** Planisfério ou Mapa Mundi demonstrando a localização de 40° latitude, faixa de maior incidência de pterígio. Fonte: IBGE, 2008.

A situação demográfica e as observações na prática diária mostram que esta é uma lesão muito encontrada em nosso país. Algumas etnias apresentam maior predisposição para o pterígio, por exemplo: indianos mais que caucasianos; tailandeses mais que chineses; negros africanos mais que árabes de pele clara (Buratto et al, 2000). Porém, dados de incidência e prevalência do pterígio não são conhecidos para o território brasileiro e mesmo para regiões específicas, sendo poucos os estudos que abordam o assunto.

### Gene supressor de tumor *TP53*

O gene supressor de tumor *TP53* está situado no cromossomo 17 (17p13.1) ao longo de 20kb com 11 exons (Figura 3). Seu produto de transcrição é uma fosfoproteína nuclear constituída de 393 aminoácidos expressa em níveis basais nas células normais. Atua como sensor de danos no DNA e auxilia o sistema de reparo, paralisando o ciclo celular ou induzindo à apoptose, prevenindo que ocorra proliferação de células com o DNA mutado (Silva et al., 2003 a).

No caso de lesões, através de uma cascata de reações, a p53 impede que a célula entre em mitose e complete a divisão celular (Klumb e Cavalcanti Júnior, 2002). O dano no DNA desencadeia sinais celulares que acumulam p53 fosforilada no núcleo e o reparo ocorre com a super-expressão da proteína que atua por mecanismos de transativação gênica em alvos específicos ativando outros genes que determinam a parada do ciclo celular no início de G1 e o reparo do DNA (Silva et al., 2003 b).

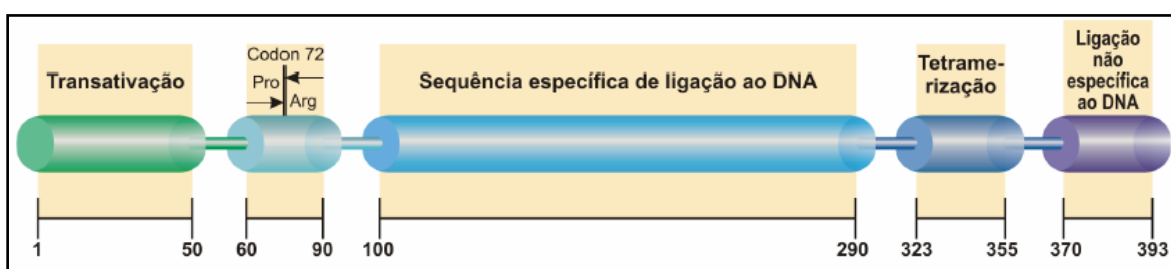
A proteína p53 tem meia vida curta em células normais não submetidas a estresse, cerca de 20 minutos. Na ausência de sinais indutores, os baixos níveis de p53 são mantidos por meio da interação com a proteína HDM2 (*Human Murine Double Minute 2*), uma ubiquitina-ligase. Entretanto, a expressão de HDM2 é controlada pela p53 e este *feedback* negativo funciona como um meio de manter os níveis de p53 baixos e reduzir os níveis da proteína em células com estresse, quando o dano for reparado (Momand et al., 2000).

A mutação no gene *TP53* produz uma proteína que não é reconhecida pela HDM2 que a metaboliza, elevando a meia vida para 24h tornando-a detectável

através da imunohistoquímica e o anticorpo anti-p53 reconhece a porção conservada da proteína que existe em ambas as formas. Os casos com menos de 5% de células marcadas têm prognóstico mais favorável, porém, a maioria das patologias relacionadas à mutação do gene *TP53* apresenta um índice de mais de 10% de células marcadas (Chowers et al., 2001; Helt et al., 2002).

As células que apresentam o gene *TP53* mutado apresentam um fenótipo instável e tendem a acumular mutações e rearranjos cromossômicos adicionais, levando a uma rápida proliferação de clones com DNA mutado e transformação neoplásica (Galvão et al., 2007).

O desenvolvimento do pterígio foi atualmente associado à mutação de células germinativas límbicas, como a que ocorre no gene supressor de tumor *TP53*, que pode ser induzida pela radiação solar (Singh et al., 1997). O polimorfismo do codon 72 no exon 4 – prolina (CCC) ou arginina (CGC), têm sido estudado como fator de risco para o desenvolvimento de diferentes tipos de câncer com resultados contraditórios (Spandidos et al., 1997; Schneider et al., 2006).



**Figura 3.** Desenho esquemático do gene *TP53* mostrando o polimorfismo do codon 72 e os domínios funcionais da proteína. Fonte: modificado de Silva et al., 2003 b.

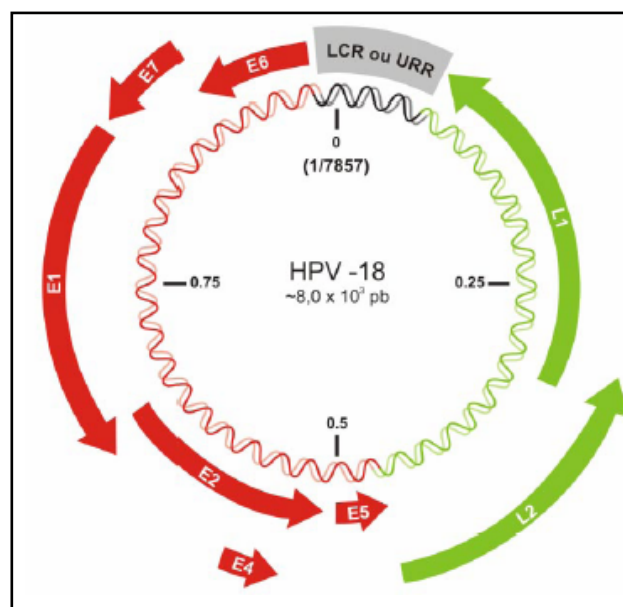
## **Papillomavírus humano – HPV, polimorfismo do gene *TP53* e Pterígio**

Os HPV pertencem à família *Papovaviridae* (ICTV, 2008) e agrupa os vírus que produzem papilomas. Os HPV são isométricos sem envelope, com cerca de 55nm de diâmetro quanto à morfologia e similares entre si à microscopia eletrônica. São constituídos por DNA circular de fita dupla (Fernández-Contreras et al., 2000). Apresentam tropismos pelo epitélio e mucosas e são conhecidos mais de 100 subtipos. São divididos em: tipos de baixo risco que incluem os HPV 1, 2, 6, 11, 26, 42, 44, 54, 70 e 73, e os de alto risco com os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 55, 56, 58, 59, 66 e 68 (Rivoire et al., 2001).

A malignidade está no papel transformante das oncoproteínas dos genes E6 e E7 que se ligam à proteína p53 e pRB, respectivamente. As oncoproteínas virais interferem na regulação do ciclo celular do hospedeiro e este fenômeno desbloqueia o ciclo e leva a instabilidade genética, causando a imortalização celular. Este processo é encontrado somente nos vírus de alto risco, não sendo observado nos de baixo risco (Helt et al., 2002). A inativação e degradação da proteína p53 pela oncoproteína E6 do HPV de alto risco é um dos principais eventos associados ao desenvolvimento da carcinogênese (zur Hausen, 1996; 2002).

Polimorfismo de DNA é, por convenção, a existência de mais de um alelo para um *locus* podendo ser encontrado em mais de 1% da população. Dois seres humanos escolhidos ao acaso diferem em cerca de 3 milhões de nucleotídeos. A maioria destes polimorfismos é neutra ou quase neutra, mas uma fração é funcional e são responsáveis pelas diferenças fenotípicas observadas entre os indivíduos, inclusive na suscetibilidade a doenças (Bamshad et al., 2004). Os

polimorfismos funcionais presentes no gene supressor de tumor *TP53* podem influenciar na suscetibilidade individual ao desenvolvimento de diversos tipos de câncer (Galvão et al., 2007). O polimorfismo do gene *TP53* para o codon 72 tem sido avaliado na tentativa de determinar seu papel e sua importância no desenvolvimento de tumores associados com infecções pelo HPV (Park e Androphy, 2002; Chen et al., 2003). No entanto, percebe-se que existem controvérsias quanto aos resultados.



**Figura 4.** Representação esquemática do genoma circular de fita dupla do HPV-18. L1: codifica a proteína principal do capsídeo; L2: codifica a proteína secundária do capsídeo – genes expressos tardiamente no ciclo vital do vírus. E1: replicação do DNA viral; E2: controle da transcrição; E4: maturação viral e alteração da matriz intracelular; E5, E6, E7: estímulo da proliferação e transformação celular – genes expressos precocemente no ciclo vital do vírus. LCR (*Long Control Region*) longa região de controle ou região regulatória a montante. Fonte: modificado de Silva et al., 2003 b.

Quanto ao pterígio, os motivos que levam os pacientes a desejarem sua remoção cirúrgica referem-se à estética e à sintomatologia porque frequentemente causa desconforto e distúrbios na superfície ocular. Quando o crescimento sobre a córnea ultrapassa 3mm, há distorção da curvatura corneal, com repercussão sobre a refração. Se negligenciado, pode, ocasionalmente,



crescer encobrendo parcial ou totalmente o eixo visual (Buratto et al., 2000). Além do incômodo causado pelo pterígio, esta patologia pode ser considerada um problema significativo de saúde nas áreas rurais, primariamente como resultado da exposição ao sol (Singh et al., 1997).

A etiologia do pterígio parece como descrita anteriormente, multifatorial, de modo que vários estudos dedicam-se ao esforço de objetivar a preponderância deste ou daquele fator, direcionando assim, tanto a prevenção quanto a terapêutica (Gallagher et al., 2001; Hirst, 2003; Skolnick e Grimmett, 2005). Dentre os fatores etiológicos que precisam ser confirmados e melhor esclarecidos, destaca-se o polimorfismo no codon 72 do gene *TP53*, e a possível associação com o HPV (Varinli et al., 1994; Piras et al., 2003; Reid e Dushku, 2003).

O desenvolvimento da biologia molecular permitiu o estabelecimento de técnicas aplicadas na investigação biológica que tiveram profunda influência nas pesquisas médicas e trouxeram à luz o gene *TP53* como um de seus principais elementos, ao qual foi atribuído um significativo papel no desenvolvimento das neoplasias. Desde então, uma vasta literatura tem sido criada visando definir melhor seu valor potencial de aplicabilidade na clínica e dados que permitam a ampliação dos conhecimentos científicos relacionados ao pterígio.

## **OBJETIVO GERAL**

Analisar a expressão do gene supressor de tumor *TP53* e a presença de HPV em amostras de pacientes submetidos à cirurgia para excisão de pterígio na Fundação Banco de Olhos de Goiás.

### **Objetivos Específicos**

- Detectar a proteína p53 por imunohistoquímica nos espécimes de pterígio;
- Analisar o índice de marcação de p53 nos espécimes de pterígio;
- Identificar a frequência alélica do polimorfismo do codon 72 do gene *TP53*;
- Detectar a presença de HPV e, nos casos positivos, tipar o vírus;
- Relacionar a imunohistoquímica, o genótipo do codon 72 do gene *TP53* e o HPV ao prognóstico do pterígio.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo caso-controle de base hospitalar. Foi realizado com 36 pacientes com idade entre 15 e 70 anos, de ambos os sexos, submetidos à ressecção cirúrgica de pterígio na Fundação Banco de Olhos de Goiás no mês de julho de 2006. A técnica cirúrgica utilizada foi ressecção de pterígio com transplante de conjuntiva. Foram excluídos da amostra pacientes cuja patologia fosse recidivante (não primária), e também aqueles já submetidos a qualquer tipo de tratamento para esta mesma afecção. As amostras dos pterígios foram colocadas, durante o ato cirúrgico, em frascos contendo formol tamponado, enviadas imediatamente ao laboratório de patologia do Instituto Goiano de Hematologia (INGOH) para exame anátomo-patológico e detecção por Imunohistoquímica da proteína p53. O material foi incluído em blocos de parafina e cortes de 4µm foram feitos de cada bloco utilizando-se uma lâmina por bloco para evitar contaminação cruzada. Cerca de 05 filetes de cada bloco foram colocados em microtubos devidamente identificados para extração de DNA e análise molecular. Amostras de 21 escleras sem alterações oftalmológicas foram obtidas junto a Fundação Banco de Olhos de Goiás – Central de Transplantes – oriundas de doações, colocadas em frascos contendo formol tamponado, para extração de DNA e análise molecular do grupo controle.

### Imunohistoquímica

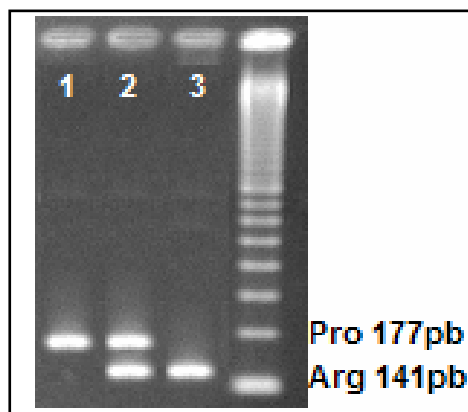
Para a análise Imunohistoquímica foi empregado o método da estreptoavidina-biotina-imunoperoxidase (*Super ABCkit, Erviagas*) e para a imunodeteção da proteína p53 o anticorpo monoclonal DO7 (*DAKO*).

Sempre que possível, cerca de 300 núcleos de células foram avaliados em cada espécime e os resultados apresentados em termos percentuais. O índice de marcação de p53 foi classificado em três categorias definidas como: 1) negativa; 2) positiva em menos de 50% das células e 3) positiva em mais de 50% de células. Foi considerado positivo para marcação de p53 quando apresentou  $\geq 10\%$  de células marcadas (cutoff  $\geq 10\%$ ) [Chowers et al., 2001; Helt et al., 2002].

### **Análise molecular**

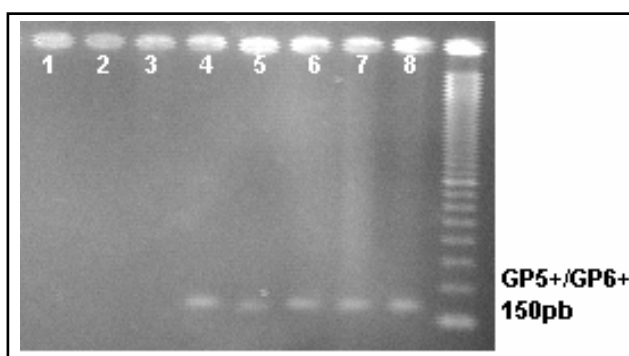
A partir do material cortado em micrótomo, a extração do DNA inicia-se com a desparafinização das amostras, prosseguindo com as instruções do Kit PureGene™ (*Quiagen Biotech, EUA*), protocolo para tecido parafinado. As amostras de esclera foram maceradas e submetidas à digestão inicial com proteinase K, prosseguindo com as instruções do Kit PureGene™, protocolo para tecido fresco. A integridade do DNA foi certificada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio (0,5mg/mL) e visualizado no sistema de vídeo documentação (*Image Master VDS® - Amersham Pharmacia Biotech, EUA*).

As amostras de DNA foram submetidas à amplificação por PCR, visando à detecção do polimorfismo no codon 72 do gene *TP53*, utilizando um par de primers específicos para cada alelo possível – arginina ou prolina.



**Figura 5.** Foto do gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio, evidenciando as bandas referentes a análise do polimorfismo do codon 72 do gene *TP53*. Linha 1: homocigoto Pro/Pro; linha 2: heterocigoto Pro/Arg; linha 3: homocigoto Arg/Arg. Marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Invitrogen). Fonte: Rodrigues, FW.

Para detecção do HPV utilizou-se um primer genérico – GP5+/GP6+ – que flanqueia uma seqüência da região L1 do genoma viral. Essa região é expressa tardiamente no ciclo vital do vírus e é conservada, estando presente em todos os tipos virais e, portanto, serve como marcador para a detecção do HPV (Fernández-Contreras et al., 2000). Para as amostras com resultado positivo, foi realizada a genotipagem do subtipo viral, utilizando primers específicos para os HPV 1, 2, 6, 11, 16, 18, 33, 35, 45 e 58. Uma amostra de DNA HPV+ foi utilizada como controle positivo da reação (Tabela 1).



**Figura 6.** Foto do gel de agarose a 3% corado com brometo de etídio, evidenciando as bandas referentes ao primer utilizado na detecção do HPV. Linhas 1-3: amostras negativas; linhas 4-8 amostras positivas. Marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Invitrogen). Fonte: Rodrigues, FW.

Como controle interno para DNA humano, foi utilizado o primer ZFX/ZFY que amplifica seqüências específicas dos cromossomos sexuais. O produto obtido por cada reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2% para TP53 e 3% para HPV, em um campo elétrico de 10 V/cm corado com brometo de etídio (5µg/mL) e o registro visual do gel foi feito com o auxílio de um sistema de vídeo-documentação (*Image Master VDS® - Amersham Pharmacia Biotech, EUA*).

**Tabela 1.** Seqüência dos primers analisados nas amostras de DNA.

Primer	Seqüência 5' → 3'	Tamanho (pb)
TP53 ARG	F-5' CTG GTG CAG GGG CCA CGC -3' R-5' CGT GCA AGT CAC AGA CTT -3'	141
TP53 PRO	F-5' GCC AGA GGC TGC TCC CCC -3' R-5' ATC TAC AGT CCC CCT TGC CG -3'	177
GP5+ GP6+	F-5' TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC -3' R-5' GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC -3'	150
HPV-1	F-5' TTT GGT GTT TGG ATG CTG TC -3' R-5' TGC ACT CTT TCT CCG TTT GA -3'	462
HPV-2	F-5' GCG ACG ATG AGT TTG GAT TT -3' R-5' CAA GTG AAA GTT GGC TGC AA -3'	463
HPV-6	F-5' CACGTCTGCAACGACCATAG -3' R-5'CCATGAAATTCTAGGCAGCA -3'	195
HPV-11	F-5' CGCAGAGATATATGCATATGC -3' R-5' AGTTCTAAGCAACAGGCACAC -3'	90
HPV-16	F-5' TCAAAGCCACTGTGTCCTGA -3' R-5' CGTGTTCCTTGATGATCTGCAA -3'	119
HPV-18	F-5' CCGAGCACGACAGGAACGACT -3' R-5' TCGTTTTCTTCCTCTGAGTCGCTT -3'	172
HPV-33	F-5' AACGCCATGAGAGGACACAAG -3' R-5' ACACATAAACGAACTGTGGTG -3'	211
HPV-35	F-5' CCCGAGGCAACTGACCTATA -3' R-5' GGGGCACACTATTCCAATG -3'	230
HPV-45	F-5' ACCAGATTTGTGCACAGAAT -3' R-5' TTTTTCCAGTGTCTCTCCA -3'	236
HPV-58	F-5' GGACATTGCATGATTTGTGT -3' R-5' TTTCTTGTGGACACAATGGT -3'	314
ZFX/Y	F-5'ACCRCTGTA CTGACTGTGATTACAC -3' R-5'GCACYCTTTGGTATCYGAGAAAGT -3'	495

pb: pares de base; R= A/G; Y= C/T

**Análise estatística**

Os cálculos foram realizados para as variáveis relativas aos pacientes e aos aspectos clinico-patológicos. O teste do qui-quadrado e o teste de Odds Ratio foram utilizados para a verificação de possíveis associações entre a imunodeteccção, à análise molecular e os dados clínicos e histopatológicos. O programa BioEstat® 3.0 (*Sociedade Civil Mimirauá/MCT – CNPq*) foi utilizado para realizar os testes.

## RESULTADOS

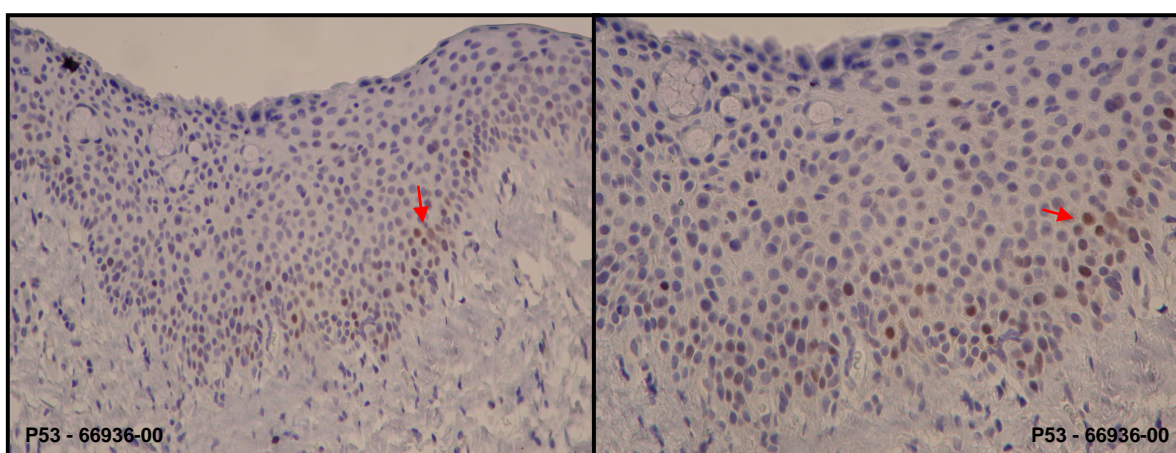
Os pacientes analisados no grupo caso foram classificados de acordo com os dados da tabela 2.

**Tabela 2.** Dados do grupo caso distribuídos em relação ao gênero, faixa etária e idade agrupada dos pacientes.

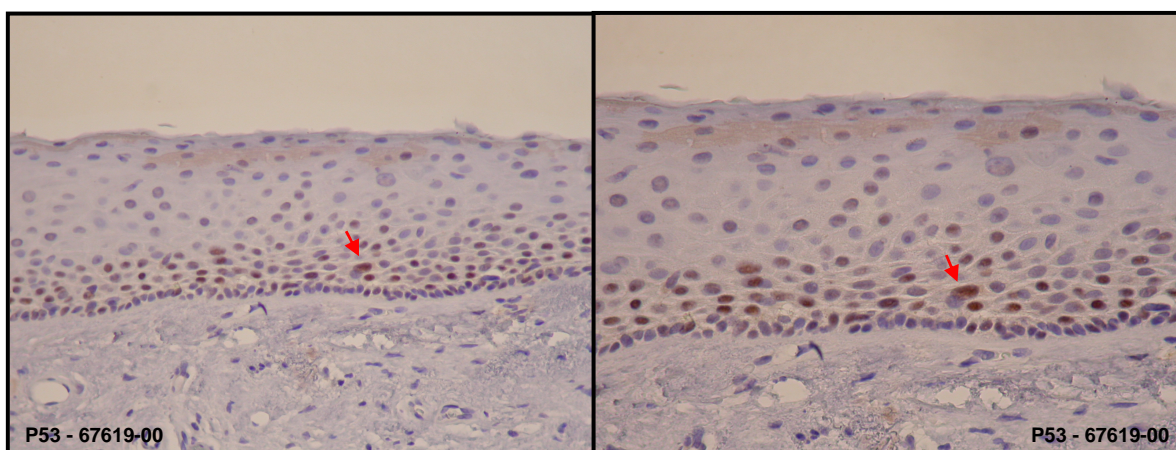
Variável	Grupo Amostral (n)	Frequência (%)
<b>Sexo</b>		
Masculino	15	42%
Feminino	21	58%
<b>Faixa Etária</b>		
15-19	2	6%
20-29	5	14%
30 -39	8	22%
40-49	13	36%
50-59	4	11%
60-69	3	8%
≤70	1	3%
<b>Idade Agrupada</b>		
≤40	15	42%
≥39	21	58%



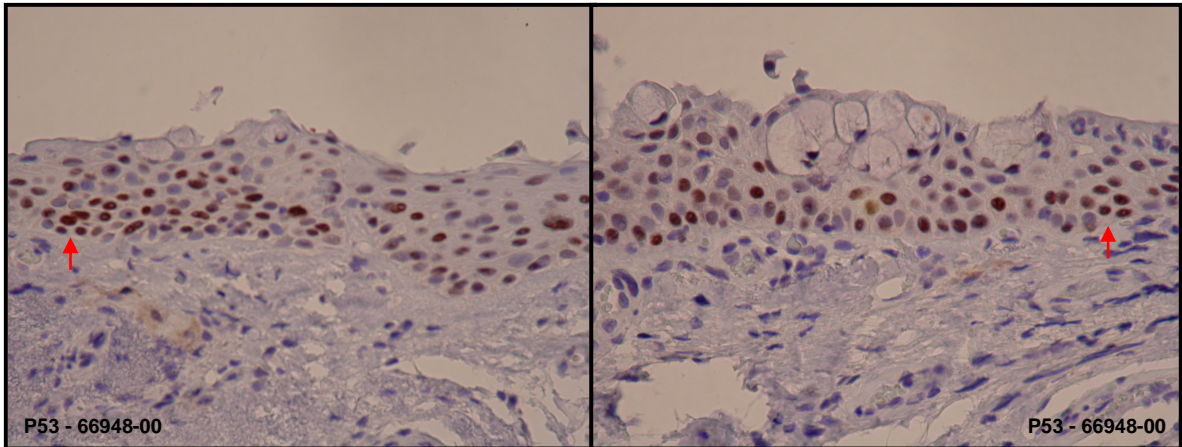
A Imunohistoquímica para detecção da proteína p53 apresentou-se positiva em 14 pacientes (39%) e negativa em 22 pacientes (62%). O índice de imunodeteção variou entre 05 e 90% de células marcadas sendo que 13 (93%) casos apresentaram <50% e 01 (7%) >50% de células marcadas. O cutoff de  $\geq 10\%$  de células marcadas foi encontrado em 39% (14/36) dos casos analisados. As figuras abaixo (7, 8, 9, 10 e 11) demonstram alguns casos.



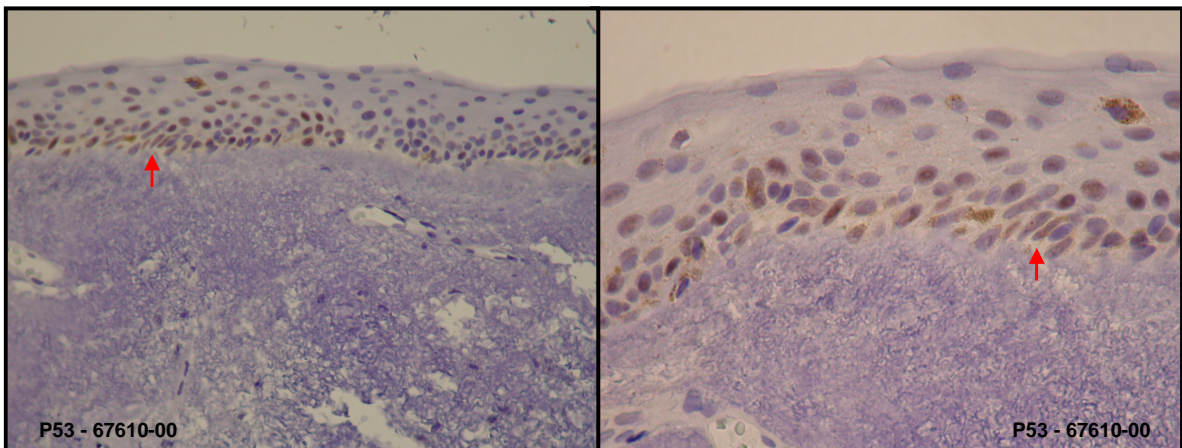
**Figura 7.** Fotomicrografia mostrando corte histológico de pterígio, caso 66936-00 feminino, com imunoposição positiva de p53 em 10% das células epiteliais. Fonte: Pinto, SA.



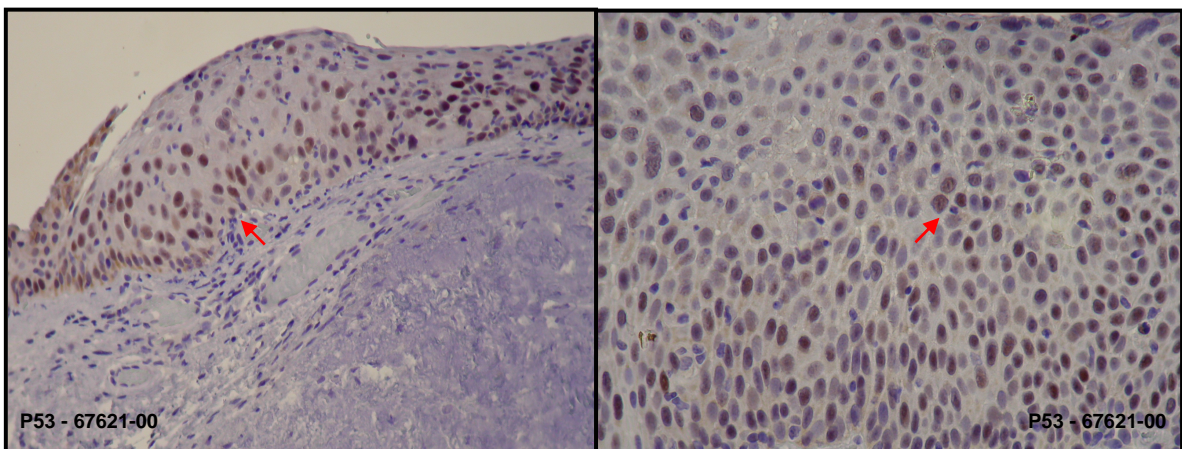
**Figura 8.** Fotomicrografia mostrando corte histológico de pterígio, caso 67619-00 masculino, com imunoposição positiva de p53 em 25% das células epiteliais. Fonte: Pinto, SA.



**Figura 9.** Fotomicrografia mostrando corte histológico de pterígio, caso 66948-00 masculino, com imunoposição positiva de p53 em 25% das células epiteliais. Fonte: Pinto, SA.



**Figura 10.** Fotomicrografia mostrando corte histológico de pterígio, caso 67610-00 feminino, com imunoposição positiva de p53 em 15% das células epiteliais. Fonte: Pinto, SA.



**Figura 11.** Fotomicrografia mostrando corte histológico de pterígio, caso 67621-00 masculino, com imunoposição positiva de p53 em 90% das células epiteliais. Fonte: Pinto, SA.

A análise molecular da frequência alélica do polimorfismo do codon 72 apresentou a distribuição descrita na Tabela 3.

**Tabela 3.** Distribuição dos genótipos nos grupos analisados e a frequência alélica.

<b>Genótipo <i>TP53</i></b>	<b>Caso</b>	<b>Controle</b>
	n (f)	n (f)
Arg/Arg	2 (6%)	2 (10%)
Arg/Pro	31 (86%)	12 (57%)
Pro/Pro	3 (8%)	7 (33%)
Total	36 (100%)	21 (100%)
Arginina	33 (46%)	14 (34%)
Prolina	34 (48%)	19 (46%)

De acordo com os dados, não houve diferença estatisticamente significativa entre os genótipos dos grupos caso e controle, apresentando ( $p \geq 0.05$ ).

A presença do HPV foi detectada em 59% casos (21/36) e 9,5% dos controles (2/21). Desses, no grupo caso, 43% apresentaram o tipo HPV-1 (9/21); 34% apresentaram o tipo HPV-2 (7/21) e 23% apresentaram os dois tipos simultaneamente (5/21), ambos de baixo risco oncogênico. Já no grupo controle foi detectado o tipo HPV-16 nas 02 amostras de alto risco oncogênico.

A presença concomitante da imunodeteção, do genótipo do codon 72 e HPV foi observada em 25% (9/36) do grupo caso.

**Tabela 4.** Dados do grupo caso em relação as variáveis analisadas.

TP53	IH+	IH-	HPV+	HPV-	IH+ e HPV+	IH+ e HPV-	IH- e HPV+	IH- e HPV-
Pro-Arg	12 (86%)	19 (87%)	19 (90%)	12 (80%)	9 (100%)	3 (60%)	10 (84%)	9 (90%)
Pro-Pro	1 (7%)	2 (9%)	1 (5%)	2 (14%)	0 (0%)	1 (20%)	1 (8%)	1 (10%)
Arg-Arg	1 (7%)	1 (4%)	1 (5%)	1 (6%)	0 (0%)	1 (20%)	1 (8%)	0 (0%)
<b>TOTAL</b>	<b>14</b>	<b>22</b>	<b>21</b>	<b>15</b>	<b>9</b>	<b>5</b>	<b>12</b>	<b>10</b>

IH+ imunohistoquímica positiva; IH- imunohistoquímica negativa

Para verificar se os resultados poderiam estar relacionados ao risco de desenvolver o pterígio, foi aplicado o teste Odds Ratio.

**Tabela 5.** Resultado do Teste de Odds Ratio no grupo caso.

<b>Imunodeteccção</b>	<b>P53 +</b>	<b>P53 –</b>
<b>Histologia</b>		
Displasia	1/36 (3%)	0/36 (0%)
Pterígio	13/36 (36%)	22/36 (61%)
TOTAL	14/36 (39%)	22/36 (61%)

OR= 0,933

<b>Genótipo</b>	<b>Arginina</b>	<b>Prolina</b>
Casos	32/72 (48%)	34/72 (52%)
Controle	16/42 (40%)	24/42 (60%)
TOTAL	48/114 (43%)	58/114 (51%)

OR= 1,411

## DISCUSSÃO

O mecanismo que dispara o início do desenvolvimento do pterígio permanece desconhecido, mas sabe-se que há uma interação multifatorial entre a exposição à luz UV, o polimorfismo do codon 72, a presença do HPV e outros fatores (Ichihashi et al., 2003; Ateenyi-Agaba et al., 2004).

Estudos epidemiológicos indicam que a exposição crônica ao sol, provavelmente UV-B, é um dos fatores mais importantes no desenvolvimento do pterígio. Esta hipótese é apoiada por modificações histopatológicas que compartilham características comuns com a pele danificada pelos raios UV. Vários aspectos do melanoma maligno cutâneo parecem-se com processos que caracterizam o pterígio (Wong et al., 2001; Nolan et al., 2003).

O pterígio mostra-se prevalente em populações das faixas equatorial e tropical e, principalmente em trabalhadores que ficam expostos ao ar livre (Nwosu, 1998). Os efeitos prejudiciais da luz UV podem ser diretos devido ao efeito fototóxico ou indireto por estresse oxidativo, causando danos nas células (Di Girolamo et al., 2000; 2002). Baseado nessa premissa Tsai et al., (2005) demonstraram a presença de 8-OHdG (8-hydroxydeoxyguanosine) que é um marcador de estresse oxidativo, fornecendo evidências importantes no desenvolvimento de pterígio além de alterações em outros genes importantes na detoxificação de xenobióticos como a glutathione-S-transferase (GST) (Tsai et al., 2004 a; Kau et al., 2006).

Atualmente, o desenvolvimento do pterígio foi associado à mutação de células germinativas límbicas, como o polimorfismo do codon 72 do gene *TP53*, induzido por radiação solar. Estas células alteradas exibem um fenótipo mais

agressivo porque invadem a córnea normal e expressam diversas metaloproteinases (MMPs), quando comparadas com células normais da conjuntiva, limbo e córnea (Schellini et al., 2006). O crescimento superficial destas células, que se confundem com células normais da superfície ocular, pode explicar as recorrências evidenciadas mesmo após ampla exérese da lesão.

Alterações no gene *TP53* são freqüentemente identificadas nas neoplasias (Klumb e Cavalcanti Júnior, 2002). O HPV infecta as células epiteliais e causa, na maior parte das vezes, proliferações epiteliais benignas na pele e mucosas. Porém, em alguns casos, estas alterações podem ser malignas pelo efeito carcinogênico de alguns subtipos de HPV. A carcinogênese pelo HPV, resulta da expressão de dois genes virais, E6 e E7 que interferem com a função das proteínas Rb e p53 da célula hospedeira. A proteína E6 estimula a degradação da proteína p53 que são consideradas críticas para o desenvolvimento de tumores, uma vez que essa proteína está relacionada ao controle do ciclo celular, principalmente ao induzir apoptose quando ocorre alguma alteração nuclear.

Nossos dados e de outros autores (Varinli et al., 1994; Dushku and Reid, 1997; Tan et al., 1997; Onur et al., 1998; Dushku et al., 1999; Tan et al., 2000; Chowers et al., 2001; Ueda et al., 2001; Marcovich et al., 2002; Perra et al, 2002; Weinstein et al., 2002; Perra et al, 2006; Schneider et al, 2006) mostram que é possível detectar por Imunohistoquímica a p53 em amostras de pterígio. O anticorpo e o cutoff de 10% de células coradas foram os mesmo utilizados por Weinstein et al., (2002) e Tsai et al., (2005 b); entretanto, a proporção de amostras positivas foi diferente. Nós encontramos 39% positivas e esses dois autores relatam 53,8% e 22,8%, respectivamente. Uma provável explicação para tal fato é que a freqüência de mutações no gene *TP53* varia entre as

raças/populações estudadas (Beroud e Soussi, 2003) e nosso país é muito miscigenado. Para suportar tal hipótese Ueda et al., (2001) demonstraram que a incidência de células imunoreativas para p53 é relacionada a diferenças no desenvolvimento do pterígio de acordo com a raça/população como também a fatores ambientais. Weinstein et al., (2002) sugerem que a radiação UV pode ser a causa da mutação em p53 no pterígio que pode se tornar hereditário. Detorakis et al., (2000) propõe dois modelos para as anormalidades relacionadas ao pterígio. O primeiro pode ser através da radiação UV e o segundo pode ser causado pela infecção viral juntamente com a exposição à luz solar.

Analizamos o polimorfismo do codon 72 do gene *TP53* por ser um marcador (*SNP - single nucleotide polymorphism*) muito utilizado na identificação de tumores (Kwok e Gu, 1999; Hussein, 2005). Observamos que 31 (86%) amostras foram heterozigotas, 03 (8%) foram homozigotas para o alelo prolina e 02 (6%) foram homozigotas para o alelo arginina no grupo de pterígio, enquanto que no grupo controle foi observado 12 (57%) heterozigotos, 07 (33%) homozigotos para o alelo prolina e 02 (10%) homozigotos para o alelo arginina. Porém, não houve diferença significativa entre os grupos analisados.

O gene *TP53* é um supressor de tumor e o polimorfismo no codon 72 tem sido associado a vários tumores (Nigro et al., 1989). Em células normais sem estresse, a proteína p53 apresenta meia-vida curta e é mantida em níveis baixos, não detectáveis. Mutações nesse gene são associadas com o aumento da instabilidade da proteína, tornando-a detectável na Imunohistoquímica. A radiação UV pode causar mutações tais como as conhecidas nesse gene e devido à expressão anormal no pterígio, fornece evidências de hereditariedade e fatores



que podem estar envolvidos na formação do pterígio, levando a sugerir uma correlação entre o pterígio e o polimorfismo de *TP53* (Reisman et al., 2004).

Nossos resultados confirmam que o HPV pode ser detectado em amostras de pterígio e conjuntiva, mas esse estudo não mostrou associação. Os tipos 01 e 02 encontrados no grupo de pterígio e o tipo 16 no grupo controle podem estar envolvidos na patogênese desta lesão (Dolmetsch et al., 1996; Zur Hausen, 1996; Detorakis et al. 2001). Carcinomas conjuntivos têm sido associados à infecção concomitante por HPV (Varinli et al., 1994). Papilomas conjuntivos tendem a recorrência após a excisão e tal recorrência pode refletir uma infecção viral persistente (Gallagher et al., 2001). O mesmo ocorre no pterígio, que tende a recorrer após a excisão apresentando uma taxa de 46% de reincidência (Tsai et al., 2005 c). Esta observação nos leva a sugerir que o HPV esteja envolvido na patogênese desta lesão. Portanto, o HPV tem um papel na recorrência do pterígio e um tratamento antiviral pode ser usado no futuro para prevenir a possibilidade de recorrência devido ao HPV.

Embora a patogênese do pterígio ainda esteja incerta, a presença concomitante da expressão anormal da proteína p53, o polimorfismo do codon 72 e o HPV, suportam a hipótese que não somente a exposição à luz UV é requerida para sua formação. Isto sugere que diferentes estilos de vida, condições ambientais e fatores genéticos também contribuem para o desenvolvimento do pterígio. Assim sendo, novos estudos são necessários para fortalecer estas hipóteses e elucidar o pterígio incluindo um número maior de amostras e comparar diferentes populações/raças.

## CONCLUSÕES

- A imunodeteção de p53 pode estar relacionada à exposição solar aos raios UV;
- A radiação UV pode induzir o polimorfismo do gene *TP53* levando a instabilidade gênica celular;
- O HPV em amostras de pterígio pode estar relacionado à recorrência da patologia.

**REFERÊNCIAS**

1. Anyanwu E e Nnadozie JN. (1993). The frequency distribution of ocular disease by age in Imo State Nigeria. *J Am Optom Assoc.* 64: 704-708.
2. Ateenyi-Agaba C, Dai M, Le Calvez F, Katongole-Mbidde E, et al. (2004). TP53 mutations in squamous-cell carcinomas of the conjunctiva: evidence for UV-induced mutagenesis. *Mutagenesis.* 19: 399-401.
3. Bamshad M, Wooding S, Salisbury BA, Stephens JC. (2004). Deconstructing the relationship between genetics and race. *Nat Rev Genet.* 5: 598-608.
4. Beroud C e Soussi T. (2003). The UMD-p53 database: new mutations and analysis tools. *Hum Mutat.* 21: 176-81.
5. Buratto L, Phillips RL, Carito G. (2000). Pterygium surgery. Philadelphia: Slack. 125-142.
6. Chen KH, Hsu WM, Cheng CC, Li YS. (2003). Lack of human papillomavirus in pterygium of Chinese patients from Taiwan. *Br J Ophthalmol.* 87: 1046-1048.
7. Chowers I, Pe'er J, Zamir E, Livni N, et al. (2001). Proliferative activity and p53 expression in primary and recurrent pterygia. *Ophthalmology.* 108: 985-988.
8. Christov R, Forno EA, Campagna CM, Bechara SJ, et al. (1991). Análise histopatológica de pterígios primários e recidivados. *Rev Bras Oftalmol.* 50: 59-62.

9. Detorakis ET, Drakonaki EE, Spandidos DA. (2000). Molecular genetic alterations and viral presence in ophthalmic pterygium. *Int J Mol Med*. 6: 35-41.
10. Detorakis ET, Sourvinos G, Spandidos DA. (2001). Detection of herpes simplex virus and human papilloma virus in ophthalmic pterygium. *Cornea*. 20: 164-167.
11. Di Girolamo N, Kumar RK, Coroneo MT, Wakefield D. (2002). UVB-mediated induction of interleukin-6 and -8 in pterygia and cultured human pterygium epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 43: 3430-3437.
12. Di Girolamo N, McCluskey P, Lloyd A, Coroneo MT, et al. (2000). Expression of MMPs and TIMPs in human pterygia and cultured pterygium epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 41: 671-679.
13. Dolmetsch AM, Alcocer CE, Scull JJ, Martins MC, et al. (1996). The presence of human papilloma virus in pterygia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 37: S43.
14. Dushku N and Reid TW. (1997). P53 expression in altered limbal basal cells of pingueculae, pterygia, and limbal tumors. *Curr Eye Res*. 16: 1179-1192.
15. Dushku N, Hatcher SL, Albert DM, Reid TW. (1999). p53 expression and relation to human papillomavirus infection in pingueculae, pterygia, and limbal tumors. *Arch Ophthalmol*. 117:1593-1599.
16. Fernández-Contreras ME, Sarriá C, Nieto S, Lazo PA. (2000). Amplification of Human genomic sequences by human papillomavirus universal consensus primers. *J Virol Methods*. 87: 171-175.

17. Gallagher MJ, Giannoudis A, Herrington CS, Hiscott P. (2001). Human papillomavirus in pterygium. Is the virus a risk factor? *Br J Ophthalmol.* 85: 782-784.
18. Galvão TM, Fernandes TAAM, Bezerra CM, Meissner RV. (2007). Análise do polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição para MspI no íntron 6 do TP53 em pacientes com câncer do colo do útero. *RBAC.* 39: 251-253.
19. Garrido Neto T, Garrido C, Carvalho RC, Lima HC. (1996). Estudo da freqüência de pterígio em hospitais de Salvador e Manaus. *Rev Bras Oftalmol.* 55: 683-686.
20. Helt AM, Funk JO, Galloway DA. (2002). Inactivation of both the retinoblastoma tumor suppressor and p21 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is necessary to inhibit cell cycle arrest in human epithelial cells. *J Virol* 76: 10559-10568.
21. Hirst LW. (2003). The treatment of pterygium. *Surv Ophthalmol.* 48: 145-180.
22. Hussein MR (2005). Ultraviolet radiation and skin cancer: molecular mechanisms. *J Cutan Pathol.* 32: 191-205.
23. IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/7a12/mapas/mundo/planisferio\\_pol.pdf](http://www.ibge.gov.br/7a12/mapas/mundo/planisferio_pol.pdf) Acesso em: 14/08/2008
24. Ichihashi M, Ueda M, Budiyanto A, Bito T, et al. (2003). UV-induced skin damage. *Toxicology.* 189: 21-39.

25. ICTV – The universal virus database of the international committee on taxonomy of viruses. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/vis.html>. Acesso em: 28-07-2008.
26. Kau HC, Tsai CC, Lee CF, Kao SC, et al. (2006). Increased oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxy- guanosine, in human pterygium. *Eye*. 20: 826-831.
27. Klumb CE e Cavalcanti Júnior GB. (2002). Avaliação dos métodos de detecção das alterações do gene e proteína p53 nas neoplasias linfóides. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 24: 111-115.
28. Kwok PY e Gu Z. (1999). Single nucleotide polymorphism libraries: why and how are we building them? *Mol Med Today*. 5: 538-543.
29. Maeda L, Potério MB, Serpa JF, Alves MR, et al. (1996). Análise da relação entre a ocorrência de pterígio e dominância ocular. *Arq Bras Oftalmol*. 59: 511-513.
30. Marcovich AL, Morad Y, Sandbank J, Huszar M, et al. (2002). Angiogenesis in pterygium: morphometric and immunohistochemical study. *Curr Eye Res*. 25: 17-22.
31. Momand J, Wu HH, Dasgupta G. (2000). MDM2-master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene*. 242: 15-29.
32. Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, et al. (1989). Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature*. 342: 705-708.
33. Nolan TM, DiGirolamo N, Sachdev NH, Hampartzoumian T, et al. (2003). The role of ultraviolet irradiation and heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in the pathogenesis of pterygium. *Am J Pathol*. 162: 567-574.

34. Nwosu SN. (1998). Ocular problems of young adults in rural Nigeria. *Int Ophthalmol.* 22: 259-263.
35. Onur C, Orhan D, Orhan M, Dizbay Sak S, et al. (1998). Expression of p53 protein in pterygium. *Eur J Ophthalmol.* 8: 157-161.
36. Panchapakesan J, Hourihan F, Mitchell P. (1998). Prevalence of pterygium and pinguecula: the Blue Mountains Eye Study. *Aust N Z J Ophthalmol.* 26: S2-S5.
37. Park RB e Androphy EJ. (2002). Genetic analysis of high-risk E6 in episomal maintenance of human papillomavirus genomes in primary human keratinocytes. *J Virol.* 76: 11359-11364.
38. Perra MT, Maxia C, Corbu A, Minerba L, et al. (2006). Oxidative stress in pterygium: relationship between p53 and 8-hydroxydeoxyguanosine. *Mol Vis.* 12: 1136-1142.
39. Perra MT, Maxia C, Zucca I, Piras F, et al. (2002). Immunohistochemical study of human pterygium. *Histol Histopathol.* 17: 139-149.
40. Piras F, Moore PS, Ugalde J, Perra MT, et al. (2003). Detection of human papillomavirus DNA in pterygia from different geographical regions. *Br J Ophthalmol.* 87: 864-866.
41. Reid TW e Dushku N. (2003). Does human papillomavirus cause pterygium? *Br J Ophthalmol.* 87: 806-808.
42. Reisman D, McFadden JW, Lu G. (2004). Loss of heterozygosity and p53 expression in Pterygium. *Cancer Lett.* 206: 77-83.

43. Rivoire WA, Capp E, Corleta HVE, da Silva ISB. (2001). Bases biomoleculares da oncogênese cervical. *Rev Bras Canc.* 47: 179-184.
44. Saw SM e Tan D. (1999). Pterygium: prevalence, demography and risk factors. *Ophthalmic Epidemiol.* 6: 219-228.
45. Saw SM, Banerjee K, Tan D. (2000). Risk factors for the development of pterygium in Singapore: a hospital-based case-control study. *Acta Ophthalmol Scand.* 78: 216-220.
46. Schellini SA, Hoyama E, Oliveira DE, Bacchi CE, et al. (2006). Matrix Metalloproteinase-9 Expression in Pterygium. *Arq Bras Oftalmol.* 69: 161-164.
47. Schneider BG, John-Aryankalayil M, Rowsey JJ, Dushku N, et al. (2006). Accumulation of p53 protein in pterygia is not accompanied by TP53 gene mutation. *Exp Eye Res.* 82: 91-98.
48. Serracarbassa LL e Dantas MCN. (1999). Desordens degenerativas da conjuntiva, córnea e esclera. In: Lima ALH, Nishiwaki-Dantas MC, Alves MR. *Doenças externas oculares e córnea.* Rio de Janeiro, Cultura Médica, cap. 8, p.371-374.
49. Silva AMTC, Amaral MVT, Cruz AD. (2003). HPV e Câncer: O Papel do Papiloma Vírus Humano na Carcinogênese. *Biotechnol Cienc Desenvol.* 29: 48-54 b.
50. Silva AMTC. (2003). Análise epidemiológica, citogenética e molecular dos carcinomas de laringe e o papel do Papiloma Vírus Humano (HPV). Dissertação de mestrado em Biologia - ICB, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, a.



51. 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.
52. Skolnick CA e Grimmer MR. (2005). Management of Pterygium. In: Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ. *Cornea*. 2nd ed. Philadelphia: Elsevier Mosby. 1749-1761.
53. Solomon A e Tseng SCG. (2000). Amniotic transplantation in pterygium surgery. In: Buratto L, Phillips RL, Carito G. *Pterygium surgery*. Philadelphia: Slack. 143-56.
54. Spandidos DA, Sourvinos H, Kiaris H, Tsampanlakis J. (1997). Microsatellite instability and loss of heterozygosity in human pterygia. *Br J Ophthalmol.* 81: 493-496.
55. Tan DT, Lim AS, Goh HS, Smith DR. (1997). Abnormal expression of the p53 tumor suppressor gene in the conjunctiva of patients with pterygium. *Am J Ophthalmol.* 123: 404-405.
56. Tan DT, Tang WY, Liu YP, Goh HS, et al. (2000). Apoptosis and apoptosis related gene expression in normal conjunctiva and pterygium. *Br J Ophthalmol.* 84: 212-216.
57. Taylor, HR. (1980). The prevalence of corneal disease and cataracts in Australian aborigines in Northwestern Australia. *Aust N Z J Ophthalmol.* 8: 289-301.

58. Tsai YY, Chang KC, Lee H, Cheng YW, et al. (2005). Effect of p53 codon 72 polymorphism on p53 protein expression in pterygium. *Clin Experiment Ophthalmol.* 33: 60-62 c.
59. Tsai YY, Chang KC, Lin CL, Lee H, et al. (2005). p53 Expression in pterygium by immunohistochemical analysis: a series report of 127 cases and review of the literature. *Cornea.* 24: 583-586 a.
60. Tsai YY, Cheng YW, Lee H, Tsai FJ, et al. (2005). Oxidative DNA damage in pterygium. *Mol Vis.* 11:71-75.
61. Tsai YY, Cheng YW, Lee H, Tsai FJ, et al. (2005). P53 gene mutation spectrum and the relationship between gene mutation and protein levels in pterygium. *Mol Vis.* 11: 50-55 b.
62. Tsai YY, Cheng YW, Lee H, Tseng SH, et al. (2004). No association of p53 codon 72 and p21 codon 31 polymorphisms in Taiwan Chinese patients with pterygium. *Br J Ophthalmol.* 88: 975-976.
63. Tsai YY, Lee H, Tseng CHI, Cheng YI, et al. (2004). Null type of glutathione S-transferase M1 polymorphism is associated with early onset pterygium. *Mol Vis.* 10: 458-461, a.
64. Ueda Y, Kanazawa S, Kitaoka T, Dake Y, et al. (2001). Immunohistochemical study of p53, p21 and PCNA in pterygium. *Acta Histochem.* 103: 159-165.
65. Varinli S, Varinli I, Koksai Erkisi M, Doran F. (1994). Human papillomavirus in pterygium. *Cent Afr J Med.* 40: 24-26.

66. Weinstein O, Rosenthal G, Zirkin H, Monos T, et al. (2002). Overexpression of p53 tumor suppressor gene in pterygia. *Eye*. 16: 619-621.

67. Wong TY, Foster PJ, Johnson GJ, Seah SKL, et al. (2001). The prevalence and risk factors for pterygium in adult Chinese in Singapore: the Tanjong Pagar survey. *Am J Ophthalmol*. 131: 176-183.

68. Zur Hausen H. (1996). Papillomavirus infections: a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta*. 1288: 55-78.

69. Zur Hausen H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*. 2: 342-350.

## **ANEXOS**

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIMENTO

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, de uma pesquisa científica. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado de forma alguma. Em caso de dúvida você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Católica de Goiás pelos telefones 3946-1071.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título: Análise da expressão do gene *TP53*, polimorfismo do codon 72 e HPV em amostras de pterígio.

Coordenador Responsável: Dra. Katia Karina Verolli de Oliveira Moura

Telefones para contato: 3946-1385 e 3946-1442

Eu, abaixo qualificado, após ter sido esclarecido verbalmente e depois de ler o resumo do projeto realizado pelo Núcleo de Pesquisa Replicon da Universidade Católica de Goiás, declaro assumir, por espontânea vontade, livre de qualquer coação, a responsabilidade pela participação voluntária e gratuita, no grupo de pacientes integrantes da pesquisa. Estou ciente de que o trabalho consiste na análise molecular de amostras biológicas, e que os mesmos serão armazenados e utilizados em trabalhos posteriores mantendo o objetivo de complementar o diagnóstico.

DECLARO que compreendi que a obtenção das amostras citadas acontecerá sob minha total ciência, e sob os procedimentos adequados pela equipe responsável pela pesquisa, sem qualquer prejuízo a minha pessoa e que será mantido o total sigilo dos resultados, que serão entregues apenas a mim ou responsável.

Outrossim, tenho pleno conhecimento de que o material será utilizado apenas e tão somente para fins de pesquisa, além de autorizar, pelo presente, que os testes e os resultados sejam utilizados em estudos científicos, ressaltando o sigilo quanto ao meu nome, reservando-me o direito de conhecer ou não os resultados da referida pesquisa.

- Nome do pesquisador:

\_\_\_\_\_

- Assinatura do paciente:

\_\_\_\_\_

- Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, \_\_\_\_\_, RG nº. \_\_\_\_\_,  
CPF nº. \_\_\_\_\_, nº. de prontuário \_\_\_\_\_, abaixo  
assinado, concordo em participar no projeto: Análise da expressão do gene *TP53*,  
polimorfismo do codon 72 e HPV em amostras de pterígio, como sujeito. Fui  
devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador sobre a pesquisa, os  
procedimentos envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios  
decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu  
consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou  
interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento.

Local e data: \_\_\_\_\_

Pesquisador: \_\_\_\_\_

Assinatura do sujeito ou responsável: \_\_\_\_\_

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa  
e aceite do sujeito em participar.

Testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Observações complementares:

Análise da expressão do gene TP53, polimorfismo do codon 72 e HPV em amostras de pterígio

Nome: \_\_\_\_\_

Ficha de inscrição (BANCO DE OLHOS): \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_

Sexo: ( ) masculino ( ) feminino

Cor: ( ) Branco ( ) Negra ( ) Amarela

Outros:.....

Nível de escolaridade:

( ) sem escolaridade ( ) 2 grau completo ( ) pós-graduação

( ) 1 grau completo ( ) 2 grau incompleto

Outros:.....

( ) 1 grau incompleto ( ) nível superior :

Você tem alguma dessas doenças abaixo relacionadas:?

Pressão Alta ( ) Diabetes ( ) Enxaqueca ( ) Má circulação ou varizes ( )

Pressão Baixa ( ) Problemas no coração ( ) Qual? \_\_\_\_\_

Outras doenças: \_\_\_\_\_

Você tem alguém na família com problema ocular?

( ) sim ( ) não ( ) não sei

Se a resposta for sim, qual é o grau de parentesco e qual a patologia?

\_\_\_\_\_.

Qual a sua profissão? Há quanto tempo a exerce?

\_\_\_\_\_

Você fuma?



Sim: ( ) Não : ( ) As vezes : ( )

Se a resposta for sim ou às vezes, quantos cigarros dias você fuma?

\_\_\_\_\_

Há quanto tempo você fuma? \_\_\_\_\_

Você ingere bebida alcoólica?

Sim ( ) Não ( ) As vezes ( )

Se a resposta for sim ou às vezes, quantos dias da semana você ingere bebidas alcoólicas?

\_\_\_\_\_

Você ingere carne?

Sim ( ) Não ( ) As vezes ( )

Se a resposta for sim ou às vezes, quantos dias da semana você ingere carne?

\_\_\_\_\_

Você pratica algum esporte ou atividade física?

Sim ( ) Não ( ) As vezes ( )

Se a resposta for sim ou às vezes, quantos dias da semana você pratica e qual é atividade que você faz?

\_\_\_\_\_

Assinatura do paciente:

\_\_\_\_\_

Análise da expressão do gene *TP53*, polimorfismo do codon 72 e HPV em  
amostras de pterígio

Nome: \_\_\_\_\_ Ficha Nº \_\_\_\_\_

Acuidade visual sem correção: \_\_\_\_\_

Acuidade visual com correção: \_\_\_\_\_

Quanto tempo de evolução da patologia: \_\_\_\_\_

Medicação atual: \_\_\_\_\_

Colírio (s): \_\_\_\_\_

Cirurgia ocular prévia: \_\_\_\_\_

Refração: OD: \_\_\_\_\_

OE: \_\_\_\_\_

Tonometria: OD: \_\_\_\_\_

OE: \_\_\_\_\_

Biomicroscopia: OD: \_\_\_\_\_

OE: \_\_\_\_\_

Fundoscopia: OD: \_\_\_\_\_

OE: \_\_\_\_\_

Classificação do pterígio \_\_\_\_\_

Observações: \_\_\_\_\_

Médico responsável: \_\_\_\_\_

Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

**Tabela Geral com todos os dados referentes ao grupo de estudo – Pterígio.**

AMOSTRA	Nº BLOCO	SEXO	IDADE	IH	PROLINA	ARGININA	GP5/6	HPV Tipo	OBS.
1	7277-06	M	35	10%	+	+	+	1 e 2	jovem, IH+, heterozigoto, HPV 1 e 2
2	7742-06	F	59	0%	+	+	-	-	idoso, heterozigoto
3	7282-06	F	49	5%	+	-	-	-	idoso, homozigoto Prolina
4	7740-06	F	46	0%	+	+	-	-	idoso, heterozigoto
5	7279-06	F	18	5%	+	+	-	-	jovem, heterozigoto
6	7285-06	F	59	15%	-	+	-	-	idoso, IH+, homozigoto Arginina
7	10098-06	F	69	10%	+	-	-	-	idoso, IH+, homozigoto Prolina
8	7741-06	M	57	5%	+	+	-	-	idoso, heterozigoto
9	7732-06	M	68	0%	+	+	-	-	idoso, heterozigoto
10	7738-06	M	39	0%	+	+	-	-	jovem, heterozigoto
11	7288-06	M	69	5%	+	+	+	1	idoso, heterozigoto, HPV 1
12	7286-06	M	49	20%	+	+	-	-	idoso, IH+, heterozigoto
13	10097-06	F	46	0%	+	+	-	-	idoso, heterozigoto
14	7293-06	F	49	15%	+	+	+	2	idoso, IH+, heterozigoto, HPV 2
15	10095-06	M	48	10%	+	+	-	-	idoso, IH+, heterozigoto
16	7736-06	M	44	25%	+	+	+	1 e 2	idoso, IH+, heterozigoto, HPV 1 e 2
17	7290-06	F	38	0%	+	+	+	1	jovem, heterozigoto, HPV 1
18	7283-06	M	39	15%	+	+	+	2	jovem, IH+, heterozigoto, HPV 2
19	10099-06	F	49	10%	+	+	+	1	idoso, heterozigoto, HPV 1
20	7289-06	M	48	10%	+	+	-	-	idoso, heterozigoto
21	7291-06	F	47	0%	+	-	+	2	idoso, homozigoto Prolina, HPV 2
22	7733-06	F	43	5%	+	+	+	1	idoso, heterozigoto, HPV 1

23	7739-06	M	19	0%	+	+	+	+	+	2	jovem, heterozigoto, HPV 2
24	7734-06	F	27	15%	+	+	+	+	+	1	jovem, heterozigoto, HPV 1
25	7743-06	F	28	5%	+	+	+	+	+	1	jovem, heterozigoto, HPV 1
26	7280-06	F	47	5%	+	+	+	+	+	2	idoso, heterozigoto, HPV 2
27	7287-06	M	38	5%	-	+	+	+	+	2	jovem, homozigoto Arginina, HPV 2
28	7284-06	F	37	0%	+	+	+	+	+	1	jovem, heterozigoto, HPV 1
29	7278-06	F	27	10%	+	+	+	+	+	1	jovem, IH+, heterozigoto, HPV 1
30	7292-06	M	57	30%	+	+	+	+	+	1 e 2	idoso, IH+, heterozigoto, HPV 1 e 2
31	7735-06	M	71	90%	+	+	+	+	+	1 e 2	idoso, IH+, heterozigoto, HPV 1 e 3
32	10096-06	F	46	0%	+	+	+	+	-	-	idoso, heterozigoto
33	7294-06	F	25	5%	+	+	+	+	-	-	jovem, heterozigoto
34	7737-06	F	39	0%	+	+	+	+	+	2	jovem, heterozigoto, HPV 2
35	7740-06	M	29	0%	+	+	+	+	+	1	jovem, heterozigoto, HPV 1
36	7281-06	F	39	5%	+	+	+	+	+	1 e 2	jovem, heterozigoto, HPV 1 e 2