Universidade de São Paulo
Faculdade de medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Patologia e Medicina Legal

Estudo da frequência de infecção pelo vírus do papiloma humano (hpv) e da expressão de p16 e p53 nas neoplasias intraepiteliais e no carcinoma invasivo da superfície ocular

Carolline Fontes Alves Mariano

RIBEIRÃO PRETO

2018

Carolline Fontes Alves Mariano

Estudo da frequência de infecção pelo vírus do papiloma humano (hpv) e da expressão de p16 e p53 nas neoplasias intraepiteliais e no carcinoma invasivo da superfície ocular

VERSÃO CORRIGIDA. A VERSÃO ORIGINAL ENCONTRA-SE DISPONÍVEL
TANTO NA BIBLIOTECA DA UNIDADE QUE ALOJA O PROGRAMA, QUANTO NA
BIBLIOTECA DIGITAL DE TESES DISSERTAÇÕES DA USP (BDTD)

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Mestre
em ciências.

Área de Concentração: Patologia
Orientador: Prof. Dr. Fernando Chahud

RIBEIRÃO PRETO

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total e parcial deste trabalho, por quaisquer meios convencionais ou eletrônicos, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

Mariano, Caroline Fontes Alves

Estudo da frequência de infecção pelo vírus do papiloma humano (hpv) e da expressão de p16 e p53 nas neoplasias intraepiteliais e no carcinoma invasivo da superfície ocular

Ribeirão Preto, SP. 2018.

69p. : il. ; 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto USP. Área de concentração: Patologia Experimental.

Orientador: Chahud, Fernando.

1. Carcinoma espinocelular. 2. conjuntiva. 3. HPV
4. p53. 5. P16.

Nome: MARIANO, Caroline Fontes Alves

Título: Estudo da frequência de infecção pelo vírus do papiloma humano (hpv) e da expressão de p16 e p53 nas neoplasias intraepiteliais e no carcinoma invasivo da superfície ocular

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para a obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de Concentração: Patologia

Aprovada: 23 de março de 2018.

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof^a.Dr^a. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho à minha família, em especial minha mãe Oclésia, por dedicar sua vida a mim, sempre me ensinando os valores da honestidade, respeito, humildade e integridade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

À minha amada mãe Oclésia Alves dos Santos, sempre presente e me apoiando e motivando em todas as fases de minha vida, agradeço carinhosamente porque dia após dia, tem sido a minha força pois nunca me deixa desistir e sempre me ajuda a alcançar meus objetivos, inclusive a minha ingressão ao mestrado. Devo a ela tudo que sou, tudo que tenho e tudo que venha a ter.

Minha gratidão especial ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Chahud pelo seu incentivo e dedicação, deixando inúmeras vezes de lado seus momentos de descanso para me orientar. Agradeço pela sua paciência e enorme capacidade para ensinar. Principalmente por ter acreditado e depositado sua confiança em mim desde o início, pois sem ele, nada disso seria possível, e, sobretudo ainda pela pessoa admirável e grande profissional que é.

A minha querida e estimada Dayane, agradeço incondicionalmente por todos os momentos ao meu lado, pela atenção, principalmente nos momentos mais complexos, sempre me fazendo acreditar que chegaria ao final desta difícil, porém gratificante etapa. Sou grata por todas as horas de conversa, por todas as vezes que me ajudou em minhas dificuldades e pelo apoio e força, pois quando eu quero jogar tudo para o alto e desistir, você me dá o ânimo que eu preciso para continuar.

Agradeço imensamente aos amigos do Departamento de Patologia, em especial aos que estão presentes diariamente comigo no laboratório, por toda a ajuda e colaboração.

À Capes, pelo apoio financeiro, que proporcionou a realização desse trabalho.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar, mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Anjezë Gonxhe Bojaxhiu

Mariano, C. F. A. **ESTUDO DA FREQUÊNCIA DE INFECÇÃO PELO VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO (HPV) E DA EXPRESSÃO DE p16 e p53 NAS NEOPLASIAS INTRAEPITELIAIS E NO CARCINOMA INVASIVO DA SUPERFÍCIE OCULAR, 2018.** Dissertação. Departamento de Patologia e Medicina Legal – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2018.

RESUMO

A neoplasia escamosa da superfície ocular constitui é uma das lesões mais frequentes que envolve a conjuntiva ou a córnea e tem como principais fatores de risco a exposição solar (radiação ultravioleta), a infecção pelo vírus do papiloma humano (HPV) e os estados de imunodeficiência, especialmente a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Em suas formas mais avançadas, a neoplasia pode cursar com infiltração do globo ocular, da órbita e, mais raramente, com ocorrência de metástases para linfonodos ou a distância. O presente estudo teve como objetivo investigar os dados clínicos, histopatológicos, a presença de HPV e a expressão das proteínas p16 e p53 em 45 casos de neoplasia escamosa da superfície ocular diagnosticados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, no período de 2005-2015. Avaliação histopatológica das lesões, estudo imuno-histoquímico para a detecção das proteínas e hibridização *in situ* cromogênica (CISH) para a detecção do DNA de HPV de alto e baixo grau foram realizados em todas as amostras. As lesões foram mais frequentes em homens de cor branca, com idade superior a 40 anos. A avaliação histopatológica revelou 31 casos (69%) de carcinoma invasivo e 14 casos (31%) de carcinoma *in situ*. Em 6 casos (13%) foi detectado DNA de HPV de alto grau por CISH. A frequência de expressão de proteínas p53 e p16 foi alta nas lesões, 89% e 53%, respectivamente. Em nosso estudo, a neoplasia escamosa da superfície ocular predomina em homens de cor branca, com idade acima dos 40 anos, com presença de HPV de alto grau em 13% dos casos. A expressão de p16 não apresentou um valor preditivo positivo alto quanto a possibilidade de associação com o vírus.

Palavras-chave: Carcinoma espinocelular, conjuntiva, HPV, p16, p53.

Mariano, C. F. A. **STUDY OF THE FREQUENCY OF HUMAN PAPILLOMA VIRUS (HPV) INFECTION AND EXPRESSION OF p16 AND p53 IN INTRAEPITHELIAL NEOPLASIAS AND INVASIVE SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF THE OCULAR SURFACE, 2018.** Dissertation. Department of Pathology and Legal Medicine - Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, 2018

ABSTRACT

Ocular surface squamous neoplasia (OSSN) is one the most frequent lesions involving the conjunctiva or cornea and its main risk factors are solar exposure (ultraviolet radiation), human papilloma virus (HPV) infection and immunodeficiency states, especially human immunodeficiency virus (HIV) infection. In advanced cases one can observe eyeball or orbital infiltration and, rarely, lymph node or distant metastases. The present study aimed to investigate the clinical and histopathological data, as well as the presence of HPV and the expression of proteins p16 e p53 in 45 cases of OSSN diagnosed at the Clinics Hospital of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, from 2005 through 2015. Histopathological examination, immunohistochemical study for proteins p16 and p53, and chromogenic in situ hybridization (CISH) for low and high grade HPV were performed in all samples. Lesions were more frequent in white males, above 40 years old. Histopathological examination revealed 31 cases (69%) of invasive carcinoma and 14 cases (31%) of carcinoma *in situ*. In 6 cases (13%) high grade HPV was detected by CISH. The expressions of p53 and p16 were high, 89% and 53%, respectively. In our study, increased incidence of OSSN was observed in white males, above 40 years old, with high grade HPV in 13% of the cases. The expression of p16 did not show a high positive predictive value for HPV positivity in OSSN.

Palavras-chave: Squamous cell carcinoma, conjunctiva, HPV, p16, p53.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação esquemática do globo ocular e anexos oculares	20
Figura 2- Aspecto normal da conjuntiva com representação do epitélio e da lamina própria (H&E, 40X)	21
Figura. 3- Esquema representativo do genoma do HPV-16 com as suas diferentes regiões (Smith et al., 2011).	277
Figura 4- Correlação entre o programa de diferenciação celular e o ciclo de vida de HPV (Fonte: Stubenrauch & Laimins, 1999).....	31
Figura. 5 - Representação esquemática do ciclo celular com seus pontos de restrição (Fonte: Elsevier Science, 2002).....	34
Figura 6- Carcinoma de células escamosas, invasivo da conjuntiva (H&E, 200X) ..	47
Figura 7 - Positividade nuclear difusa para p53 em carcinoma conjuntival (imunohistoquímica, 40X).....	Erro! Indicador não definido. 48
Figura 8- Positividade nuclear difusa para p16 em carcinoma conjuntival.....	49
Figura 9- Positividade da neoplasia para HP de alto grau (CISH, 400X)	50

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Funções das principais proteínas do HPV (Fonte: Boulet et al., 2007).....29

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Representação esquemática da distribuição dos casos, segundo o gênero (n=45).....	44
Gráfico 2- Distribuição da neoplasia de acordo com a cor da pele (n=45)	44
Gráfico 3- Distribuição das neoplasias segundo a faixa etária (n=45).....	45
Gráfico 4- Presença ou não de comorbidades em pacientes com diagnóstico de OSSN (n=45).....	45
Gráfico 5- Distribuição da OSSN segundo a lateralidade da lesão (n=45)	46
Gráfico 6- Carcinoma de células escamosas, invasivo da conjuntiva.....	47
Gráfico 7- Frequência de positividade da proteína p53 em OSSN (n=45)	48
Gráfico 8- Frequência de positividade das OSSN para p16 (n=45)	49
Gráfico 9 – Casos positivos e negativos do HPV das amostras de OSSN.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OSSN Neoplasia escamosa da superfície ocular

CIN Neoplasia intra-epitelial conjuntival

SCC Carcinoma de células escamosas

UV Ultravioleta

HIV Vírus da imunodeficiência humana

HPV Vírus do papiloma humano

CEC carcinoma espinocelular

EBV Vírus de Epstein-Barr

CDK quinase dependente de ciclina

pRB proteína do retinoblastoma

CISH hidridização *in situ* cromogênica

H&E hematoxilina & Eosina

EDTA etilenodiaminotetracético

PBS Tampão fosfato-salino

BSA Albumina do soro bovino

HRP horseradish peroxidase polymer

DAB 3,3' diaminobenzidina

INCA Instituto Nacional do Câncer

OMS Organização Mundial da Saúde

IARC International Agency for Research on Cancer

DST Doença Sexualmente Transmissível

USP Universidade de São Paulo

SERPAT Serviço de Patologia

FMRP Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

LISTA DE SÍMBOLOS

μm	micrômetro
ml	mililitros
n	número
%	porcento

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Anatomia do Globo Ocular	16
1.2	Anatomia dos Anexos Oculares	20
1.3	Neoplasia escamosa da superfície ocular (OSSN)	22
1.4	Fatores de risco para o desenvolvimento da OSSN	24
1.5	Considerações gerais sobre o vírus do papiloma humano (HPV)	25
1.6	Organização genômica e proteínas do HPV	27
1.7	Processo de infecção da célula pelo HPV	30
1.8	Epidemiologia e formas de transmissão	32
1.9	Mecanismos genéticos que levam ao tumor na conjuntiva (mutações nos genes TP 53 e p16)	33
2	JUSTIFICATIVA	37
3	OBJETIVOS	38
4	ASPECTOS ÉTICOS	39
5	MATERIAIS E MÉTODOS	40
5.1	Confecção de lâminas histológicas para as técnicas de Imuno- histoquímica e Hibridização in situ cromogênica (CISH)	41
5.2	Técnica de Imuno-histoquímica	41
5.3	Hibridização in situ cromogênica (CISH)	42
5.4	Análise Estatística	43
6	RESULTADOS	44
7	DISCUSSÃO	51
8	CONCLUSÕES	54
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
	ANEXO I – QUESTIONÁRIO CLÍNICO	63
	ANEXO II - PROTOCOLO ZYTOFAST PLUS - CISH IMPLEMENTATION KIT HRP-DAB (ZYTOVISION)	64
	ANEXO III – PARECER DE APROVAÇÃO	68

1 INTRODUÇÃO

De acordo com Carpes e colaboradores (2013), a visão consiste em cerca de 75% de nossa percepção, sendo decorrente de operações óticas, químicas e nervosas. O órgão responsável pela captação da informação visual e transformá-la em impulsos que são decodificados pelo sistema nervoso central é o globo ocular, instrumento altamente individualizado e suavemente coordenado, de modo que cada uma de suas estruturas possui a função de papel específico na transformação da luz, resultando na visão.

O sistema óptico permite a chegada da luz do meio externo até a retina e a sensibilização desta converte a luz em impulsos elétricos que são transportados através do nervo ótico até o córtex cerebral (Gregory, 1979).

1.1 Anatomia do Globo Ocular

O globo ocular localiza-se no interior da órbita, mais próximo da parede lateral do que da medial e discretamente mais próximo da margem orbitária superior do que da inferior. Está constituído por três camadas teciduais que abrangem as câmaras anterior e posterior, o cristalino e o humor vítreo. A camada mais externa, denominada túnica fibrosa, é composta pela córnea, clara e transparente, e pela esclera, branca e opaca. Estes dois tecidos cartilaginosos proporciona um envelope elástico que mantém a forma do globo ocular. A camada média, conhecida como trato uveal, é formada pela íris, anteriormente, pela coroide, posteriormente, e pela porção intermediária chamada corpo ciliar. Pelo trato uveal passam os principais vasos sanguíneos e nervos do globo ocular, apresentando deste modo, função nutritiva. A camada mais interna, denominada retina, representa uma extensão do sistema nervoso central em razão de sua origem embriológica e estrutura. O estímulo de cones e bastonetes localizados na parte externa desta camada possibilitam a geração de estímulos elétricos e alterações fotoquímicas envolvidas na geração da resposta visual (Hogan, Alvarado, Weddell, 1971).

Anteriormente, na fissura interpalpebral, o epitélio corneano encontra-se separado do ar pelo filme lacrimal. Posteriormente, o endotélio da córnea é banhado pelo humor aquoso. Em sua porção periférica, a córnea funde-se à conjuntiva, episclera e esclera em uma área de transição denominada limbo. Nesta área, observa-se uma mudança gradual do tamanho, direção e arranjo das fibras colágenas da córnea, um aumento em espessura do epitélio, um desenvolvimento do tecido conectivo da conjuntiva e o desaparecimento da membrana de Descemet e da camada de Bowman. Com relação à sua inervação, há uma rica rede de fibras nervosas, predominantemente nos dois terços anteriores da córnea, formada por ramificações dos nervos ciliares longos, derivados da divisão oftálmica do nervo trigêmeo, que penetram no estroma corneano na região do limbo, a partir da esclera (Hogan, Alvarado, Weddell, 1971).

A esclera, que corresponde ao “branco do olho”, funde-se anteriormente com a córnea em uma zona de transição denominada limbo. Em sua porção posterior, a esclera apresenta área fenestrada, denominada *lamina crivosa*, que permite a passagem dos axônios que constituem o nervo óptico. No polo posterior, as fibras colágenas do terço externo da esclera fundem-se à dura-mater que recobre o nervo óptico. A superfície externa da esclera encontra-se em íntimo contato com um tecido conjuntivo frouxo denominado cápsula de Tenon. A superfície externa escleral proporciona também pontos de inserção para os músculos extraoculares.

Com relação à irrigação e inervação, há um número de canais que atravessam a esclera e possibilitam a passagem de artérias, veias e nervos para dentro e para fora do globo ocular. Estes canais são divididos em grupos anterior e posterior. O grupo anterior está formado por ramos das artérias ciliares anteriores e por ramos venosos dos plexos intraescleral e profundo que se unem ao plexo venoso episcleral. O grupo posterior está constituído pelas veias vorticosas e pelas artérias e nervos ciliares posteriores longos e ciliares posteriores curtos.

A episclera cobre a porção anterior da esclera, envolvendo vasos sanguíneos que a nutrem. É próximo ao limbo junto à conjuntiva bulbar e à cápsula de Tenon.

O limbo é a zona de transição entre córnea e esclera, possui vasos

sanguíneos (perilímbicos) que desempenham papel importante nos processos inflamatórios da córnea. Nesta região, encontra-se também, internamente, o canal de Schlemm que drena o humor aquoso da câmara anterior.

A cápsula de Tenon envolve a superfície externa da esclera, seguindo com as fáscias dos músculos extra-oculares, possuindo a função de apoio e regulando a direção da ação.

A parte interna do olho é formada pelo cristalino, humor aquoso e pelo corpo vítreo, divididos em 3 componentes chamados de: câmara anterior, câmara posterior e espaço vítreo. O globo ocular possui várias estruturas, tendo como importante função uma barreira protetora contra agentes externos, e no caso da córnea tendo a função de refração (Helene & Helene, 2011).

A íris faz parte do globo ocular e encontra-se protegida pela córnea, tendo como função controlar a entrada de luz no olho, assim como faz o diafragma de uma câmera fotográfica. A pupila cujo diâmetro varia entre 2,0 e 4,0 mm é a abertura para a entrada de luz que é controlada pela íris.

O corpo ciliar é subdividido em duas porções, a anterior chamada de *pars plicata* e a posterior, denominada *pars plana*. Os processos ciliares são os responsáveis pela formação do humor aquoso, dispondo de um músculo ciliar que é composto de fibras longitudinais, circulares e radiais que têm a capacidade de controlar a acomodação visual, ao modificar a forma do cristalino.

O humor aquoso, produzido nos processos ciliares por ultra-filtração e secreção ativa, preenche as câmaras anterior e posterior, e apresenta em sua composição, dentre outros elementos, glicose, oxigênio e aminoácidos que possuem a função de nutrir a córnea e o cristalino.

O cristalino serve também de padrão anatômico para divisão ocular nos segmentos anterior e posterior. É constituído por 65% de água, 35% de proteína e minerais. É responsável por cerca de um terço do poder refrativo ocular, destacando-se por sua individual capacidade de acomodação.

O corpo vítreo é composto por 99% de água, contendo fibras de colágeno e de ácido hialurônico, ambos contribuem para a consistência gelatinosa deste meio.

Compreende 2/3 do volume e do peso do olho, ocupando toda a cavidade posterior ao cristalino, chamado de espaço vítreo, tendo papel importante no amortecimento do globo ocular.

A retina recebe seu fornecimento de sangue pela camada coriocapilar da coróide e ramificações da artéria central da retina. Os vasos exibem endotélio sem fenestrações, propriedade importante para a manutenção da barreira hemato-retiniana.

A coróide possui vasos que formam a camada coriocapilar, responsável pela irrigação da parte externa da retina. Separando a coróide da retina encontra-se a membrana de Bruch.

O nervo óptico está constituído por cerca de 1 milhão de axônios das células ganglionares da retina, surge nasalmente no polo posterior do olho, atingindo a cavidade craniana por meio do canal óptico, junto ao nervo óptico contralateral, formando o quiasma óptico.

As pálpebras superior e inferior são finas camadas de pele e músculo que cobrem os olhos, fechando rapidamente como reflexo e tendo também como função a formação de uma barreira mecânica com intuito de proteger o olho de objetos estranhos, sujeira, insetos e da luz muito intensa. Esse reflexo é ativado com a aproximação de um objetivo com a superfície do olho.

A conjuntiva é uma membrana mucosa que cobre as pálpebras posteriormente, refletindo para o globo ocular, formando o fórnice também chamado de fundo de saco, e estende-se até o limbo. Ela contém células caliciformes que são responsáveis pela secreção de mucina que contribui para a formação do filme lacrimal. A conjuntiva facilita a movimentação do globo ocular e proporcionando uma superfície lisa para que as pálpebras deslizem sobre a córnea. Também possui uma grande importância como barreira, servindo de proteção do contra microrganismos. Sua vascularização é predominantemente originada de ramos da artéria oftálmica, e sua inervação sensorial, mediada por ramos do nervo oftálmico, é reduzida em comparação à córnea (Junqueira & Carneiro, 2008).

A superfície ocular compreende importantes funções, fornecendo uma

camada externa lisa necessária para uma visão nítida, para a conservação da transparência óptica da córnea, necessária para a sua função refrativa. Trata-se de uma das poucas áreas do corpo que não está recoberta pela pele, sendo um meio de defesa extremamente importante infecções, ressecamento, traumas e toxinas (WANG *et al.*, 2008).

O trauma ou doença pode afetar a integridade de qualquer uma dessas funções protetoras levando a várias formas de disfunção da córnea ou da conjuntiva, diminuição da visão e cegueira definitiva na doença mais grave, deixando a superfície ocular instável (HOLLAND *et al.*, 2015).

1.2 Anatomia dos Anexos Oculares

Os anexos oculares são constituídos pelas pálpebras, conjuntiva, glândula lacrimal, sistema lacrimal de drenagem, músculos extraoculares, tecidos da órbita e nervo óptico. A figura 1 mostra um esquema com os diversos anexos oculares, observados em corte parasagital da órbita.

Figura 1: Representação esquemática do globo ocular e anexos oculares. Fonte: NETTER, Frank H.. Atlas de anatomia humana. 6ºd. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015)

A conjuntiva encontra-se formada por epitélio e tecido conjuntivo frouxo subjacente, denominado lamina própria, sendo estas estruturas separadas pela membrana basal do epitélio. Histologicamente, o epitélio conjuntival é estratificado, não-queratinizado, constituído por 2-4 camadas de células cuboides em sua maior parte, notando-se, na microscopia óptica, a presença de células caliciformes em meio às células do epitélio escamoso. A *lamina propria* da conjuntiva apresenta também células derivadas da medula óssea que formam o tecido linfoide associado à conjuntiva (CALT).

Mondal e colaboradores (2012) ainda ressaltam que a *lamina propria* da conjuntiva é composta por tecido conjuntivo frouxo cuja vascularização é feita pelas artérias ciliares anteriores e palpebrais. Além dos capilares e vasos linfáticos, a conjuntiva exhibe também veias de endotélio alto, responsáveis pelo controle da migração de células linfóides pela conjuntiva (Knop & Knop, 2000).

Os linfócitos e plasmócitos estão presentes na conjuntiva normal (Hingorani *et al.*, 1997). Estes tipos celulares fazem parte do tecido linfóide associado à conjuntiva (Duker & Yanoff, 2011). A figura 2 mostra o aspecto microscópico normal da conjuntiva humana.

Figura 2- Aspecto normal da conjuntiva com representação do epitélio e da *lamina propria* (H&E, 40X)

1.2 Neoplasias da conjuntiva

As neoplasias da conjuntiva podem ser formadas por células do epitélio conjuntival ou da *lamina propria*, podendo surgir como lesões benignas ou malignas (Slamovits, 1996; Vann, Karp, 1999).

Os tumores conjuntivais constituem um amplo grupo de neoplasias, incluindo-se lesões benignas, pré-malignas e malignas (Shields & Shields, 1999; Shields *et al.*, 2004).

Com base em dados de uma grande série com análise de 5.002 casos de tumores conjuntivais atendidos em um centro de tratamento terciário em oncologia ocular (Shields *et al.*, 2017), 52% dos casos eram lesões benignas, 18% eram pré-malignas e 30% eram malignas. Neste estudo, as 5 lesões mais comuns, incluindo-se pacientes de todas as faixas etárias, foram nevus (23%), neoplasia escamosa da superfície ocular (OSSN) [neoplasia intraepitelial conjuntival (CIN) ou carcinoma de células escamosas (SCC) (14%), melanose adquirida primária (PAM) (12%), melanoma (12%), e tumores linfoides (hiperplasia linfoide reacional ou linfoma) (9%). Nesta mesma série, os tumores malignos corresponderam a melanoma (n = 601, 12%), carcinoma de células escamosas (n = 440, 9%), linfoma (n = 358, 7%), sarcoma de Kaposi (n = 15, <1%).

1.3 Neoplasia escamosa da superfície ocular (OSSN)

Neoplasia escamosa da superfície ocular é um termo geral usado para descrever lesões epiteliais da córnea e da conjuntiva, abrangendo diferentes graus de alterações da maturação epitelial, carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo (Pizzarello & Jakobiec, 1978). Ela pode ocorrer como lesão localizada, minimamente agressiva, restrita ao epitélio ou como um tumor mais agressivo que ultrapassa a membrana basal do epitélio e invade o estroma. O termo aceito para o tipo localizado é o de neoplasia intraepitelial conjuntival (CIN) (Grossniklaus *et al.*, 1987). Quando a proliferação epitelial atípica envolve o epitélio em espessura parcial é

denominada neoplasia intraepitelial conjuntival leve, condição previamente denominada displasia. Nos casos em que a proliferação epitelial envolve toda a espessura epitelial, a lesão é denominada neoplasia intraepitelial conjuntival severa (carcinoma *in situ*). Pizzarello e Jakobiec (1978) já indicavam que a CIN, em sua forma leve, acomete menos da metade da espessura do epitélio, e na forma grave, a proliferação atípica envolve mais de 50% da espessura epitelial.

Alguns estudos indicam que o CIS corresponde a 39% de todas as lesões pré-malignas e malignas da conjuntiva (Aoki *et al.*, 1998; McKelvie, 2002; Warner & Jakobiec, 1997).

A neoplasia escamosa da superfície ocular tem taxa média de incidência mundial, padronizada por idade, de 0,18 a 0,08 casos/ano/100.000 entre homens e mulheres, respectivamente, e a maior taxa de incidência é observada na África (1,38 e 1,18 casos/ano/ 100.000 em homens e mulheres) (Gichuhi *et al.*, 2013).

Clinicamente a CIN ocorre como uma lesão carnosa séssil ou minimamente elevada, podendo ter aspecto gelatinoso, pigmentado, vascular, mais frequentemente no limbo, na fissura interpalpebral, e menos frequentemente no fórnice ou na conjuntiva palpebral (Shields & Shields, 2004, Lee, 1995; Mahoney *et al.*, 1990, Crawford *et al.*, 1995; Lee & Hirst, 1997; Waddell *et al.*, 2006). Segundo McKelvie (2002), os sintomas da OSSN são inespecíficos e podem ser confundidos com a pingueculite, pterígio, ceratose actínica conjuntival ou a conjuntivite atípica crônica. Clinicamente não é possível a diferenciação entre ceratose actínica, placa ceratótica conjuntival e OSSN, sendo o exame histopatológico da lesão fundamental para o preciso diagnóstico, incluindo-se a diferenciação entre lesões *in situ* e lesões invasivas. A maior parte dos pacientes tem como sintoma hiperemia ocular, e às vezes, o aparecimento de uma lesão esbranquiçada em uma região específica dos olhos, acompanhada de vasos dilatados, de maior calibre (Tunc *et al.*, 1999).

As lesões que ultrapassam a membrana basal do epitélio e, portanto, invadem a *lamina propria* da conjuntiva, são denominadas carcinoma de células escamosas (SCC) (Newton *et al.*, 1996), podendo se estender para a órbita, infiltrar a esclera e invadir o globo ocular nos casos mais avançados (Shields & Shields, 2008; Yousef & Finger, 2012; Erie *et al.*, 1986; Shields *et al.*, 1999; Graue *et al.*,

2011, Chisi *et al.*, 2006). A invasão intraocular é mais rara, sendo relatada em 2% - 15% de todos os casos (Tornesello *et al.*, 2006).

Nos raros casos de metástases para linfonodos, geralmente há comprometimento de linfonodos preauriculares, cervicais submandibulares e superiores profundos. Contudo, a disseminação sistêmica é rara (Scott *et al.*, 2002).

1.4 Fatores de risco para o desenvolvimento da OSSN

Revisões sistemáticas e estudos de metanálise mostram que os principais fatores de risco para o desenvolvimento de OSSN são a exposição à radiação ultravioleta (UV) do sol, infecção pelos vírus da imunodeficiência (HIV) e vírus do papiloma humano (HPV), enquanto a deficiência de vitamina A é um potencial fator de risco, mas ainda não foi investigada (Gichuhi *et al.*, 2013; Carreira *et al.*, 2013).

A exposição à luz ultravioleta é considerada um fator extremamente relevante para o surgimento da neoplasia (Lee & Hirst, 1995; Newton *et al.*, 1996).

Muitas pesquisas indicam que os raios UV pode causar diversos tipos de alterações no DNA, ao ocorrer atraso ou falha no processo de reparação do DNA, podendo levar à mutações somáticas e, a partir daí, o desenvolvimento de células neoplásicas (Shields & Shields, 2008). Armstrong e Krickler (2001) supõem que a exposição crônica à radiação ultravioleta poderia alterar células-tronco do limbo, causando danos disfuncionais. A radiação ultravioleta pode ainda danificar metaloproteinases da matriz extracelular e seus reguladores, levando a alterações disfuncionais e, finalmente, displásicas, resultando em OSSN. Existem vários estudos que relatam as mudanças moleculares presentes no carcinoma de células escamosas (Auw-Haedrich *et al.*, 2006; Tunc *et al.*, 1999).

Atualmente, há evidências de que alguns tipos de vírus, bactérias e parasitas que estão relacionados às infecções crônicas estão presentes no processo de desenvolvimento do câncer. A estimativa é de que em aproximadamente 18% dos casos de câncer há relação entre o desenvolvimento da neoplasia e agentes

infecciosos. Esse percentual indica que determinados agentes infecciosos podem induzir o desenvolvimento de neoplasias tanto quanto o tabagismo (Zur Hausen, 2002).

De modo geral, nos casos de carcinoma espinocelular (CEC), os agentes infecciosos mais importantes envolvidos no processo de carcinogênese são o Papilomavírus Humano (HPV), o Vírus de Epstein-Barr (EBV) e o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (Lima & Rabenhorst, 2006).

Os trabalhadores que exercem atividade contínua a céu aberto, como os carteiros, trabalhadores da construção civil, jardineiros, garis, trabalhadores rurais, mineradores, pescadores, dentre outros, estão expostos à radiação UV e fazem parte da população de risco, sendo classificados como classes sociais de maior vulnerabilidade ao desenvolvimento de CEC (Oliveira, 2013).

Desde a década de 1980, houve um aumento relevante no número de casos relatados de OSSN, principalmente na África subsaariana (Poole, 1999; Wabinga *et al*, 2000).

Na maioria dos estudos, a OSSN ocorre com maior frequência em homens. Entretanto, pesquisas realizadas na África apontam que, em algumas localizadas do continente africano, ambos os sexos são igualmente afetados, sendo os principais fatores de risco a radiação solar ultravioleta (UV) e as infecções pelo HIV e HPV (Gichuhi *et al.*, 2013; Carreira *et al.*, 2013).

1.5 Considerações gerais sobre o vírus do papiloma humano (HPV)

O Papilomavirus Humano (HPV) foi primeiramente descoberto por Strauss (1949), classificado na família Papillomaviridae. Apresenta simetria icosaédrica, com 72 capsômeros e um genoma de DNA de fita dupla circular com 7,9Kbp, constituído por cerca de 8 mil pares de bases. O capsídeo é icosaédrico, com um diâmetro de 50 a 60nm. Quando instalado, o HPV promove modificações no epitélio infectado (Quintero *et al.*, 2013). Na dependência de sua habilidade de induzir imortalização e

transformação celular, e também da interação com os vários componentes de ciclo celular, o HPV é classificado como de baixo ou alto risco oncogênico (Brenna & Syrjänen, 2003).

Os trabalhadores que exercem atividade contínua a céu aberto, como os carteiros, trabalhadores da construção civil, jardineiros, garis, trabalhadores rurais, mineradores, pescadores, dentre outros, estão expostos à radiação UV e fazem parte da população de risco, sendo classificados como classes sociais de maior vulnerabilidade ao desenvolvimento de CEC (Oliveira, 2013).

Desde a década de 1980, houve um aumento relevante no número de casos relatados de OSSN, principalmente na África subsaariana (Poole, 1999; Wabinga et al, 2000).

Muitas pesquisas indicam que os raios UV pode causar diversos tipos de alterações no DNA, ao ocorrer atraso ou falha no processo de reparação do DNA, podendo levar a mutações somáticas e, a partir daí o desenvolvimento de células neoplásicas (Shields & Shields, 2008). Armstrong e Krickler (2001) supõem que a exposição crônica à radiação ultravioleta poderia alterar células-tronco do limbo, causando danos disfuncionais. A radiação ultravioleta pode ainda danificar metaloproteinases da matriz extracelular e seus reguladores, levando a alterações disfuncionais e, finalmente, displásicas, resultando em OSSN. Existem vários estudos que relatam as mudanças moleculares presentes no carcinoma de células escamosas (Auw-Haedrich *et al.*, 2006; Tunc *et al.*, 1999).

A exposição à luz ultravioleta é considerada um fator extremamente relevante para o surgimento da neoplasia (Lee & Hirst, 1995; Newton *et al.*, 1996)

Atualmente, há evidências de que alguns tipos de vírus, bactérias e parasitas que estão relacionados às infecções crônicas estão presentes no processo de desenvolvimento do câncer. A estimativa é de que em aproximadamente 18% dos casos de câncer há relação entre o desenvolvimento da neoplasia e agentes infecciosos. Esse percentual indica que determinados agentes infecciosos podem induzir o desenvolvimento de neoplasias tanto quanto o tabagismo (Zur Hausen, 2002).

1.6 Organização genômica e proteínas do HPV

O genoma do HPV pode ser dividido em três regiões: uma região longa de controle (LCR), envolvendo cerca de 10% do genoma e as regiões Precoces (E) e Tardia (L). A sequência de DNA do HPV identifica uma organização genética de regiões que codificam proteínas virais (ORF). Em geral, as regiões 'E' surgem para ser expressas logo após a infecção e codificam as proteínas envolvidas na indução e regulação da síntese de DNA. As regiões 'L' são expressas em estágios posteriores da infecção e codificam as proteínas do capsídeo viral. As regiões E são designadas como proteínas 'E1' a 'E7', e a região 'L' é dividida em regiões 'L1' e 'L2' (Zur Hausen, 2006).

Zur Hausen (1994) relatou que a sequência entre o fim de 'L1' e o começo de 'E6' é chamada LCR sendo conhecida também como Região Não-Codante (NCR), contendo muitas das sequências regulatórias 'CIS' que controlam a transcrição e a replicação. Existem grandes evidências que o desenvolvimento do câncer induzido pelo HPV é um processo de múltiplas etapas.

A figura 3 ilustra a representação esquemática do genoma completo do HPV-16 (Smith *et al.*, 2011), com a região tardia (L), e precoce (E), região regulatória da transcrição viral (URR) e região não codificante (NCR).

Figura. 3- Esquema representativo do genoma do HPV-16 com as suas diferentes

regiões (Smith et al., 2011) Fonte: transcrição viral (URR) e região não codificante (NCR).

Em detalhes, o caminho realizado pela partícula viral desde a superfície celular até o citoplasma e núcleo consiste em diversos passos. O capsídeo viral desempenha um papel chave no processo de infecção da célula (Pelkmans & Helenius, 2013).

A entrada do vírus na célula hospedeira começa com a ligação de L1 a receptores presentes na superfície celular (Roden *et al.*, 1994; Sapp & Day, 2009). Os glicosaminoglicanos são receptores primários de superfície celular que auxiliam na interação com o Papilomavírus e com diversos outros vírus, bactérias e protozoários (Shafti-Keramati *et al.*, 2009).

Por endocitose, o vírus consegue se incorporar à célula, um processo que para o HPV ocorre lentamente (Xu *et al.*, 2006). A expressão das proteínas não estruturais (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) da região precoce do genoma viral ocorre nas camadas não diferenciadas e de diferenciação intermediária dos queratinócitos, enquanto a expressão das proteínas estruturais L1 e L2 da região tardia do genoma é efetivada nas camadas de diferenciação terminal. Apesar da ORF E4 estar localizada na região 'E' do genoma do papilomavírus, a mesma continua sendo expressa nos queratinócitos da camada mais diferenciada, sendo associada ao colapso dos filamentos de queratina (Howley & Lowy, 2001; Zheng & Baker, 2006).

O padrão da expressão dos genes virais é dependente da expressão das proteínas virais E1 e E2 que permitem a manutenção do DNA viral na forma epissomal (Wilson *et al.*, 2002) e facilitam a correta segregação dos genomas durante a divisão celular (You *et al.*, 2004). O genoma do papilomavírus é mantido como um elemento extracromossômico nos núcleos (Frazer, 2004), mas não necessariamente permanece como epissomo, podendo se integrar ao genoma da célula hospedeira (Arias-Pulido *et al.*, 2006).

Algumas das proteínas regulatórias são expressas na camada basal e suprabasal (E6 e E7) e estimulam a progressão do ciclo celular integrando com proteínas regulatórias do ciclo (Munger *et al.*, 2001), onde ocorre de forma paralela à replicação do genoma na camada granular e escamosa.

A ação oncogênica viral tem relação com a produção de oncoproteínas na célula hospedeira que interferem com as proteínas envolvidas no controle do ciclo celular, resultando em anomalias genéticas (Campo, 2006).

A expressão das proteínas (L1 e L2) e a formação do capsídeo acontece na camada escamosa e a partir daí novas partículas virais infectantes ou vírions são liberados no processo de descamação desta camada.

Como pode ser observado em seguida, o quadro 1 indica, de maneira sucinta, as funções das proteínas do HPV.

PROTEÍNA	FUNÇÃO
E1	Papel função de helicase; essencial para replicação viral e controla da transcrição.
E2	Na replicação e na repressão da replicação; reguça transcrição e replicação; controla a região de expressão precoce.
E4	Interage com proteínas de citoesqueleto, por isso tem envolvimento na liberação de novos vírions das células do hospedeiro.
E5	Envolvida na transformação celular.
E6	Envolvida na transformação celular, se liga e degrada a p53, possuindo um efeito anti-apoptótico ceular, induz a instabilidade genômica.
E7	Envolvida na transformação celular, se liga e inativa a pRB liberando o fator de transcrição E2F; induz a instabilidade genômica.
L1	Compõe o capsídeo viral; tem papel na infecção (ligação viral à superfície celular).
L2	CA1:B9ompõe o capsídeo viral; tem papel na infecção e organização do DNA viral.

Quadro 1- Funções das principais proteínas do HPV (Fonte: Boulet *et al.*, 2007)

É importante salientar que uma das características dos HPVs de alto risco, associados com a carcinogênese, é a relação do genoma viral com o cromossomo das células hospedeiras, levando à ruptura do gene E2 e na perda de

sua expressão, com consequente manutenção dos altos níveis de expressão E6/E7 (Baker & Howley, 1987).

Portanto, a transcrição oncogênica (altos níveis de E6/E7) é ausente ou muito baixa tanto em lesões pré-malignas, bem como no epitélio normal infectado por HPV, onde os papilomavírus predominantes se encontram na forma não integrada (Johnson *et al.*, 1990).

Estas observações demonstram que, apesar de E2 não ter papel transformante, ele possui um mecanismo de ação muito importante na manutenção dos níveis de expressão de E6/E7 (Lagunas-Martínez *et al.*, 2009).

Estudos comprovam que durante a carcinogênese cervical, a expressão das ORFs E6 e E7 do HPV é indispensável para a transformação e imortalização celular em lesões cervicais ocasionadas pelo HPV e o aumento da proliferação das células epiteliais suprabasais é fundamental para expressão destas oncoproteínas (Münger *et al.*, 1989; Sotlar *et al.*, 1998; Zur Hausen, 1988).

1.7 Processo de infecção da célula pelo HPV

O ciclo de replicação do papilomavírus está amplamente ligado aos processos de diferenciação das células epiteliais, relacionada ao modelo de infecção viral em células epiteliais (Campo, 2003).

O processo inicia-se nas células basais e parabasais, nas quais o DNA do HPV é duplicado até atingir a média de 50 cópias por célula, sendo expressos os genes E do HPV (Souto *et al.*, 2005; Fehrmann *et al.*, 2003).

As etapas do ciclo de multiplicação extensiva do DNA viral e transcrição de todos os genes virais, bem como formação do capsídeo, ocorrem apenas nas camadas mais superficiais do epitélio. O vírus se multiplica somente no núcleo das células infectadas. Contudo, a manifestação patológica relacionada ao HPV relaciona-se aos sítios onde a infecção foi iniciada (Fehrmann & Laimins, 2003; Souto *et al.*, 2005; Pyeon *et al.*, 2009.).

Assim que o HPV atinge as células-alvo, o mesmo permanece latente ou pode iniciar seu processo de replicação dentro do núcleo, tendo como resultado a liberação de partículas virais infectantes (Taborda *et al.*, 2000). A figura 4 mostra o processo de infecção de células epiteliais pelo HPV, correlacionado a atividade viral com o processo de diferenciação celular.

Figura 4- Correlação entre o programa de diferenciação celular e o ciclo de vida de HPV (Fonte: Stubenrauch & Laimins, 1999) (Fonte: Page 892. Crosbie EJ et al. Human papillomavirus and cervical cancer. Lancet 2013 September 7; 382:889-99)

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2006), dentre os diversos fatores de risco para o desenvolvimento do câncer cervical, a infecção pelo HPV está associada com maior ocorrência das neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC), e entre as mulheres infectadas pelo HIV, observou-se rápida evolução nos graus das NIC devido ao estado de imunossupressão.

O fator etiológico de vários tipos de tumores relacionados diretamente com o HPV, transmitido principalmente por via sexual, está relacionado também com a influência de diversos outros fatores como os genéticos, ambientais, reprodutivos, uso prolongado de anticoncepcionais, hormônios, tabagismo, etilismo, má higiene pessoal, deficiências nutricionais, agentes infecciosos, processo inflamatório de diversas etiologias, agentes imunossupressores, exposição a carcinógenos químicos e à radiação ionizante e condições sócio-econômicas. (Bauer *et al.*, 1993; Taborda *et al.*, 2000).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), aproximadamente 291 milhões de mulheres no mundo são portadoras do HPV, sendo que 32% estão infectadas pelos tipos 16, 18 ou ambos. No Brasil, o câncer do colo do útero corresponde a 8,1% das neoplasias malignas em mulheres, perdendo apenas para tumores da mama que perfazem 20,6%.

O potencial para a transformação de células epiteliais varia, de acordo com os subtipos de HPV. Deste modo, Muñoz, em 2003, classificou os vírus como tendo alto ou baixo potencial para a carcinogênese. Os subtipos reconhecidos como de alto risco são os HPVs 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59. Há um grupo considerado de risco intermediário, formado pelos subtipos 26, 53, 66, 68, 73, 82 e, finalmente, um grupo de baixo risco, 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, CP6108.

Segundo a *International Agency for Research on Cancer* (IARC) que agrupa dados de registros de câncer em todo o mundo, somente alguns tipos de HPV apresentam maior potencial carcinogênico, sendo os HPV's 16, 18, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ou 66 os que podem causar câncer cervical. Os tipos de DNA virais mais prevalentes em mulheres com carcinoma no colo do útero são o 16 e o 18, que possuem associação com 70% destes cânceres.

1.8 Epidemiologia e formas de transmissão

Um fator relevante de risco para a infecção pelo HPV é o elevado número de parceiros sexuais, com o início precoce da atividade sexual predispondo a maior risco de adquirir a infecção, em decorrência de maior tempo de exposição ao vírus. No Brasil essa correlação foi observada em alguns estudos e não em outros (Fedrizze *et al.*, 2008)

Ainda que a maioria das infecções seja transitória, sendo combatida espontaneamente pelo sistema imune, a infecção pelo papilomavírus humano é muito comum. A infecção genital pelo HPV é a mais frequente doença sexualmente transmissível (DST) na mulher e no homem (Burchell *et al*, 2006).

De acordo com Van Doornum e colegas (1994), nos dias atuais existem mais de 200 tipos diferentes identificados de HPV, entre os quais mais de 100 estão completamente sequenciados geneticamente e mais de 120 com sequenciamento parcial. É esperado que pelo menos 50% dos indivíduos sexualmente ativos irão entrar em contato com o HPV em algum momento de suas vidas e que 80% das mulheres entrarão em contato com o vírus até os 50 anos de idade. O tempo de infecção é de grande importância para a disseminação de uma DST em uma população. Deste modo, uma infecção de maior duração tem impacto potencialmente maior na transmissão do agente infeccioso. Com relação aos homens, a infecção pelo vírus tem menor duração, não sendo mais detectada após um ano, embora ainda seja desconhecido se a transmissão do HPV é a mesma durante todo o período em que ele é detectado.

Desde a década de 80, o HPV tem sido detectado em papilomas conjuntivais, em OSSN e mesmo em conjuntiva normal (McDonnell, McDonnell & Sun, 1992; Saegusa *et al.*, 1995). O papel central dos HPVs 16 e 18 na oncogênese de cânceres conjuntivais tem sido discutido há duas décadas (Eng *et al.*, 2002; Moubayed *et al.*, 2004; Nakamura *et al.*, 1997; Saegusa *et al.*, 1995; Scott *et al.*, 2002; Tulvatana *et al.*, 2003).

1.9 Mecanismos genéticos que levam ao tumor na conjuntiva (mutações nos genes TP 53 e p16)

O gene TP53, localizado no cromossomo 17, é um gene supressor de tumor que codifica uma fosfoproteína que regula a progressão do ciclo celular, o reparo de DNA, a senescência celular e a apoptose. Deste modo, em condições normais, quando a célula sofre dano ao DNA há um estímulo para o aumento da proteína p53, o que impede a progressão da célula lesada no ciclo celular ou induz a célula lesada à apoptose.

A perda da função desse gene pode estar relacionada tanto à iniciação quanto à progressão tumoral (Barbareschi *et al.*, 1998). Até o presente momento, o evento genético molecular mais frequente descrito sobre os cânceres humanos é a

mutação do TP53, muitas vezes acompanhada de superexpressão da proteína p53 mutante (Nigro *et al.*, 1989, Westfall & Pietsenpol, 2004).

A superexpressão de p53 tem sido relatada em carcinomas da conjuntiva (Jung *et al.*, 2006). Karcioglu & Toth (2000) encontraram também uma relação entre a expressão de p53 e o curso clínico adverso em carcinomas de conjuntiva. Além disso, a mutação do gene TP53 em carcinomas de células escamosas da conjuntiva, em especial a mutação associada à evidência de dano solar (raios UV), foi descrita em 52% dos casos (Ateenyi-Agaba *et al.*, 2004).

Outro mecanismo bem conhecido de inativação da proteína p53 relaciona-se à infecção por HPV de alto grau. Há quase 30 anos, estudos revelaram que a proteína E6 de HPVs de alto grau (16 e 18) é capaz de ligar-se e inativar a proteína p53 (Werness, Levine & Howley, 1990).

Para que a célula possa progredir no ciclo celular e ultrapassar um dos chamados “pontos de checagem”, entre as fases G1 e S, há necessidade de interação entre uma ciclina (D1) e a quinase dependente de ciclina (CDK) 4 ou 6. Essa interação promove a fosforilação da proteína do retinoblastoma (pRB) que, por sua vez, libera o fator de transcrição E2F, levando à expressão de genes que permitem a progressão da célula no ciclo de divisão celular (Zamora *et al.*, 2009; Roelens *et al.*, 2012).

A figura 5 mostra uma representação do ciclo celular, com suas etapas e pontos de restrição.

Figura. 5 - Representação esquemática do ciclo celular com seus pontos de restrição (Fonte: Elsevier Science, 2002)

O controle para que a célula progrida ou não no ciclo de divisão envolve a ação de inibidores de quinases dependentes de ciclina (CDKI). Um destes inibidores é a proteína p16, produto do gene CDKN2A. Nas células normais a expressão de p16 é silenciada por fenômenos epigenéticos complexos.

A p16 é uma proteína supressora de tumor e atua suprimindo a atividade de quinases dependentes de ciclinas 4 e 6 (CDK 4 e 6) e, portanto, impedindo que a célula progrida no ciclo celular (Lerma *et al.*, 2002)

Essa proteína é conhecida como um biomarcador para a modificação de células infectadas por HPV e sua expressão anômala elevada tem sido associada com displasia das células infectadas. Nestes casos, sua superexpressão é decorrente do seu controle fisiológico induzido pela inativação funcional de pRb, e pela ação da proteína E7 do próprio HPV. A alta expressão de p16 parece ser uma alteração precoce na carcinogênese associada à infecção pelo HPV (Munger *et al.*, 2013; Joseph *et al.*, 2004; Zieske, 2002).

Munger e colaboradores (2013) ainda ressaltam que a expressão de p16 parece estar associada aos tumores que contêm mutações do pRb e também em tipos de cânceres não associados ao HPV, incluindo-se tumores de mama, próstata, pulmão e carcinoma de ovário.

Nos adenocarcinomas cervicais e adenocarcinomas *in situ* foi observado que há uma superexpressão de p16, com forte associação com os tipos de HPV 16 ou 18 (Riethdorf *et al.*, 2004).

Com relação aos tumores conjuntivais, a expressão de p16 e p53 já foi relatada em carcinomas espinocelulares da conjuntiva, sem associação com infecção pelo HPV (Jung *et al.*, 2006). Chauhan *et al* (2012) determinaram que a sensibilidade e a especificidade de p16INK4a como marcador para a presença de HPV foram de 86% e 79%, respectivamente, com valor preditivo positivo de 33% e valor preditivo negativo de 98%. Neste mesmo estudo, a presença de HPV em OSSN também foi relatada como um fator prognóstico de melhor sobrevida em pacientes com estas lesões.

Embora a maioria dos trabalhos mostrem frequente expressão de p16 em OSSN, Kuo *et al.* (2006) não encontram marcação de p16 em neoplasias

conjuntivais que continham HPV. Estes autores sugerem que as alterações epiteliais do HPV em mucosas de diferentes sítios anatômicos podem cursar com ativação de diferentes vias moleculares.

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESES

A frequência de HPV em OSSN varia bastante, na dependência da população estudada.

As lesões ocorrem em pacientes mais novos (< 50 anos).

O HPV é um fator de risco para o desenvolvimento de OSSN interferindo diretamente dos marcadores do ciclo celular p16 e p53 que atuam do tumor.

Essas informações serviram de base para a realização desse trabalho, buscando-se identificar se em nosso meio a presença do HPV nos casos de neoplasias da superfície ocular é significativa.

3 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a relevância dos processos fisiopatológicos oncogênicos dos casos de neoplasias escamosas da superfície ocular relacionando o papel do HPV e das proteínas p16, p53 das amostras diagnosticadas no Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, no período compreendido entre 2005 e 2015.

Objetivos específicos

Determinar a presença de HPV de alto e baixo risco, por técnica de hibridização *in situ* cromogênica (CISH) nas neoplasias escamosas da superfície ocular.

Determinar a expressão de p16 e p53 nas neoplasias escamosas da superfície ocular.

Correlacionar os achados anteriores com a faixa etária dos pacientes acometidos.

Determinar a frequência de elastose solar, um sinal histopatológico de dano solar, nas conjuntivas com diagnóstico de neoplasia escamosa da superfície ocular.

4 ASPECTOS ÉTICOS

O presente trabalho de pesquisa foi conduzido de forma a considerar as disposições contidas nas resoluções CNS nº 196/1996 sobre a pesquisa envolvendo seres humanos. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP-USP com processo HCRP nº: 71923417.4.0000.5440.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa dos casos de OSSN diagnosticados por biópsia/resssecção de tumor conjuntival foi realizada por meio de consulta ao arquivo digital do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (SERPAT/HCFMRP), possibilitando o acesso aos laudos histopatológicos de todos os pacientes com diagnóstico de neoplasia escamosa da superfície ocular, no período de 2005-20015.

A obtenção dos dados clínico-epidemiológicos foi efetuada mediante consulta dos prontuários dos pacientes no Arquivo de Prontuários do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, por meio de autorização previamente concedida aos pesquisadores (vide FICHA SAME).

Todas as lâminas do material de biópsia/resssecção tumoral, disponíveis no SERPAT/HCRP, foram revisadas por um patologista com experiência em patologia ocular. As OSSN foram classificadas como lesão intraepitelial conjuntival (leve ou acentuada) ou carcinoma espinocelular invasivo. Foi também observada a presença de sinais de elastose solar nas conjuntivas acometidas pelos tumores

Examinamos retrospectivamente 60 pacientes com neoplasias escamosas da superfície ocular diagnosticados no HCFMRP.

A falta de prontuário médico para consulta ou a escassez de material no bloco de parafina, impedindo a realização dos estudos de imuno-histoquímica e/ou hibridização In situ foram considerados como critérios de exclusão. Para o período de estudo (2005-2015) foram obtidos 45 casos em condições de estudo.

A partir dos blocos de parafina, com material suficiente, disponíveis no SERPAT, foram realizados os estudos de imuno-histoquímica para detecção das proteínas p53 e p16, e de hibridização in situ cromogênica (CISH) para a detecção de genoma viral de HPV de baixo e alto grau.

Os dados referentes às informações clínicas, epidemiológicas e histopatológicas, juntamente com os achados imuno-histoquímicos (p16 e p53) e de CISH foram descritos e comparados com os dados da literatura.

5.1 Confeção de lâminas histológicas para as técnicas de Imuno-histoquímica e Hibridização in situ cromogênica (CISH)

Os blocos contendo os tumores foram submetidos à microtomia para confecção de novos cortes histológicos para a realização dos estudos imuno-histoquímicos e de hibridização in situ cromogênica para detecção do HPV. Foram realizados cortes de 3µm de espessura, utilizando-se micrótomo Leica RM 2125 RTS. Os cortes histológicos foram colocados em lâminas silanizadas (Starfrost®).

Para a retirada da parafina, as lâminas foram submetidas a diversos passos que utilizam xilol e álcool. Inicialmente, foram realizadas duas etapas consecutivas de tratamento com Xilol por 30 min cada, seguido de um banho de 30 min em solução xilol + álcool 100% (1:1). Posteriormente, as lâminas passaram por 2 banhos com álcool 100%, com duração de 5 min cada, 1 banho com álcool 95% por 5 min e um com álcool 70% por 5 min. Após este processo de desparafinização, as lâminas estavam prontas para serem, então, submetidas aos procedimentos de imuno-histoquímica e de hibridização *in situ*, além da realização da coloração de rotina por hematoxilina e eosina (H&E), nos casos em que as lâminas originais encontravam-se descoradas ou de qualidade ruim.

5.2 Técnica de Imuno-histoquímica

Para a recuperação antigênica, as lâminas foram condicionadas em tampão EDTA 10mmol/l, pH 6.0, incluídas em panela a vapor por 40 minutos, resfriadas em temperatura ambiente e lavadas em tampão fosfato (PBS).

Para a detecção da proteína p53 e p16 foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3% e PBS por 10 minutos, e o bloqueio de antígenos com BSA (albumina de soro bovino - Bovine serum albumin; Sigma Chemical CO P.P 14508, St. Louis, MO 63178, USA) por 60 minutos.

Os anticorpos primários utilizados foram o p53 (Santa Cruz, clone JC-8, diluição 1:1000) e p16 (Dako, clone M7001, 1:500).

Os anticorpos primários foram incubados em câmara úmida, em geladeira *overnight*. Após a incubação, foram realizadas três lavagens sendo duas com PBS e uma com TBS (10nM phosphate buffered saline pH 7,4 0,05%, Tween 20); a seguir foi aplicado o anticorpo secundário da Invitrogen (Invitrogen Corporation, 542 Flynn Road, Camarillo, CA 93012, USA) por 30 minutos. Os cortes histológicos foram incubados pelo HRP polímero conjugado *Ready to Use da Invitrogen* por 30 minutos.

O desenvolvimento da imuno-histoquímica foi realizado com tetracloreto de 3,3diaminobenzidina (DBA) (Sigma-Aldrich, GmbH, P.O 1120, 89552 Steinheim, Germany) diluído em tampão PBS e peróxido de hidrogênio 0,036% com tempo de marcação variando de 10 a 15 minutos, contra-corados com Hematoxilina de Harris; desidratados e montados com Entellan (Merk KGaA, Darmstadt, Germany).

As marcações foram interpretadas pela equipe do projeto como positivas ou negativas. A marcação positiva só foi considerada se ocorresse em mais de 50% das células neoplásicas, e positiva focal se presente em 30-50% das células neoplásicas. Foram analisados 3-5 campos microscópicos de grande aumento (400X).

5.3 Hibridização in situ cromogênica (CISH)

A técnica de hibridização *in situ* cromogênica foi realizada para a detecção de sequências de DNA específicas do HPV de alto e baixo grau no tecido. Foram utilizadas as sondas ZytoFast para HPV de alto grau 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/66/68/82 (Probe ZytoVision, T-1140-400) e baixo grau 6,11 (Probe Zytovision, T-1055-400), de acordo com as instruções do fabricante.

Este protocolo para a realização do CISH abrange duas etapas, sendo que a primeira etapa corresponde aos passos já descritos para a desparafinização dos cortes histológicos, seguida por bloqueio da peroxidase com água oxigenada 10 volumes por 5 minutos, lavagens com água destilada, e digestão enzimática com pepsina por 5 min a 37°C em câmara úmida. Posteriormente, foi realizado um pré-tratamento com banho em EDTA 95% por 15 min, novas lavagens com água

destilada e desidratação dos cortes em banhos sucessivos em álcool 70%, 90% e 100% por 1 min em cada. Essas lâminas foram secas e a sonda adicionada sobre o tecido. Os cortes foram cobertos com lamínulas e selados. O material foi desnaturado por 5 min a 75° C e a hibridização foi realizada a 37° C por 60 min.

Numa segunda etapa, a lamínula foi retirada e realizada lavagem das lâminas em tampão TBS a 55° C por 5 min para remoção das ligações inespecíficas. Posteriormente foi aplicado o anticorpo primário Mouse-Anti-Dig, incubado por 30 min a 37° C em câmara úmida e retirado o excesso do marcador com banhos sucessivos em TBS. Foi aplicado o polímero Anti-mouse-HRP, incubado por 30 min a 37°C em câmara úmida e retirado o excesso de amplificador de sinal com lavagens com TBS. Para a marcação, foi utilizado o cromógeno diaminobenzidina (DAB) por 10 min e a contra-coloração foi realizada com Hematoxilina de Mayer. As lâminas foram desidratadas e diafanizadas antes da montagem.

As análises da hibridização foram realizadas em microscópio com captura de imagem Carl Zeiss Axio Scope.A1.

5.4 Análise estatística

Foi realizado uma análise estatística descritiva, indicando-se as idades dos pacientes acometidos, com média e mediana de idade. Foram também indicadas as frequências de positividade das lesões quanto aos marcadores imuno-histoquímicos (p53 e p16), presença de DNA viral, presença de elastose e frequência de lesões invasivas e *in situ*.

6 RESULTADOS

O estudo revelou um predomínio de ocorrência de OSSN em pacientes do sexo masculino. Dentre os 45 casos estudados, 30 (68%) foram do sexo masculino e 15 (32%) do sexo feminino. O gráfico 1 mostra a distribuição dos casos, segundo o gênero, resultando em uma relação homem / mulher de 2:1.

Gráfico 1- Representação esquemática da distribuição dos casos, segundo o gênero (n=45)

As lesões também predominaram em pacientes de pele branca. Dos 45 casos estudados, 40 pacientes (89%) apresentavam pele da cor branca, 3 pacientes (7%) eram pardos, e apenas 2 (4%) de cor preta como mostrado no gráfico abaixo.

Gráfico 2- Distribuição da neoplasia de acordo com a cor da pele (n=45).

Com relação às faixas etárias de acometimento, observou-se maior frequência da neoplasia a partir dos 40 anos de idade, mantendo-se relativamente estável o número de casos nas faixas etárias subsequentes, incluindo-se o grupo com idade superior a 80 anos. A faixa etária dos pacientes acometidos por OSSN variou entre 20 e 97 anos, com média de idade de 62 anos e mediana de 64. O gráfico 3 representa a distribuição das lesões, segundo a faixa etária d/os pacientes.

Gráfico 3- Distribuição das neoplasias segundo a faixa etária (n=45)

Na análise dos prontuários foram também obtidos dados com relação às comorbidades que os pacientes apresentavam, quando da ocasião do diagnóstico de tumor conjuntival. Dos 45 casos examinados, 25 (56%) apresentaram alguma comorbidade, 15 casos (33%) não possuíam comorbidades, e em 5 casos (11%) não havia menção, no prontuário médico, quanto à presença de comorbidades. O gráfico 4 mostra as porcentagens de pacientes com ou sem comorbidades, bem como o grupo sem informações disponíveis nos prontuários.

Gráfico 4- Presença ou não de comorbidades em pacientes com diagnóstico de OSSN (n=45)

Com relação à lateralidade da lesão, ou seja, se havia acometimento do olho direito, olho esquerdo ou ambos os olhos, foi observado o acometimento do olho direito em 22 casos (49%), do olho esquerdo em 15 casos (33%) e de ambos os olhos em 2 casos (5%). Nos outros 6 casos (13%) as informações quanto à lateralidade da lesão não constavam no prontuário médico. O gráfico 5 demonstra estes achados.

Gráfico 5- Distribuição da OSSN segundo a lateralidade da lesão (n=45)

Com relação aos achados histopatológicos das lesões, a presença de sinais de elastose solar (degeneração basofílica do colágeno) nas conjuntivas que apresentaram tumores foi observada em 43 casos (95,5%). Em um dos casos não foram observados sinais de elastose e em outro a amostra só continha a porção epitelial, com escassa representação da *lamina propria*.

Quanto ao diagnóstico histopatológico de OSSN, 31 casos (69%) foram de carcinoma de células escamosas (carcinoma invasivo) e 14 casos (31%) foram de neoplasia intraepitelial conjuntival de alto grau (carcinoma in situ).

A seguir a figura 6 ilustra um caso de carcinoma invasivo da conjuntiva dentre os casos estudados e no gráfico podemos observar as análises histopatológicas.

Figura 6- Carcinoma de células escamosas, invasivo da conjuntiva (H&E, 200X)

Gráfico 6- Carcinoma de células escamosas, invasivo da conjuntiva

Na avaliação da expressão da proteína p53 por método imuno-histoquímico, dos 45 casos estudados, 40 casos (89%) exibiram positividade focal (em menos de 50% das células) ou difusa (> 50% das células) para p53, e somente em 5 casos (11%) a pesquisa da proteína p53 resultou negativa. O gráfico 7 mostra estes resultados.

Gráfico 7- Frequência de positividade da proteína p53 em OSSN (n=45)

Estes achados são semelhantes aos reportados na literatura, com frequente expressão de p53 em OSSN (Jung *et al.*, 2006). Em um dos estudos, a positividade de p53 foi observada em 78% dos casos (Karcioglu & Toth, 2000).

Os dados de literatura permitem assumir que a alta expressão desta proteína em OSSN está, na grande maioria dos casos, associada ao dano do gene TP53, decorrente da exposição solar. A figura 8 ilustra um exemplo de positividade para p53.

Figura 7- Positividade nuclear difusa para p53 em carcinoma conjuntival (imunohistoquímica, 40X)

E com relação à expressão da proteína p16, dos 45 casos estudados, 24

(53%) exibiram positividade; em 15 casos (33%) a positividade foi difusa, e em 9 casos (20%) foi focal. Em 21 casos (47%) não houve marcação para p16.

O gráfico 8 indica estes achados.

Gráfico 8- Frequência de positividade das OSSN para p16 (n=45)

Abaixo na figura 9 pode-se observar a marcação citoplasmática positiva da proteína p16 nos respectivos casos já citados acima.

(Imunohistoquímica, 40X)

Figura 8- Positividade nuclear difusa para p16 em carcinoma conjuntival

É interessante analisar a positividade da proteína p16 nas OSSN, juntamente com os dados encontrados na pesquisa de DNA viral do HPV de baixo e alto grau. Dos 45 casos testados, não encontramos positividade para HPV de baixo grau (6, 11) em nenhum deles.

Com relação ao HPV de alto grau, 6 casos (13%) foram positivos e nossos achados que indicam 13% de positividade para HPV de alto grau em OSSN são semelhantes aos encontrados na maioria dos estudos, com exceção daqueles realizados em países africanos, onde a frequência de HPV é bem mais alta. A figura 10 mostra um caso de positividade para HPV de alto grau.

E no gráfico 9 é mostrado os achados indicando as amostras positivas e negativas para HPV de alto grau.

Figura 9- Positividade da neoplasia para HP de alto grau (CISH, 400X)

Gráfico 9 – Casos positivos e negativos do HPV das amostras de OSSN.

7 DISCUSSÃO

Em relação ao gênero, os nossos achados estão de acordo com os dados de literatura que indicam uma maior frequência destas lesões em pacientes do sexo masculino (Sun, Fears & Goedert, 1997; Ramberg *et al.*, 2015). De acordo com várias pesquisas similares, essa frequência maior nos homens ocorre pelo fato de suas profissões os colocarem expostos diretamente à radiação solar, como foi verificado em consulta aos prontuários médicos, sendo frequentemente trabalhadores na área agrícola, da construção civil, dentre outras ocupações relacionadas.

Os dados de literatura também descrevem estas lesões predominantemente na população branca (Sun, Fears & Goedert, 1997), estando de acordo com nossos resultados, exceção feita à África-subsaariana, formada por países mais pobres, com grande incidência de várias doenças, inclusive HPV e HIV, sendo os negros a grande maioria da população.

Como também observado em vários trabalhos da literatura, observamos um aumento do número de casos de OSSN em homens, na faixa etária entre 40 e 80 anos. Já no sexo feminino, o número de casos foi menor nesta faixa etária. Porém, ao observarmos o grupo acima dos 80 anos, verificamos um número de casos semelhantes entre homens e mulheres. Este achado possivelmente pode ser explicado pelo fato da radiação solar provocar um dano cumulativo, ou seja, as mulheres recebem menor radiação solar durante todo período de suas vidas, podendo desenvolver a doença em uma idade mais avançada.

Dentre as comorbidades encontradas nos prontuários temos como doenças sistêmicas e locais a hepatite, diabetes, carcinoma basocelular, glaucoma, e mais importante, a presença de infecção pelo HIV. Dentre os 45 casos estudados, 5 (11%) apresentaram HIV.

Os resultados observados em nosso estudo, com ocorrência do HIV em 11% dos casos de nossa amostra, indicam uma frequência muito maior do vírus neste grupo de pacientes, quando comparada a da população geral brasileira que é de aproximadamente 0,6% (Szwarcwald CL. *et al.*, 2008). Os dados de literatura

mostram, de fato, a infecção pelo HIV como um importante fator de risco para o desenvolvimento de OSSN, adquirindo ainda maior importância em pacientes de países africanos, com alta prevalência de HIV na população (Spitzer *et al.*, 2009; Carreira *et al.*, 2013).

Nos pacientes portadores do HIV o curso clínico também costuma ser mais agressivo, com maior frequência de invasão da córnea, do globo ocular e da órbita (Kamal *et al.*, 2015). Lesões bilaterais também têm sido descritas em pacientes com xeroderma pigmentoso (Gupta, Sachdev & Tandon, 2011; Kalamkar *et al.*, 2016; Agarwal *et al.*, 2017).

Um ponto importante com relação à lateralidade é a ocorrência de lesões bilaterais (AO). As lesões bilaterais são mais comumente observadas em pacientes portadores do HIV. Em nosso estudo, o acometimento bilateral foi observado em 2 casos (5%), porém estes pacientes não pertenciam ao grupo de pacientes com positividade para HIV. Estes dados estão de acordo com outros estudos relatados em que a bilateralidade de OSSN em pacientes imunocompetentes foi de 4%.

A elastose solar é considerada um sinal de dano crônico decorrente de exposição à radiação ultravioleta na pele (Kligman & Sayr, 1991) e também na conjuntiva. Deste modo, o frequente achado de elastose solar nas amostras é esperado, uma vez que a exposição à radiação ultravioleta é considerada o principal fator predisponente para OSSN (Lee & Hirst, 1995; Newton *et al.*, 1996), podendo causar diversos danos ao DNA e lesar as células do limbo (Shields & Shields, 2008; Armstrong e Krick, 2001).

Nas diversas séries com diagnóstico de OSSN, a frequência de casos com lesão intraepitelial e de casos com neoplasia invasiva varia bastante.

De modo geral, lesões de maior tamanho, gênero masculino e positividade para HIV são fatores associados à neoplasia invasiva (Spitzer *et al.*, 2009, Tiong *et al.*, 2013).

Neste estudo houve mais casos invasivos (69%) do que *in situ* (31%), mas houve mais comorbidades nos casos de carcinoma *in situ*.

Como citado anteriormente, a mutação do gene TP53 em carcinomas de células escamosas da conjuntiva, em especial a mutação associada à evidência de dano solar (raios UV), foi descrita em 52% dos casos na literatura (Ateenyi-Agaba *et al.*, 2004). A mutação desse gene que leva a alteração da proteína p53, sendo um supressor tumoral e fazendo parte do controle do ciclo celular também está ligada a

diversos outros tumores em todo o organismo.

A expressão imuno-histoquímica de p16 é bem estabelecida como biomarcador específico para infecção pelo HPV de alto grau (16,18) no colo uterino (Riethdorf *et al.*, 2004). Entretanto, a expressão de p16 tem sido relatada com frequência em OSSN, podendo ou não estar associada à infecção pelo HPV (Chauhan *et al.*, 2012). Como foi confirmado em nosso estudo.

A frequência de positividade de expressão de p16 também foi alta nos casos negativos para HPV e esse resultado interessante nos leva a sugerir que essa proteína possa atuar como marcador de outros tumores, não somente àqueles ligados à infecção pelo HPV

Com esse resultado, concluímos que a expressão de p16 não é específico somente na associação da lesão da infecção pelo HPV, sendo um supressor tumoral como a p53, pode sim ser um biomarcador presente em outras neoplasias como as neoplasias escamosas da superfície ocular mostrada neste trabalho.

Dos 6 casos com positividade para HPV, 5 deles também expressaram a proteína p16. Por outro lado, dos 39 casos negativos para HPV de alto grau, 19 expressaram também a proteína p16. Estes dados indicam um valor preditivo positivo baixo de p16, quanto a sua associação com HPV de alto grau (20,83).

A detecção de HPV em OSSN varia amplamente na literatura, na dependência da população estudada e métodos utilizados para a detecção do vírus (McDonnell, McDonnell & Sun, 1992; Gichuhi *et al.*, 2013; Carreira *et al.*, 2013; Guthoff & Stroebel, 2009).

8 CONCLUSÕES

As OSSN acometem mais homens do que mulheres (2:1), em faixa etária acima dos 40 anos, predominando na população branca, com acometimento bilateral em 5% dos casos.

Em 11% dos casos, os pacientes apresentaram positividade para HIV.

A maioria dos casos (69%) foram diagnosticados como carcinoma invasivo, notando-se ainda na quase totalidade dos casos (95,5%) a presença de sinais histopatológicos de dano solar (elastose).

A frequência de expressão das proteínas p53 e p16 é alta nas lesões, 89% e 53%, respectivamente.

Em 13% da amostra, foi possível detectar a presença de DNA de HPV de alto grau, pelo método de CISH.

Os indivíduos com positividade para HPV não correspondem aos indivíduos mais jovens da amostra estudada.

Não foi detectado DNA de HPV de baixo grau (6,11) pelo método de CISH nos casos de OSSN.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL R1, Chawla B1, Asif MI1, Pujari A. **Bilateral ocular surface squamous neoplasia with bilateral periocular basal cell carcinoma in a case of xeroderma pigmentosum.** BMJ Case Rep. 2017 Dec 2;2017. pii: bcr-2017-220882. doi: 10.1136/bcr-2017-220882.

ARIAS-PULIDO, H. et al. **Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer.** J. Clin. Microbiol., v. 44, n. 5, p. 1755–1762, 2006.

ARMSTRONG BK, Kricker A. **The epidemiology of UV induced skin cancer.** J Photochem Photobiol. 2001;63:8–18. [PubMed]

ATEENYI-AGABA C, Weiderpass E, Smet A, et al. **Epidermodysplasia verruciformis human papillomavirus types and carcinoma of the conjunctiva: a pilot study.** British Journal of Cancer. 2004b; 90 : 1777-1779.[Artigo livre PMC] [PubMed]

AUW-HAEDRICH C, Sundmacher R, Freudenberg N, et al. **Expression of p63 in conjunctival intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma.** Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2006;244:96–103. [PubMed]

BARBARESCHI, M.; LEONARDI E, M. F. A.; SERIO. G.; PALMA, P. D. **P53 and c-erb-2 protein expression in breast carcinomas: an immunohistochemical study including correlations with receptor status, proliferating markers, and clinical stage in human breast cancer.** Am J Clin Pathol. 1992;98:408-18.

BAUER H.M, Hildesheim A, Schiffman M.H, Glass AG, Rush B.B, Scott DR et al. **Determinants of genital human papillomavirus infection in low-risk women in Portland.** Oregon. Sex Transm Dis 1993;20(5):274-8

BURCHELL NA, Winer RL, Sanjosé S, Franco EL. Chapter 6: **Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection.** Vaccine. 2006;24(S3):52-61. Callan M.F. The immune response to Epstein-Barr virus. Microbes Infect. 2004;6(10):937-45.

CARPES, A. Comin, A. Lohmann, C.M. **FISIOLOGIA DA VISÃO.** Universidade Federal de Santa Maria \u2013 UFSM.

CAMPO, M. **Papillomavirus and disease in humans and animals**. Vet. Comp. Oncol., v. 1, n. 1, p. 3–14, 2003.

CARREIRA et al., 2013 H. Carreira, F. Coutinho, C. Carrilho, N. Lunet **HIV and HPV infections and ocular surface squamous neoplasia: systematic review and meta-analysis**. Br. J. Cancer, 109 (2013), pp. 1981-1988.

CHAUHAN S1, Sen S, Sharma A, Dar L, Kashyap S, Kumar P, Bajaj MS, Tandon R. **Human papillomavirus: a predictor of better survival in ocular surface squamous neoplasia patients**. Br J Ophthalmol. 2012 Dec;96(12):1517-21

CRAWFORD JB. **Conjunctival tumors**. In: Tasman W, Jaeger 8 EA. Duane's clinical ophthalmology. Philadelphia: Lippincott; Raven; 1995. v. 4, Cap. 10, p. 1-10.

DUKER,J. S.; Myron, Y. **Oftalmologia**. Elsevier Editora Ltda. 2011.

ENG H.L, Lin T.M, Chen S.Y, Wu S.M, Chen W.J (2002) **Falha na detecção de DNA de papilomavírus humano em neoplasias epiteliais malignas da conjuntiva por reação em cadeia da polimerase**. Am J Clin Pathol 117: 429-436.

ERIE JC, Campbell RJ, Liesegang TJ. **Conjunctival and corneal intraepithelial and invasive neoplasia**. Ophthalmology. 1986;93:176–83. [PubMed]

FRAZER, I. H. **Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination**. Nat. Rev. Immunol., v. 4, n. 1, p. 46–55, 2004.

FEHRMANN, F.; LAIMINS, L. A. **Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation**. Oncogene, v. 22, n. 33, p. 5201-7, 2003.

GREGORY, RL. **Olho e Cérebro: psicologia da visão**. [trad.] Álvaro Cabral. Rio de Janeiro: Zahar Editores, 1979.

HELENE, O; Helene, A. F. **Alguns aspectos da óptica do olho humano**. Revista Brasileira de Ensino de Física, v. 33, n. 3, 3312 (2011) www.sbfisica.org.br.

MICHAEL J. Hogan, Jorge A. Alvarado and Joan Esperson Weddell. Histology of the

Human Eye: **An Atlas and Textbook**, chapter two, pg. 45, W. B. Saunders Company, 1971.

HOWLEY, P.; LOWY. **Papillomaviruses and their replication**. Fields Virolog, D. M.Knipe E P. M. Howley, v. 65, p. 2197–2229, 2001.

<https://www.cms.gov/medicare-coverage-database/details/nca-decision-memo.aspx?NCAId=278>

JOSEPH A, Powell-Richards A.O, Shanmuganathan V.A, Dua H.S (2004)
Características das células epiteliais de explantes limbo humanos cultivados. Br J Ophthalmol 88: 393-398.

JUNG SM1, Lin HC, Chu PH, Wu HH, Shiu TF, Huang SL, Lai CH **Expression of cell cycle-regulatory proteins, MIB-1, p16, p53, and p63, in squamous cell carcinoma of conjunctiva: not associated with human papillomavirus infection**. Virchows Arch. 2006 Mar;448(3):301-5. Epub 2005 Dec 3.

JUNQUEIRA, L.C.U. & CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 524p.

Kalamkar C1, Radke N2, Mukherjee A2, Radke S. **Xeroderma pigmentosum with bilateral ocular surface squamous neoplasia and review of the literature**. BMJ Case Rep. 2016 May 10;2016. pii: bcr2016215364. doi: 10.1136/bcr-2016-215364.

Kamal S1, Kaliki S2, Mishra DK3, Batra J1, Naik MN. **Ocular Surface Squamous Neoplasia in 200 Patients: A Case-Control Study of Immunosuppression Resulting from Human Immunodeficiency Virus versus Immunocompetency**. Ophthalmology. 2015 Aug;122(8):1688-94. doi: 10.1016/j.ophtha.2015.04.027. Epub 2015 Jun 6.

KNOP N, Knop E: **Conjunctiva-associated lymphoid tissue in the human eye**. Invest Ophthalmol Vis Sci 2000;41:1270–1279.

LAGUNAS-MARTINEZ, A.; MADRID-MARINA, V.; GARIGLIO, P. **Modulation of apoptosis by early human papillomavirus proteins in cervical cancer**. Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer, v. 1805, n. 1, p. 6–16, 2010

LEE AND HIRST, 1995 G.A. LEE, L.W. HIRST. **OCULAR SURFACE SQUAMOUS NEOPLASIA**. SURV. OPHTHALMOL., 39 (1995), PP. 429-450.

LEE AND HIRST, 1997 G.A. LEE, L.W. HIRST. **RETROSPECTIVE STUDY OF OCULAR SURFACE SQUAMOUS NEOPLASIA**. AUST. N. Z. J. OPHTHALMOL., 25 (1997), PP. 269-276.

LERMA, E. ET AL., **ALTERATIONS OF THE P16 INK4A/ RB/CYCLIN-D1 PATHWAY IN VULVAR CARCINOMA, VULVAR INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA AND LICHEN SCLEROSUS. MOLECULAR PATHOLOGY OF VULVAR CARCINOMA**. V. 33, N. 11, 2002.

LIMA, M.A.P; Rabenhors, S.H.B. Associação do vírus Epstein-Barr (EBV) com tumores sólidos. Revista Brasileira de Cancerologia 2006; 52(1): 87-96.

MAHONEY MC, Burnett WS, Majerovics A, Tanenbaum H. **The epidemiology of ophthalmic malignancies in New York State**. Ophthalmology. 1990;97:1143–1147. [PubMed].

Matoba A.Y. **Ocular disease associated with Epstein-Barr virus infection**. Surv Ophthalmol 1990;35:145–50.

MCDONNELL JM1, McDonnell PJ, Sun YY. **Human papillomavirus DNA in tissues and ocular surface swabs of patients with conjunctival epithelial neoplasia**. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1992 Jan;33(1):184-9.

MCKELVIE PA, Daniell M, McNab A, Loughnan M, Santamaria JD. **Squamous cell carcinoma of the conjunctiva: a series of 26 cases**. Br J Ophthalmol. 2002;86:168–173. [PMC free article] [PubMed].

MOUBAYED P, Mwakyoma H, Schneider D.T. (2004). **Alta frequência de papilomavírus humano 6/11, 16 e 18 infecções em lesões precancerosas e carcinoma de células escamosas da conjuntiva na Tanzânia subtropical**. Am J Clin Pathol 122: 938-943.

MÜNGER, K. et al. **The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes**. J. Virol., v. 63, n. 10, p. 4417–4421, 1989.

MUNGUER, K.; GWIN, T. K.; DRUBIN, M. M. 2001. **P16 in HPV-associated cancers**.

NAKAMURA Y, Mashima Y, Kameyama K, Mukai M, Oguchi Y. **Detection of human papillomavirus infection in squamous tumours of the conjunctiva and lacrimal sac by immunohistochemistry, in situ hybridisation, and polymerase chain reaction.** *The British Journal of Ophthalmology*. 1997;81(4):308-313.

NEWTON R, Ferlay J, Reeves G, Beral V, Parkin DM. **Effect of ambient solar ultraviolet radiation on incidence of squamous cell carcinoma of the eye.** *Lancet*. 1996;347:1450–1451. [PubMed].

NIGRO JM1, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P. **Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types.** *Nature*. 1989 Dec 7;342(6250):705-8.

OLIVEIRA, M. M. F. **Radiação ultravioleta / Índice ultravioleta e câncer de pele no Brasil: condições ambientais e vulnerabilidade social.** *Revista Brasileira de Climatologia*, v. 13, p. 60–73, 2013.

PELKMANS, L.; HELENIUS, A. **Insider information: what viruses tell us about endocytosis.** *Curr. Opin. Cell. Biol.*, v. 15, n. 4, p. 414–422, 2003.
PINTO, Á. P.; TULIO, S.; CRUZ, O. R. **HPV cofactors in cervical carcinogenesis.** *Rev. Assoc. Med. Bras.*, v. 48, n. 1, p. 73–78, 2002

PIZZARELLO L.D., Jakobiec F.A. **Bowen's disease of the conjunctiva: a misomer.** In: Jakobiec F.A., editor. *Ocular adnexal tumors*. Aesculapius; Birmingham, AL: 1978. pp. 553–571.

POOLE T.R. **Conjunctival squamous cell carcinoma in Tanzania.** *Br J Ophthalmol*. 1999;83:177–179.[PMC free article][PubMed].

PYEON, D. *et al.* **Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression.** *PLoS Pathog*, v. 5, n. 2, p. e1000318, 2009.

RIETHDORF, S. *et al.*, **P16 INK4A Expression as Biomarker for HPV 16 – Related Vulvar Neoplasias.** *J. Human Pathology*, v. 35, 2004. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, v. 48, n. 1, p. 73–78, 2002.

RODEN, R. *et al* **Interaction of papillomaviruses with the cell surface.** *J. Virol.*, v. 68, n.11, p. 7260–7266, 1994.

SAEGUSA M, Takano Y, Hashimura M, Okayasu I, Shiga J (1995). **HPV tipo 16 em papiloma conjuntival e juncional, displasia e carcinoma de células escamosas.** J Clin Pathol 48: 1106-1110.

SAPP, M.; DAY, P. M. **Structure, attachment and entry of polyoma-and papillomaviruses.** Virology, v. 384, n. 2, p. 400–409, 2009.

SCOTT I.U, Karp C.L, Nuovo G.J (2002). **Exposição de papilomavírus humano 16 e18 em neoplasia intra-epitelial conjuntival.** Oftalmologia 109: 542-547 CrossRef PubMed Google Scholar.

SCOTT IU, Karp CL, Nuovo GJ. **Human papillomavirus 16 and 18 expression in conjunctival intraepithelial neoplasia.** Ophthalmology. 2002;109:542–547. [PubMed].

SHAFTI-KERAMAT, S. et al. **Bovine papillomavirus type 1 (BPV1) and BPV2 are closely related serotypes.** Virology, v. 393, n. 1, p. 1–6, 2009.

SHIELDS CL, Alset AE, Boal NS, et al. **Conjunctival tumors in 5002 cases. Comparative analysis of benign versus malignant counterparts. The 2016 James D. Allen Lecture.** Am J Ophthalmol. 2017;173:106–133

SHIELDS CL1, Chien JL1, Surakiatchanukul T1, Sioufi K1, Lally SE1, Shields JA1. **Conjunctival Tumors: Review of Clinical Features, Risks, Biomarkers, and Outcomes-- The 2017 J. Donald M. Gass Lecture.** Asia Pac J Ophthalmol (Phila). 2017 Mar-Apr;6(2):109-120.

SHIELDS CL, Demirci H, Karatza E, et al. **Clinical survey of 1643 melanocytic and nonmelanocytic tumors of the conjunctiva.** Ophthalmology. 2004;111:1747–1754.

SHIELDS CL, Shields JA. **Conjunctival tumors in children.** Curr Opin ophthalmol. 2008;18:351–60.[PubMed].

SHIELDS JA, Shields AL. **Atlas of Eyelid and Conjunctival Tumors.** Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 1999.

SHIELDS CL and Shields JA. **MAJOR REVIEW Tumors of the Conjunctiva and Cornea.** SURVEY OF OPHTHALMOLOGY VOLUME 49 • NUMBER 1 • JANUARY–FEBRUARY 2004.

SOUTO, R.; FALHARI, J. P. B.; CRUZ, A. D. **O papilomavírus humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias**. Rev Bras Cancerol, v. 51, n. 2, p. 155-60, 2005.

SLAMOVITS T. **Basic and Clinical Science Course**. Section 8, 1996-1997. San Francisco: American Academy of Ophthalmology, 1996. p.275-8.

STEPHEN GICHUHI, Mandeep S Sagoo, Helen A Weiss, Matthew J Burton
STRAND, A.; RYLANDER, E. **Human papillomavirus: subclinical and atypical manifestations**. Dermatol. Clin., 16:817-22, 2014.

STEPHEN GICHUHI, Mandeep S Sagoo, Helen A Weiss, Matthew J Burton.
Epidemiology of ocular surface squamous neoplasia in Africa
Trop Med Int Health. 2013 Dec; 18(12): 1424–1443. Published online 2013 Oct 30. doi: 10.1111/tmi.12203.

SZWARCWALD CL. et al. **HIV testing during pregnancy: use of secondary data to estimate 2006 test coverage and prevalence in Brazil**. The Brazilian Journal of Infectious Diseases. 2008;12(3):167-72.

TABORDA W.C, Ferreira S.C, Rodrigues D, Stávale J.N, Baruzzi R.G.
Rastreamento do câncer de colo uterino em índias do Parque Indígena do Xingu, Brasil central. Rev Panam Salud Pública 2000;7(2):92-6.

TORNESELLO ML, Duraturo ML, Waddell KM, et al. **Evaluating the role of human papillomaviruses in conjunctival neoplasia**. Br J Cancer. 2006;94:446–449. [PMC free article] [PubMed].

TULVATANA W, Bhattarakosol P, Sansopha L, Sipiyarak W, Kowitdamrong E, Paisuntornsug T, Karnsawai S (2003). **Fatores de risco para neoplasia de células escamosas conjuntivais: um estudo de caso-controle combinado**. Br J Ophthalmol 87: 396-398.

TUNC M, Char DH, Crawford B, Miller T. **Intraepithelial and invasive squamous cell carcinoma of the conjunctiva: analysis of 60 cases**. Br J Ophthalmol. 1999;83:98–103. [PMC free article] [PubMed].

WABINGA H.R, Parkin DM, Wabwire-Mangen F, Namboozee S. **Trends in cancer incidence in Kyadondo County, Uganda. 1960–1997**. Br J Cancer. 2000;82:1585–1592. [PMC free article] [PubMed].

WANG, L.; PAN, Q.; ZHANG, L.; XUE, Q.; CUI, J.; QI, C. **Investigation of bacterial microorganisms in the conjunctival sac of clinically normal dogs and dogs with ulcerative keratitis in Beijing, China.** Veterinary Ophthalmology, EUA, v. 11, n. 3, p. 145 – 149, 2008.

WARNER MA, Jakobiec FA. **Conjunctival diseases: Tumors.** In: Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ, editors. Cornea. St Louis, MO: Anne Patterson; 1997. pp. 701–704.

WERNES BA1, Levine AJ, Howley PM. **Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53.** Science. 1990 Apr 6;248(4951):76-9.

WESTFALL M.D, Pietenpol J.A (2004). **P63: complexidade molecular no desenvolvimento e câncer.** Carcinogênese 25: 857-864.

WILSON, V. G. et al. **Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features.** V. Genes, v. 24, n. 3, p. 275–290, 2002.

XU, Y.F. et al. **Papillomavirus virus-like particles as vehicles for the delivery of epitopes or genes.** Arch. Virol., v. 151, n. 11, p. 2133–2148, 2006.

ZAMORA, P. C. et al. **Effect of Human Papillomavirus on Cell Cycle-Related Proteins** p16, Ki-67, Cyclin D1, p53, and ProEx C in Precursor Lesions of

ZHENG, Z.-M.; BAKER, C. C. **Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation.** Front Biosci., v. 11, p. 2286–2302, 2006.

Zieske J.D (2002) **Expressão de inibidores de cinase dependentes de ciclina durante o reparo da ferida da córnea.** Prog Retin Eye Res 19: 257-270.

Zur Hausen H. **Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application.** Nat Rev Cancer. 2002; 2: 342-350. Doi: 10.1038 / nrc798. [PubMed] [Cross Ref]

ANEXO I – QUESTIONÁRIO CLÍNICO

ANEXO I
COLETA DE DADOS CLÍNICOS - CASOS
DADOS EPIDEMIOLÓGICOS
Registro do paciente:
Estado: () Ativo () Semi-ativo () Óbito
Nº Biópsia:
Data de Nascimento:
Sexo: () Masculino () Feminino
Raça: () Branco () Pardo () Negro () Amarelo () Indígena
Ocupação:
Comorbidades:
DADOS CLÍNICOS
Local da lesão: () OD () OE () AO () Sem dados
Quadrante: () Nasal () Temporal () Superior () Inferior () Outro
DADOS HISTOPATOLÓGICOS
Tamando das lesões:
Tempo entre o início dos sintomas e primeira abordagem:
Descrição do caso:
Neoplasia intra-epitelial conjuntival: () Alto grau () Baixo grau
Carcinoma Invasivo: () Sim () Não
Elastose solar: () Sim () Não
IMUNO-HISTOQUÍMICA
p16
p53
HIBRIDIZAÇÃO IN SITU CROMOGÊNICA (CISH)
HPV alto grau
HPV baixo grau

ANEXO II - PROTOCOLO ZYTOFAST PLUS - CISH IMPLEMENTATION KIT HRP-DAB (ZYTOVISION)

ZytoFast ® HPV type 6/11 Probe T-1055-400 ZytoFast ® HPV High-Risk (HR) Types Probe T-1140-400

REAGENTES NECESSÁRIOS:

- Cola para lamínulas
- ETOH 100%
- H₂O deionizada (milliQ) ou destilada
- Xilol
- Peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 30%
- Metanol 100%

EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS

- Banho maria 95°C e depois à 55°C
- Placa quente ou estufa
- Frascos 50 e 80 ml
- Câmara úmida (ThermoBright) programada para:
37°C - 3 minutos e 30 segundos;
75°C – 5 minutos;
55°C – 2 horas
- Pipetas, Lamínulas

SOLUÇÕES PARA PREPARAR ANTES DE INICIAR A MARCAÇÃO:

1) H₂O₂ 3%

- Diluir 1 parte de H₂O₂ 30% em 9 partes de metanol 100%
- Ex: para volume final de 100ml, usar 10ml de H₂O₂ e 90 ml de metanol 100%

2) WASH BUFFER TBS [1 X]

- Diluir 1 parte da solução WB5 do kit (solução Wash Buffer TBS [20x]) em 19 partes de H₂O destilada ou deionizada
- Aquecer a 55°C para uso
- Preparar no dia da marcação
- Se sobrar solução, usar no máximo até uma semana do preparo.

3) DAB

- 1 ml da solução SB1b (DAB solution B) + 1 gota da solução SB1a (DAB solution A)
- Usar à temperatura ambiente

PS → AQUECER A SOLUÇÃO PT2 (HEAT PRETREATMENT SOLUTION EDTA) A 95°C

PS → SOLUÇÕES DEVEM SER MANTIDAS À TEMPERATURA AMBIENTE:

- ES1 (PEPSIN SOLUTION)
- AB1 (MOUSE ANTI-DIG)
- AB2 (ANTI-MOUSE HRP POLYMER)
- CS2 (NUCLEAR BLUE SOLUTION)
- MT4 (MOUNTING SOLUTION)

PRÉ-TRATAMENTO

1. Incubar as lâminas contendo os cortes de tecido parafinados por 10 minutos a 70°C (estufa ou placa quente)
2. Incubar lâminas em **XIOL** - 2 x 5 minutos
3. Incubar lâminas em **ETOH 100%**, 3 x 3 minutos
4. Incubar lâminas 10 minutos em **H₂O₂ 3%**
5. Lavar lâminas 3 x 1 minuto em **H₂O** deionizada ou destilada e secar o excesso de H₂O
6. Aplicar 1 gota da solução **ES1 pepsina** sobre o tecido na lâmina e **incubar por EXATOS 3 MINUTOS E 30 SEGUNDOS - 37°C , NA CÂMARA ÚMIDA** (ThermoBright)

ATENÇÃO!!! ESSE PASSO DEVE SER EXTREMAMENTE PRECISO, PARA A PEPSINA NÃO DIGERIR TODO O TECIDO!!!!

7. Lavar lâminas em **H₂O** deionizada ou destilada
8. Aquecer a solução **PT2 num frasco**, 95°C
9. Colocar os slides no frasco contendo a solução **PT2** a 95°C, incubar por 15 minutos
10. Lavar lâminas em **H₂O** deionizada ou destilada e secar o excesso de H₂O

DENATURAÇÃO E HIBRIDAÇÃO

1. Vortexar a sonda (**HPV type 6/11 Probe e HPV High-Risk (HR) Probe**) e pipetar 10 ul de cada sonda correspondente sobre o tecido em cada lâmina, evitar bolhas
2. Cobrir as lâminas com lamínulas, selar com a cola própria para isso
3. Denaturar as lâminas a 75°C por 5 minutos
4. Hibridizar as lâminas na câmara unida 55°C por 2 horas

PÓS-HIBRIDIZAÇÃO E DETECÇÃO

1. Remover CUIDADOSAMENTE a cola da lâmina e lamínula
2. Remover CUIDADOSAMENTE a lamínula em um frasco contendo a **solução Wash Buffer TBS [1x] a 55°C, 5 minutos**, ou até que a lamínula se solte
3. Lavar as lâminas em solução **Wash Buffer TBS [1x], 55°C- 5 minutos**
4. Lavar as lâminas em solução **Wash Buffer TBS [1x] - temperatura ambiente**
5. Aplicar gotas da solução **AB1** (até cobrir tecido), incubar na câmara úmida a **37°C - 30 minutos**
6. Lavar 3 x 1 minuto na solução **Wash Buffer TBS [1x] - temperatura ambiente**
7. Aplicar gotas da solução **AB2 nas lâminas** e incubar na câmara úmida a **37°C - 30 minutos**
8. Lavar 3 x 1 minuto na solução **Wash Buffer TBS [1x] - temperatura ambiente**
9. Entre as lavagens preparar a DAB SOLUTION (1ml SB1b + 1 gota SB1a)
DEIXAR NO ESCURO => DAB É CANCERÍGENO : USAR LUVAS!!!!
10. Aplicar gotas da **DAB SOLUTION** até cobrir tecido em cada lâmina e incubar 20 minutos, temperatura ambiente.
11. Lavar lâminas em H2O corrente por uns 2 minutos
12. Recobrir a superfície dos tecidos em cada lâmina com a solução **CS2** (Nuclear Blue Solution), por 5 minutos
13. Lavar lâminas em H2O corrente por uns 2 minutos

14. Desidratar os tecidos, passando as lâminas em banhos de [] crescente de ETOH:

70% > 85% > 95% > 100% (1) e 100% (2) ➔ 2 minutos cada

15. Incubar 2 x 2 minutos em XILOL

Deixar secar bem a lâmina

16. Recobrir a lâmina com meio de montagem (MT4) e cobrir com lamínula; deixar secar e olhar no microscópio.

ANEXO III – PARECER DE APROVAÇÃO

Continuação do Parecer: 2.281.221

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_835463.pdf	04/09/2017 16:47:07		Aceito
Outros	Carta_Resposta_ao_CEP.pdf	04/09/2017 16:46:29	Fernando Chahud	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEC_Conjuntiva_versao_3_0_0_9_2017.pdf	04/09/2017 16:42:21	Fernando Chahud	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_versao_2.pdf	04/09/2017 16:38:57	Fernando Chahud	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	04/09/2017 14:31:37	Fernando Chahud	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEC_Conjuntiva_final4.pdf	28/08/2017 15:19:39	Fernando Chahud	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	28/08/2017 15:07:55	Fernando Chahud	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRÃO PRETO, 15 de janeiro de 2018

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
 (Coordenadora)