

**DETERMINAÇÃO DOS PADRÕES DA MICROSCOPIA  
CONFOCAL *IN VIVO* NO MELANOMA CUTÂNEO E NEVO  
MELANOCÍTICO COMUM: COMPARAÇÃO COM A  
DERMATOSCOPIA E HISTOPATOLOGIA EM CORTES  
PERPENDICULARES E TRANSVERSAIS**

**JULIANA CASAGRANDE TAVOLONI BRAGA**

**Tese apresentada à Fundação Antônio  
Prudente para obtenção do Título de Doutor  
em Ciências**

**Área de concentração: Oncologia**

**Orientadora: Dra. Gisele Gargantini Rezze**

**Co-orientadora: Dra. Maria Dirlei Ferreira de  
Souza Begnami**

**São Paulo**

**2014**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Braga, Juliana Casagrande Tavoloni

**Determinação dos padrões da microscopia confocal *in vivo* no melanoma cutâneo e nevo melanocítico comum: comparação com a dermatoscopia e histopatologia em cortes perpendiculares e transversais** / Juliana Casagrande Tavoloni Braga – São Paulo, 2014.

88p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração:  
Oncologia.

Orientadora: Gisele Gargantini Rezze

Descritores: 1. DERMATOSCOPIA. 2. MICROSCOPIA CONFOCAL.  
3. MELANOMA. 4. NEVOS E MELANOMAS.

## DEDICATÓRIA

Ao meu esposo Flávio  
Às minhas filhas Manuela e Maria

“Meus amores. Obrigada por fazerem parte da minha vida”

## **AGRADECIMENTOS**

### **A Deus**

“Agradeço por estar sempre ao meu lado.”

### **Ao meu querido esposo Flávio**

“Por me mostrar o verdadeiro significado da palavra amor. Agradeço o companheirismo, incentivo, apoio e suporte emocional, além dos sacrifícios e concessões. Agradeço o cuidado comigo e com nossas filhas.”

### **Às minhas filhas Manuela e Maria**

“Por iluminarem a minha vida. Com vocês aprendi o que é o amor incondicional.”

### **Aos meus pais Alexandre e Maria Cecília**

“Pelo incentivo ao meu crescimento pessoal e profissional. Agradeço o amor e cuidado com as minhas filhas.”

### **À minha irmã Mariana**

“Agradeço o carinho e a eterna amizade.”

### **À Professora Dra. Gisele Gargantini Rezze**

“Um exemplo profissional a ser seguido. Dermatologista brilhante. Agradeço a amizade, ensinamentos diários e o papel fundamental na realização desse trabalho. Agradeço as oportunidades a mim oferecidas e o constante incentivo à minha carreira. Minha gratidão e respeito.”

### **À Dra. Maria Dirlei Ferreira de Souza Begnami e ao Departamento de Anatomia Patológica do A.C. Camargo Cancer Center**

“Agradeço o apoio e a colaboração na realização desse projeto.”

**À Dra. Mariana Petaccia Macedo**

“Por toda a ajuda, comprometimento com o meu trabalho e disponibilidade constante.”

**Ao Dr. João Pedreira Duprat**

“Agradeço a confiança em meu trabalho e o apoio à minha pesquisa.”

**Ao Severino**

“Por confeccionar as lâminas com perfeição e alegria.”

**À querida amiga Juliana Arêas**

“Pela amizade verdadeira e sincera. Por acreditar na minha capacidade e pelo incentivo constante.”

**À querida amiga Juliana Machado**

“Pela amizade e por estar sempre ao meu lado, compartilhando sua vida e família comigo.”

**À Suely Francisco e à Ana Paula**

“Pela estimada ajuda na formatação final da dissertação.”

**A todos os meus colegas do Núcleo de Câncer da Pele e Dermatologia do A.C. Camargo Cancer Center: André Molina, Marco Antônio de Oliveira, Adriana Mendes, Bianca Costa S. Sá, Elimar Gomes, Ivana Lameiras, Eduard Brechtbühl, Fernando Parro, Marcelo Inada, Mariane Campagnari, Débora Castanheira, Eduardo Bertolli, Tatiana Blumetti, Cristiano Horta e Fernanda Berti Mendes** pelo apoio profissional e pela ajuda imprescindível na realização dessa pesquisa.

**À toda equipe do Núcleo de Câncer da Pele e Dermatologia do A.C. Camargo Cancer Center** pelo auxílio na realização desse projeto.

**À Ana Cláudia Machado Urvanegia** por toda a ajuda e comprometimento com o meu trabalho.

**À Celina Ponte e Claudia Melotti** pelo apoio e compreensão durante o período de realização dessa pesquisa.

**Aos amigos do doutorado Adriana, Thais, Raquel e Diego** pela ajuda na realização desse projeto.

**À equipe do centro cirúrgico ambulatorial do A.C. Camargo Cancer Center, Gilmar, Sabrina, Arthur, Cecília, Quitéria e Marcos** pela ajuda na realização desse projeto.

**Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares**, pelo excelente trabalho à frente da pós-graduação. Exemplo de academicismo.

**Às Sras. Ana Maria Kuninari, Luciana Pitombeira e Vanuza Barros** pelo suporte durante todo o curso de Pós-Graduação.

**Aos pacientes**, objetivo maior de toda atividade científica.

Às pessoas que direta ou indiretamente auxiliaram no desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

## RESUMO

Braga JCT. **Determinação dos padrões da microscopia confocal *in vivo* no melanoma cutâneo e nevo melanocítico comum: comparação com a dermatoscopia e histopatologia em cortes perpendiculares e transversais.** São Paulo; 2014. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

O melanoma cutâneo é uma neoplasia que acomete indivíduos jovens e apresenta comportamento agressivo quando diagnosticado tardiamente. Sendo assim, novos métodos diagnósticos auxiliares ao exame clínico, como a dermatoscopia e a microscopia confocal *in vivo* (MC), têm sido desenvolvidos com o objetivo de melhorar a acurácia diagnóstica desse tumor. Semelhante à dermatoscopia, a MC revela detalhes morfológicos da arquitetura tecidual no plano paralelo à pele e, além disso, fornece imagens instantâneas com alta magnificação e resolução celular. A realização de cortes histológicos transversais (mesmo plano da dermatoscopia e MC) poderia contribuir para melhor caracterizar os achados observados tanto na dermatoscopia quanto na MC. Não existem relatos na literatura médica comparando as características dermatoscópicas, a MC e os achados histopatológicos em cortes transversais. O objetivo deste estudo foi descrever a técnica para realização dos cortes histológicos transversais e comparar as principais características dermatoscópicas do melanoma cutâneo à MC e à histopatologia em cortes perpendiculares e transversais, no intuito de oferecer uma interpretação mais precisa dos achados celulares e arquiteturais observados *in vivo*. Foram avaliadas 65 lesões com diagnóstico dermatoscópico de melanoma cutâneo de 63 pacientes recrutados no Núcleo de Câncer de Pele e Dermatologia do A.C. Camargo Cancer Center no período de junho de 2011 a abril de 2013. Uma forma fácil, segura e confiável para a realização dos cortes histológicos transversais foi apresentada. Os aspectos celulares e arquiteturais no exame

de MC das principais características dermatoscópicas do melanoma cutâneo foram determinados e comparados aos achados histopatológicos nos cortes transversais e perpendiculares. A MC permitiu a identificação de uma nova estrutura chamada de “papila em mitocôndria” que pode representar um critério adicional para o diagnóstico do melanoma *in situ*. Os cortes histológicos transversais possibilitaram uma interpretação mais precisa dos principais achados na MC no melanoma cutâneo.



## SUMMARY

Braga JCT. **[Determination of confocal microscopy patterns *in vivo* in cutaneous melanoma and melanocytic nevi: comparison with dermoscopy and histopathology in perpendicular and transversal sections]**. São Paulo; 2014. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Cutaneous melanoma is a cancer that affects young individuals and shows aggressive behavior when diagnosed lately. Therefore, new diagnostic tools to unaided eye, such as dermoscopy and *in vivo* reflectance confocal microscopy (RCM), have been developed with the aim of improving the diagnostic accuracy of this tumor. Similarly to dermoscopy, RCM reveals morphological details of tissue architecture in parallel plane to the skin and, moreover, provides instant images with high magnification and cellular level resolution. The performance of transverse histopathological sections (same plane of dermoscopy and RCM) could help to better characterize the features observed in both dermoscopy and RCM. There are no reports in the medical literature comparing dermoscopic, RCM and histopathological features in transverse sections. The purpose of this study was to describe the technique for acquiring the transverse sections and compare the main dermoscopic features of cutaneous melanoma to the RCM and histopathology in perpendicular and transverse sections, in order to offer a more precise interpretation of the cellular and architectural features observed *in vivo*. This study included 65 lesions with dermoscopic diagnosis of cutaneous melanoma in 63 patients recruited at the Dermatology Center of the AC Camargo Cancer Center from June 2011 to April 2013. An easy, safe and reliable way for handle the transverse sections was presented. The RCM cellular and architectural aspects of the main melanoma dermoscopic features were determined and compared to histopathological findings in the transverse and perpendicular sections. We described a new structure called

“papillae in mitochondria” which may represent an additional clue for the melanoma *in situ* diagnosis. The transverse sections allowed a more precise interpretation of the main RCM features in cutaneous melanoma.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Imagens dermatoscópicas de algumas características encontradas nos melanomas cutâneos (10x).....	6
<b>Figura 2</b>	Imagem do aparelho de microscopia confocal Vivascope® 1500.....	10
<b>Figura 3</b>	Preparo para realização do exame de microscopia confocal....	11
<b>Figura 4</b>	Ilustração esquemática dos princípios físicos do microscópio confocal.....	13
<b>Figura 5</b>	Imagens da pele normal na microscopia confocal (0.5 x 0.5 mm).....	16
<b>Figura 6</b>	Comparação entre MC e histopatologia (cortes histológicos transversais) na pele normal.....	17
<b>Figura 7</b>	Realização do <i>punch</i> na peça cirúrgica.....	39
<b>Figura 8</b>	Dermatoscopia <i>ex vivo</i> .....	40
<b>Figura 9</b>	Método de Headington.....	47
<b>Figura 10</b>	Papilas não demarcadas.....	49
<b>Figura 11</b>	Melanoma extensivo superficial, Breslow 0,27 mm: rede pigmentar atípica.....	50
<b>Figura 12</b>	Melanoma extensivo superficial, <i>in situ</i> : rede pigmentar atípica.....	51

<b>Figura 13</b>	Melanoma extensivo superficial, <i>in situ</i> : rede pigmentar atípica.....	52
<b>Figura 14</b>	Papilas em mitocôndria.....	54
<b>Figura 15</b>	<i>Stack</i> das “papilas em mitocôndria” desde a epiderme até a derme papilar (A a F).....	55
<b>Figura 16</b>	Melanoma extensivo superficial, <i>in situ</i> : rede pigmentar atípica.....	56
<b>Figura 17</b>	Melanoma extensivo superficial, Breslow 0,26 mm: rede pigmentar atípica.....	57
<b>Figura 18</b>	Melanoma extensivo superficial, <i>in situ</i> : rede pigmentar atípica.....	58
<b>Figura 19</b>	Melanoma extensivo superficial, Breslow 1,0 mm: glóbulos irregulares.....	60
<b>Figura 20</b>	Melanoma extensivo superficial, Breslow 10,0 mm: glóbulos irregulares.....	61
<b>Figura 21</b>	Melanoma extensivo superficial, <i>in situ</i> : estrias radiadas.....	63
<b>Figura 22</b>	Melanoma extensivo superficial, Breslow 0,5 mm: estrias radiadas.....	64
<b>Figura 23</b>	Melanoma extensivo superficial, Breslow 1,0 mm: pseudópodes.....	66

<b>Figura 24</b>	Melanoma extensivo superficial, Breslow 10,0 mm: pseudópodes.....	67
<b>Figura 25</b>	Melanoma extensivo superficial, Breslow 0,5 mm: <i>blotch</i> .....	69
<b>Figura 26</b>	Melanoma extensivo superficial, Breslow 1,75 mm: <i>blotch</i> .....	70
<b>Figura 27</b>	Melanoma extensivo superficial, Breslow 5,3 mm: véu azul-esbranquiçado.....	72
<b>Figura 28</b>	Melanoma extensivo superficial, Breslow 2,1 mm: véu azul-esbranquiçado.....	73
<b>Figura 29</b>	Melanoma extensivo superficial, Breslow, 1,75 mm: <i>peppering</i> .....	75
<b>Figura 30</b>	Melanoma extensivo superficial, Breslow 1,55 mm: área de despigmentação.....	76

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

<b>Tabela 1</b>	Classificação em relação ao sexo.....	41
<b>Tabela 2</b>	Classificação em relação à raça.....	41
<b>Tabela 3</b>	Classificação em relação à localização anatômica.....	42
<b>Tabela 4</b>	Classificação em relação ao diagnóstico anatomopatológico.....	42
<b>Tabela 5</b>	Classificação em relação ao tipo histológico.....	42
<b>Tabela 6</b>	Classificação em relação à profundidade de infiltração (Breslow).....	43
<b>Tabela 7</b>	Classificação em relação às características anatomopatológicas.....	44
<b>Tabela 8</b>	Características dermatoscópicas analisadas.....	44
<b>Quadro 1</b>	Características dermatoscópicas do melanoma cutâneo.....	5
<b>Quadro 2</b>	Características da pele normal na Microscopia Confocal (MC)...	15
<b>Quadro 3</b>	Definição dos critérios dermatoscópicos visualizados nos melanomas cutâneos e suas características na MC <i>in vivo</i> e em cortes histológicos transversais e perpendiculares.....	77

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1	Definição.....	1
1.2	Dermatoscopia .....	3
1.2.1	Características dermatoscópicas das lesões melanocíticas.....	4
1.3	Limitações da Dermatoscopia e Importância da Microscopia Confocal <i>in vivo</i> (MC) .....	7
1.4	Microscopia Confocal (MC) .....	8
1.4.1	Realização do exame e princípios físicos.....	9
1.4.2	Microscopia confocal da pele normal .....	14
1.4.3	Microscopia confocal nos Melanomas cutâneos .....	17
1.5	Características Dermatoscópicas, da Microscopia Confocal e Histopatologia em Cortes Perpendiculares nas Lesões Melanocíticas: o que se sabe Atualmente .....	19
1.5.1	Rede pigmentar .....	20
1.5.2	Glóbulos pigmentados.....	21
1.5.3	Pontos pigmentados.....	22
1.5.4	Estrias radiadas.....	22
1.5.5	Pseudópodes.....	22
1.5.6	Hipopigmentação irregular.....	23
1.5.7	Áreas de hiperpigmentação ou <i>blotches</i> .....	23
1.5.8	Véu azul-esbranquiçado .....	23
<b>2</b>	<b>ARTIGO 1</b> .....	<b>26</b>
<b>3</b>	<b>ARTIGO 2</b> .....	<b>35</b>
<b>4</b>	<b>COMENTÁRIOS</b> .....	<b>38</b>
4.1	Resultados.....	38
4.2	Discussão .....	45

4.3	Possibilidades de Publicações Futuras .....	80
5	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>82</b>
6	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>83</b>

### **ANEXOS**

- Anexo 1** Definição dos critérios dermatoscópicos e suas características em cortes histológicos perpendiculares e transversais e características na microscopia confocal *in vivo*.
- Anexo 2** Termo de informação e consentimento livre e esclarecido
- Anexo 3** Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP
- Anexo 4** Quadro geral descritivo de todos os casos incluídos nesse estudo, contendo: localização da lesão, diagnósticos clínico, dermatoscópico, confocal e anatomopatológico, e características dermatoscópicas avaliadas.
- Anexo 5** Cartas de aceitação das revistas



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 DEFINIÇÃO

O melanoma cutâneo é uma neoplasia que se origina dos melanócitos localizados na camada basal da epiderme. Nos últimos dez anos, sua incidência tem dobrado mundialmente, principalmente em pacientes de pele clara (LORENTZEN et al. 1999).

As maiores taxas de incidência e mortalidade mundial encontram-se na Austrália. Neste país, é o câncer mais comum em homens e o segundo em mulheres, na faixa etária de 15 a 44 anos, sendo considerado um problema de saúde pública (MARKS 2002).

No Brasil, dados do Instituto Nacional de Câncer - INCA revelam que a incidência nacional de melanoma pode alcançar um índice de até 8,61 por 100.000 habitantes, sendo estimados 5890 novos casos para o ano 2014. A maior taxa de incidência encontrada está no Estado de São Paulo (Ministério da Saúde 2014).

No A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, o número de casos novos por ano é de aproximadamente 200 pacientes, ou seja, 10 casos novos por 2.000 atendimentos mensais (dados não publicados).

O melanoma cutâneo é uma neoplasia que acomete indivíduos jovens e apresenta comportamento agressivo, mostrando-se refratário aos tratamentos atuais (quimio e radioterapia) quando há o desenvolvimento de

metástases (REZZE et al. 2006a; MACKIE et al. 2009). A sobrevivência do melanoma está associada ao estadió da doença e depende basicamente da profundidade da lesão na pele. Sendo assim, a estratégia disponível para reduzir a mortalidade está relacionada à excisão completa do tumor em sua fase inicial de desenvolvimento e é bem estabelecida a necessidade do diagnóstico precoce (ARGENZIANO et al. 2008; RIGEL et al. 2010).

Os principais fatores de risco são história pessoal e familiar dessa neoplasia e exposição à radiação ultravioleta. Fatores de risco relacionados ao fenótipo incluem a presença de nevos atípicos e a síndrome do nevo atípico (BERWIK et al. 2009).

O exame clínico do melanoma cutâneo baseia-se na regra do ABCD: A: assimetria, B: bordas irregulares, C: cores variadas, D: diâmetro > 6 mm (GOLDSMITH et al. 1992). A acurácia do diagnóstico clínico a olho nu foi estimada em aproximadamente 65 a 80%, dependendo da experiência do examinador (KITTLER et al. 2002; GERGER et al. 2005), sendo necessário métodos adicionais para aumentá-la (DAL POZZO et al. 1999; SOYER et al. 2001).

Nas últimas duas décadas houve disseminação de uma técnica de baixo custo e não invasiva para realização do diagnóstico precoce das lesões pigmentadas da pele, a dermatoscopia (ARGENZIANO et al. 2003). O exame dermatoscópico pode aumentar a acurácia diagnóstica do melanoma em aproximadamente 10% a 20% quando utilizado por profissionais experientes (MARGHOOB et al. 2003). Um recente estudo de metanálise mostrou que a dermatoscopia foi superior ao exame a olho nu na detecção

do melanoma, com sensibilidades de 90% e 71%, respectivamente, e especificidades de 90% e 81%, respectivamente (VESTERGAARD et al. 2008).

Atualmente, diferentes tecnologias estão sendo desenvolvidas no sentido de fornecer informação microscópica cutânea dinâmica adicional, sem morbidade. Elas possibilitam tanto o diagnóstico *in vivo* quanto a avaliação da evolução da doença em tempo real. A microscopia confocal *in vivo* (MC) ou microscopia confocal de reflectância *in vivo* é, provavelmente, a mais promissora dessas tecnologias. Muitos estudos têm demonstrado que a MC pode melhorar a acurácia na diferenciação entre lesões melanocíticas benignas e malignas, como método complementar à dermatoscopia (PELLACANI et al. 2007b; GERGER et al. 2008; GUITERA et al. 2009, 2012).

## **1.2 DERMATOSCOPIA**

A dermatoscopia, também chamada de microscopia de superfície, dermoscopia ou ainda, microscopia de epiluminescência, é um método não invasivo, *in vivo*, que permite a visualização de características morfológicas não observadas a olho nu, apresentando como principal indicação o diagnóstico das lesões pigmentadas da pele e, conseqüentemente, do melanoma cutâneo nas fases iniciais de evolução e infiltração (ARGENZIANO et al. 2003; PELLACANI et al. 2008). É uma técnica simples que utiliza um aparelho denominado dermatoscópio, o qual determina a

incidência de luz sobre a pele associada à lente com magnificação de 10 vezes.

As estruturas dermatoscópicas e as cores associadas à sua distribuição oferecem ajuda na diferenciação entre as lesões melanocíticas e não melanocíticas, além da diferenciação entre as lesões melanocíticas malignas e benignas (MALVEHY et al. 2007).

O conhecimento das características dermatoscópicas é de fundamental importância, pois é utilizado nos modelos elaborados para o diagnóstico das lesões pigmentadas da pele. Esses modelos diagnósticos propostos são utilizados de acordo com a preferência de cada profissional, sendo a regra do ABCD e a regra dos 7 pontos chamados de métodos semi-quantitativos e o método de Menzies e a Análise de padrões, métodos qualitativos (REZZE et al. 2006b; REZZE e SÁ 2008).

### **1.2.1 Características dermatoscópicas das lesões melanocíticas**

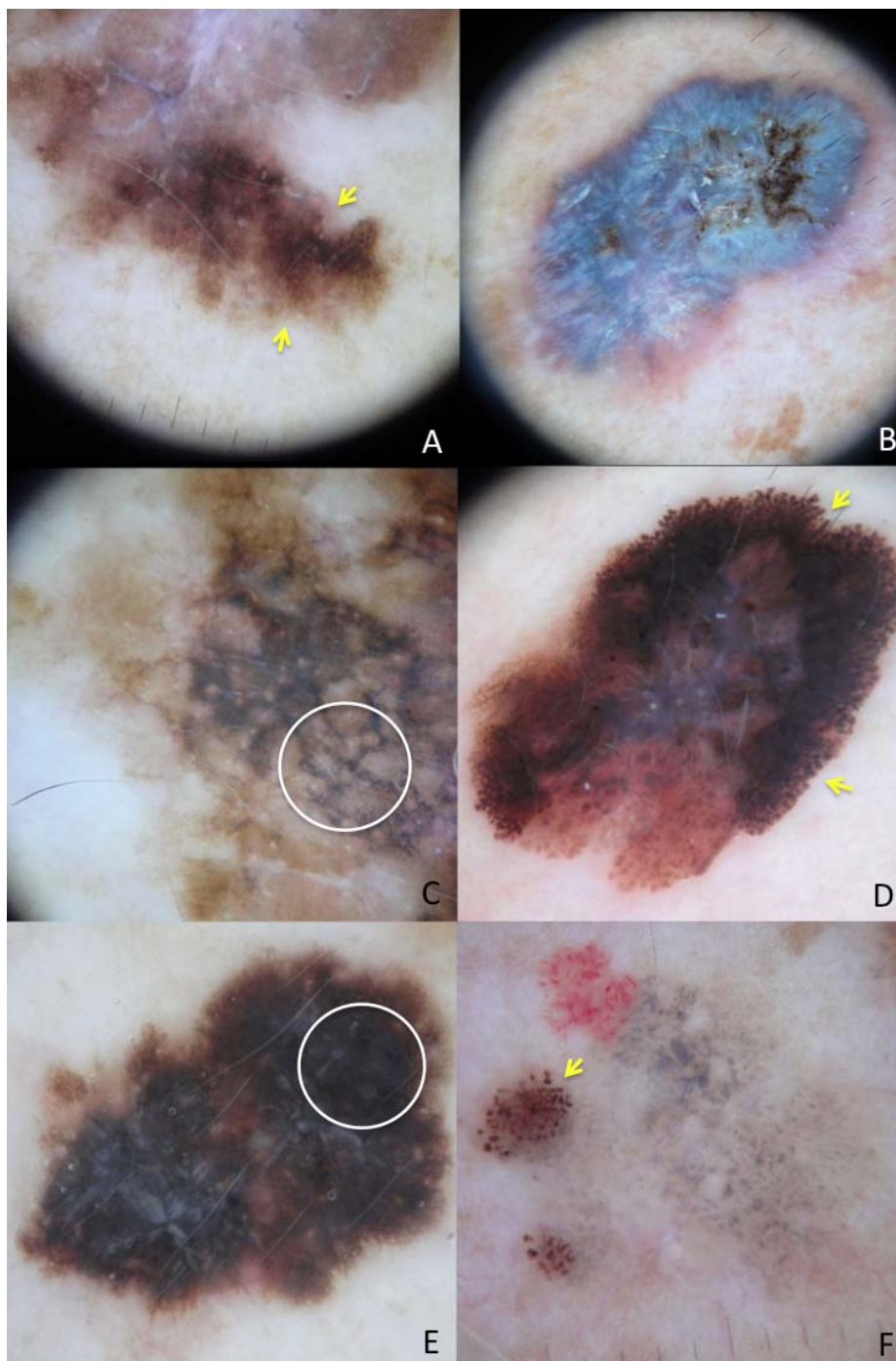
As características dermatoscópicas foram primeiramente padronizadas pelo Consenso de Hamburgo de 1989 e no ano 2000 foram atualizadas pelo *Consensus Net Meeting on Dermoscopy* (ARGENZIANO et al. 2003) e estão descritas no **Anexo 1**. Estas características foram comparadas aos achados microscópicos em cortes histológicos convencionais (perpendiculares à epiderme) em inúmeras publicações, gerando ocasional dificuldade de interpretação, pois as características vistas à dermatoscopia são em plano horizontal (YADAV et al. 1993; SCOPE et al. 2007a; PELLACANI et al. 2008). Por esta razão, REZZE et al. (2006a)

realizaram um trabalho que foi considerado pioneiro com o objetivo de comparar algumas das características dermatoscópicas aos achados histopatológicos em cortes transversais em lesões de melanoma cutâneo, com uma casuística de 23 casos. A importância deste trabalho foi a obtenção de uma metodologia eficiente para esta análise sem prejudicar o prognóstico do paciente, que se baseia fundamentalmente na medida da profundidade da lesão (índice de Breslow).

As características dermatoscópicas mais específicas dos melanomas cutâneos, descritas pelo método de Análise de Padrões, são: rede pigmentar atípica, glóbulos/pontos marrons irregulares, estrias radiadas, pseudópodes, véu azul-esbranquiçado, *blotch* ou borrão, estruturas de regressão (*peppering* e área de despigmentação), hipopigmentação irregular, pontos pretos periféricos, vasos polimorfos e rede pigmentar negativa (BAHMER et al 1990; ARGENZIANO et al. 2003; REZZE et al. 2006b; REZZE e SÁ 2008) **(Quadro 1 e Figura 1)**

#### **Quadro 1 – Características dermatoscópicas do melanoma cutâneo**

1. Rede pigmentar atípica
2. Glóbulos / pontos marrons irregulares
3. Estrias radiadas / pseudópodes
4. Véu azul-esbranquiçado
5. *Blotch* ou borrão
6. Estruturas de regressão (*peppering* e área de despigmentação)
7. Hipopigmentação irregular
8. Pontos pretos periféricos
9. Vasos polimorfos
10. Rede pigmentar negativa



**Figura 1** - Imagens dermatoscópicas de algumas características encontradas nos melanomas cutâneos (10x). **A.** As setas amarelas sinalizam área de rede pigmentar atípica. **B.** Véu azul-esbranquiçado. **C.** A área contida no círculo branco representa *peppering*. **D.** As setas amarelas apontam para as áreas de pseudópodes. **E.** A área contida no círculo branco representa área de *blotch*. **F.** A seta amarela mostra área de glóbulos irregulares.

### **1.3 LIMITAÇÕES DA DERMATOSCOPIA E IMPORTÂNCIA DA MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO* (MC)**

As limitações do exame dermatoscópico na realização do diagnóstico de lesões benignas com aspecto dermatoscópico sugestivo de melanoma cutâneo e de lesões de melanoma cutâneo com ausência de características dermatoscópicas específicas, levaram à utilização da MC como um método diagnóstico auxiliar não invasivo para o estudo *in vivo* das lesões clinicamente e/ou dermatoscopicamente duvidosas (GUITERA et al. 2009; BRAGA et al. 2009). O papel da MC não é substituir, mas sim complementar a dermatoscopia. A utilização da MC em lesões selecionadas pela dermatoscopia reduz a exérese desnecessária de lesões benignas com alta acurácia diagnóstica (ALARCON et al. 2013; STEVENSON et al. 2013).

A MC representa, para o médico treinado, uma ferramenta sensível e específica na detecção precoce do melanoma e de outros tumores cutâneos. Realizando-se os exames de forma metódica e utilizando-se os algoritmos de critérios diagnósticos, a MC permite uma avaliação arquitetural global da epiderme, junção dermo-epidérmica (JDE) e derme superficial, bem como uma avaliação citoarquitetural. Atipias celulares e pleomorfismos nucleares, podem ser visualizadas *in vivo* auxiliando no diagnóstico. Essa técnica mostra um grande potencial para aumentar a acurácia diagnóstica de lesões melanocíticas (PELLACANI et al. 2007b; GUITERA et al. 2009).

## 1.4 MICROSCOPIA CONFOCAL (MC)

A MC tem a finalidade de fornecer imagens instantâneas, em tempo real, de alta resolução, *in vivo*, permitindo a visualização das estruturas microanatômicas (células, núcleos e arquitetura tecidual) da pele em uma resolução próxima à histopatológica. As imagens obtidas por este método são em planos paralelos à pele, diferente dos cortes histológicos convencionais e, por esta razão, a correlação entre estes dois métodos é considerada um desafio (BUSAM et al. 2001; LANGLEY et al. 2001; SCOPE et al. 2007a).

Atualmente, os microscópios confocais representam uma oportunidade única no exame não invasivo da pele sem a necessidade de utilização dos marcadores fluorescentes ou corantes teciduais. O contraste das imagens confocais ocorre devido às variações naturais do índice de refração das organelas e microestruturas nas diferentes camadas da pele. A ceratina epidérmica, por exemplo, apresenta diferentes índices de refração dependendo do estado de diferenciação do ceratinócito. Conforme a maturação do ceratinócito na epiderme, o peso molecular da ceratina dentro deste aumenta, tornando-os mais refringentes, assim aumentando seu índice de refração e resultando em uma imagem confocal mais brilhante com ceratinócitos bem definidos (RAJADHYAKSHA et al. 1995).

A pigmentação melânica na epiderme também tem um índice de refração alto, de fato, maior que o dos ceratinócitos. Clínica e dermatoscopicamente a melanina é vista como uma coloração preta ou



marrom devido a absorção da luz visível. Quando iluminada pela luz infravermelha, a absorção é bem menor. Esta baixa absorção combinada ao seu alto índice de refração leva ao aumento da luz refletida e dispersada e, conseqüentemente, a melanina à MC aparece como uma coloração branca e brilhante (RAJADHYAKSHA et al. 1999).

Com a MC *in vivo* é possível a visualização não só dos ceratinócitos epidérmicos e dos melanócitos, mas também dos eritrócitos e leucócitos dos capilares da papila dérmica e bandas de colágeno na derme. A interpretação das imagens confocais baseia-se na morfologia celular e no reconhecimento de padrões, ainda em estudo, associados aos achados histopatológicos e dermatoscópicos (RAJADHYAKSHA et al. 1995).

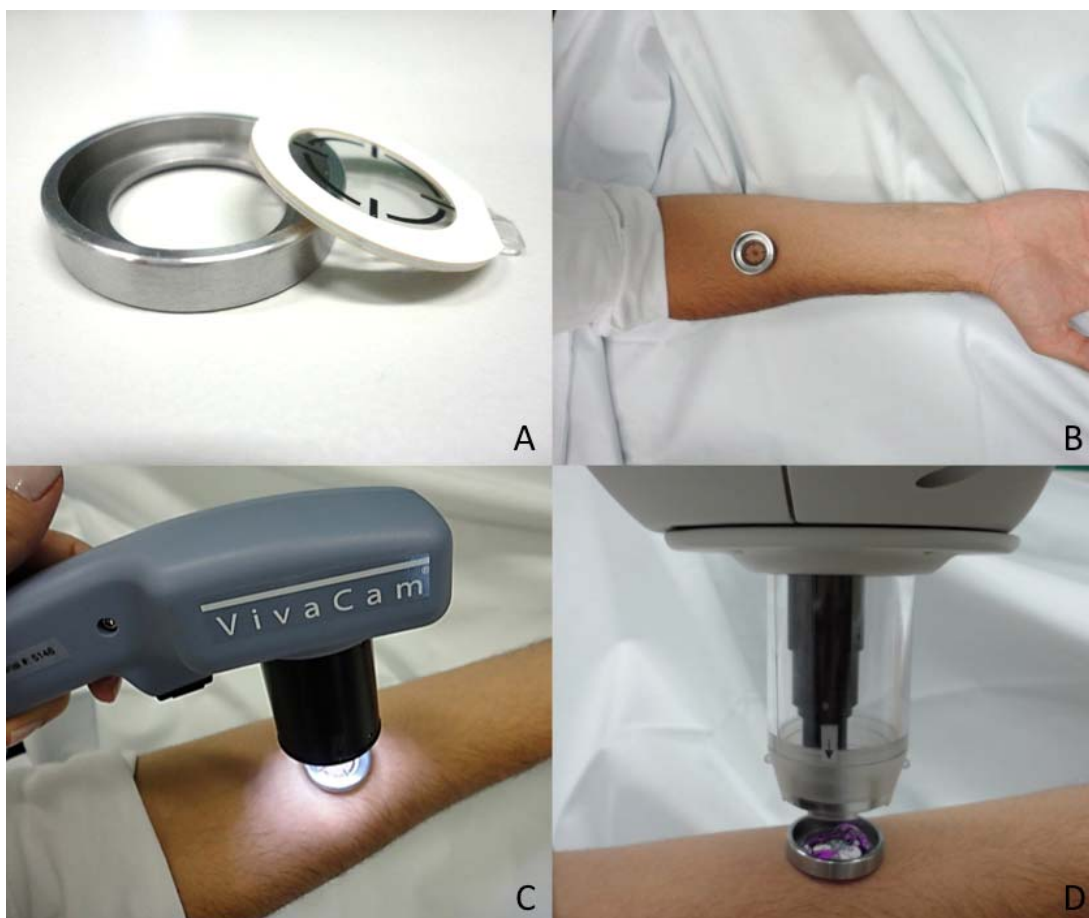
#### **1.4.1 Realização do exame e princípios físicos**

Para a realização do exame, seleciona-se a lesão cutânea de interesse e sobre ela é aplicado um anel metálico acoplado a um disco adesivo com o centro transparente utilizando-se um óleo na interface entre o anel e a pele.

O microscópio confocal possui um braço articulado que permite um melhor encaixe ao anel metálico. Utiliza-se também um gel na interface entre o anel e a lente do microscópio contida na extremidade do braço articulado para obtenção de uma imagem com melhor qualidade (**Figuras 2 e 3**).



**Figura 2** - Imagem do aparelho de microscopia confocal Vivascope® 1500.



**Figura 3** - Preparo para realização do exame de microscopia confocal. As imagens ilustram os passos mais importantes para a realização do exame com o aparelho Vivascope® 1500. **A.** Colar o anel plástico adesivo ao anel metálico. **B.** Após a aplicação do meio de imersão (geralmente óleo), fixar o anel à pele. **C.** Aquisição da imagem dermatoscópica. **D.** Adicionar gel de ultrassom ao anel metálico e acoplar a lente do microscópio.

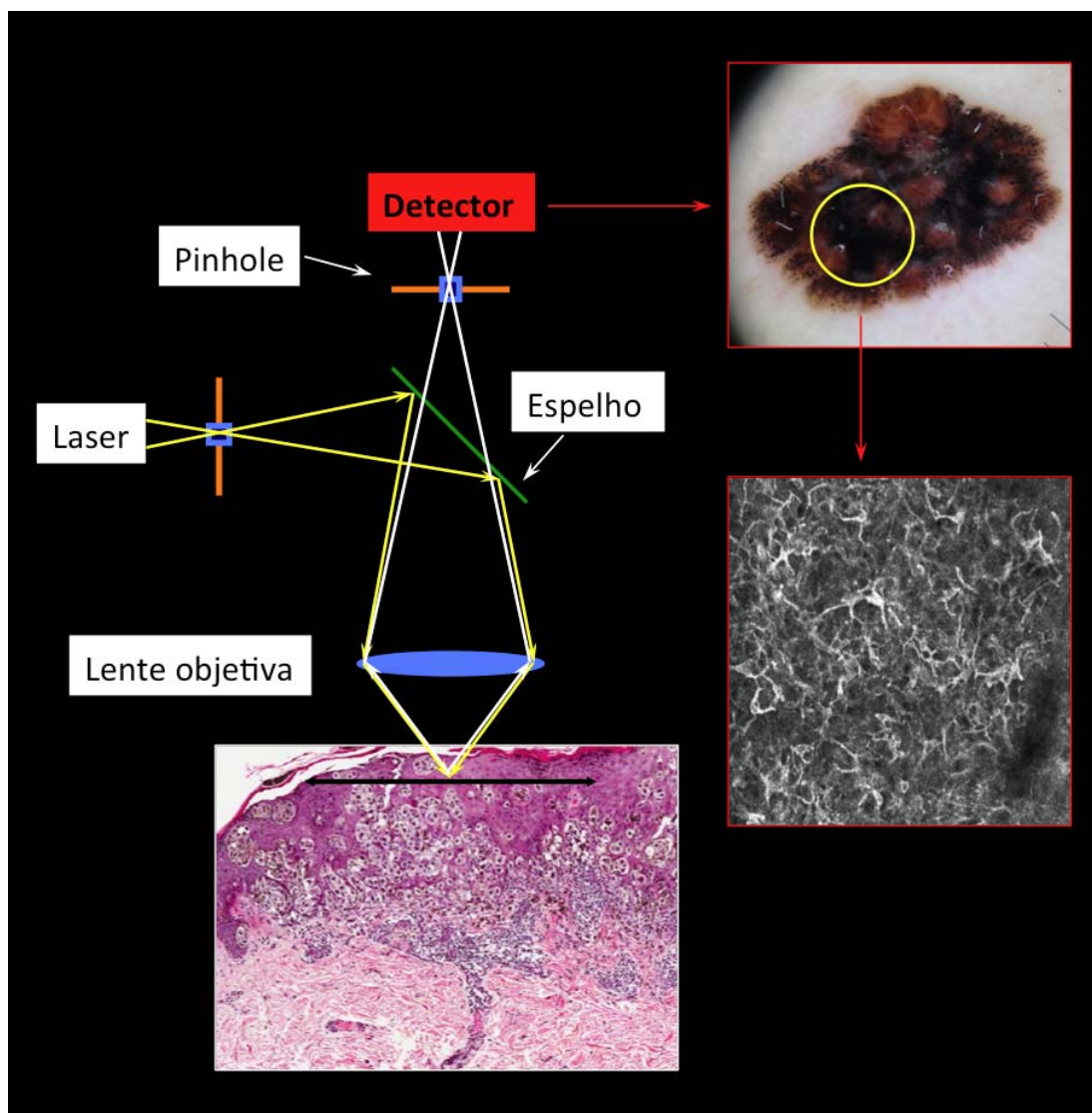
O índice de refração da epiderme é de aproximadamente 1.375 e o do estrato córneo é próximo de 1.470. A melanina tem um índice de refração por volta de 1.700. Para obter imagens de qualidade, é necessária a utilização de um fluido de contato com índice de refração entre 1.330 e 1.500. Assim, podem ser utilizado água ou gel de ultrassom (RAJADHYAKSHA et al. 1999).

Com a utilização do anel adesivo, a pele torna-se estável lateralmente e permite que a lente se movimente para que toda a lesão seja examinada. A luz laser incide sobre uma pequena área da lesão de interesse e é refletida e dispersada devido às variações no índice de refração de organelas e estruturas teciduais e devido aos elementos teciduais com o mesmo comprimento de onda da fonte de luz, resultando no contraste das imagens confocais (imagens em preto e branco) (NEHAL et al. 2008).

Utilizando-se o comprimento de luz de 830nm, os melanossomos e a melanina produzem intensa refração e dispersão. Assim, os melanócitos e os ceratinócitos basais, que são ricos em melanina e melanossomos, apresentam-se extremamente brilhantes (NEHAL et al. 2008).

As imagens obtidas com o microscópio confocal permitem a visualização de detalhes celulares das diferentes camadas da pele no plano horizontal com resolução lateral de 0,5 a 1,0  $\mu\text{m}$ , resolução axial entre 1 e 5  $\mu\text{m}$  (espessura da secção óptica) e uma profundidade máxima de 200 a 300  $\mu\text{m}$  (derme papilar) (MARGHOOB et al. 2003; RAJADHYAKSHA 2009).

Após passar pela lente objetiva, a luz incide sobre a área de interesse e é refletida e dispersada. A luz refletida e dispersada atravessa novamente a lente objetiva e alcança a abertura seletiva (*pinhole*) que impede a passagem da luz fora do foco (*out of focus*). A confocalidade do microscópio é proveniente, basicamente, do diâmetro da abertura seletiva (*pinhole*) que determina a resolução axial. Quanto menor a abertura, maior é a qualidade da imagem (RAJADHYAKSHA 2009) (**Figura 4**).



**Figura 4** - Ilustração esquemática dos princípios físicos do microscópio confocal.

O microscópio confocal disponível para comercialização é produzido pela Lucid-Tech, em Rochester, NY, EUA. O microscópio confocal Vivascope® 1500 utiliza uma lente objetiva de imersão em água (o índice de refração da água é semelhante ao índice de refração da epiderme, resultando em menor dispersão) com aumento de 30 vezes, com abertura de 0,9NA e sua imagem tem campo de visão de 0,5 x 0,5 mm. A imagem de todo o campo analisado pode ser capturada e armazenada. Os campos são

capturados em sequência formando uma imagem total (mosaico) com área de 4 x 4 mm (magnificação aproximadamente de 4X). Atualmente, este equipamento produz mosaicos com campos de visão de 8 x 8 mm (magnificação aproximadamente de 2X) (NEHAL et al. 2008).

O microscópio confocal também pode produzir imagens verticais (*Z stacks*) com a captura de sequência de imagens desde a superfície até a profundidade de 200  $\mu\text{m}$ . Com a utilização de um *software*, as imagens verticais podem ser animadas simulando imagens em tempo real *in vivo* (RAJADHYAKSHA 2009).

#### **1.4.2 Microscopia confocal da pele normal**

O estrato córneo consiste de células grandes (10-30  $\mu\text{m}$ ), poligonais, brilhantes e anucleadas e apresenta fissuras e rugas de coloração escura (dermatoglifos). A camada granulosa está localizada 15 - 20  $\mu\text{m}$  abaixo do estrato córneo e apresenta células brilhantes grandes (25 - 35  $\mu\text{m}$ ) com citoplasma granuloso e grande núcleo oval escuro. A camada espinhosa apresenta o padrão em "favo de mel" (*honeycomb*) com células poligonais (10 - 25  $\mu\text{m}$ ) com núcleo escuro, citoplasma brilhante e se localiza 20 - 100  $\mu\text{m}$  abaixo do estrato córneo. A camada suprapapilar (basal) é formada por células basais brilhantes contendo melanina e agrupadas na região do topo da papila configurando o padrão em "pedra de calçamento" (*cobblestone*).

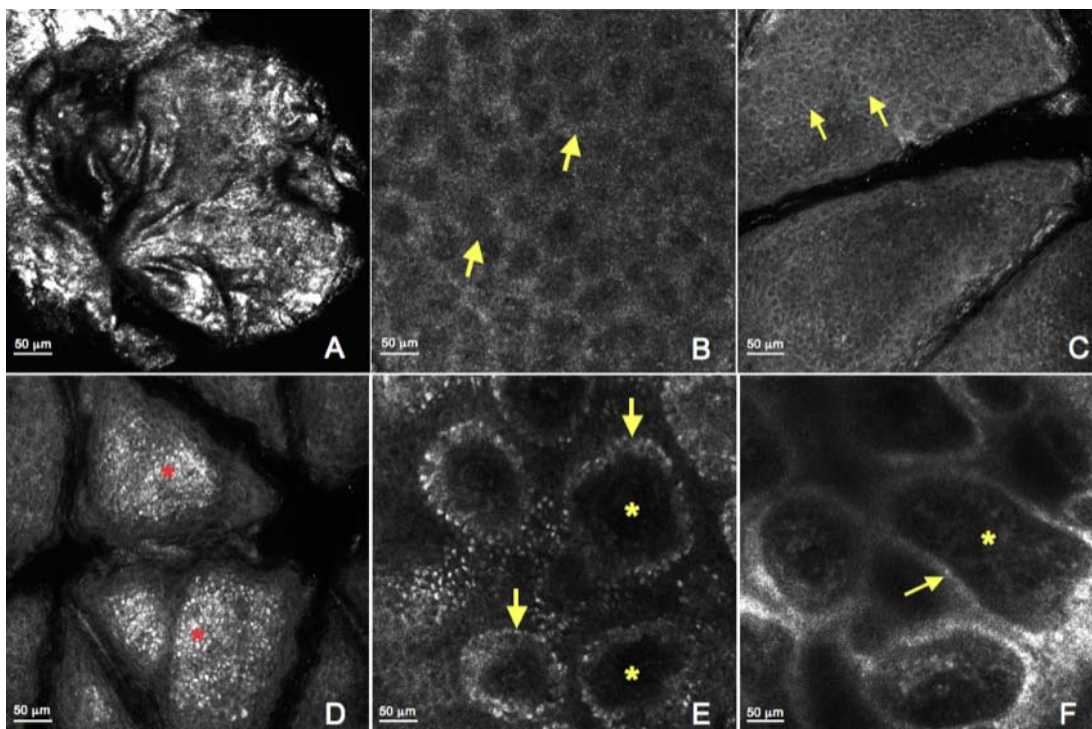
Na junção dermo-epidérmica (JDE), os melanócitos e os ceratinócitos basais (células pequenas de 7 - 12  $\mu\text{m}$ ) apresentam-se com formato redondo, formando anéis de células brilhantes ao redor de uma área escura

(padrão riniforme). Esta área escura corresponde à derme papilar com vasos centrais (CALZAVARA - PINTON et al. 2008; NEHAL et al. 2008).

Na derme papilar há fibras colágenas reticuladas ou em feixes e melanófagos ao redor de pequenos vasos. Os melanófagos apresentam-se como células grandes, globosas, com bordas definidas e brilhantes na derme superior (CALZAVARA - PINTON et al. 2008; NEHAL et al. 2008; MALVEHY et al. 2012) (**Quadro 2 e Figuras 5 e 6**).

#### **Quadro 2 - Características da pele normal na Microscopia Confocal (MC)**

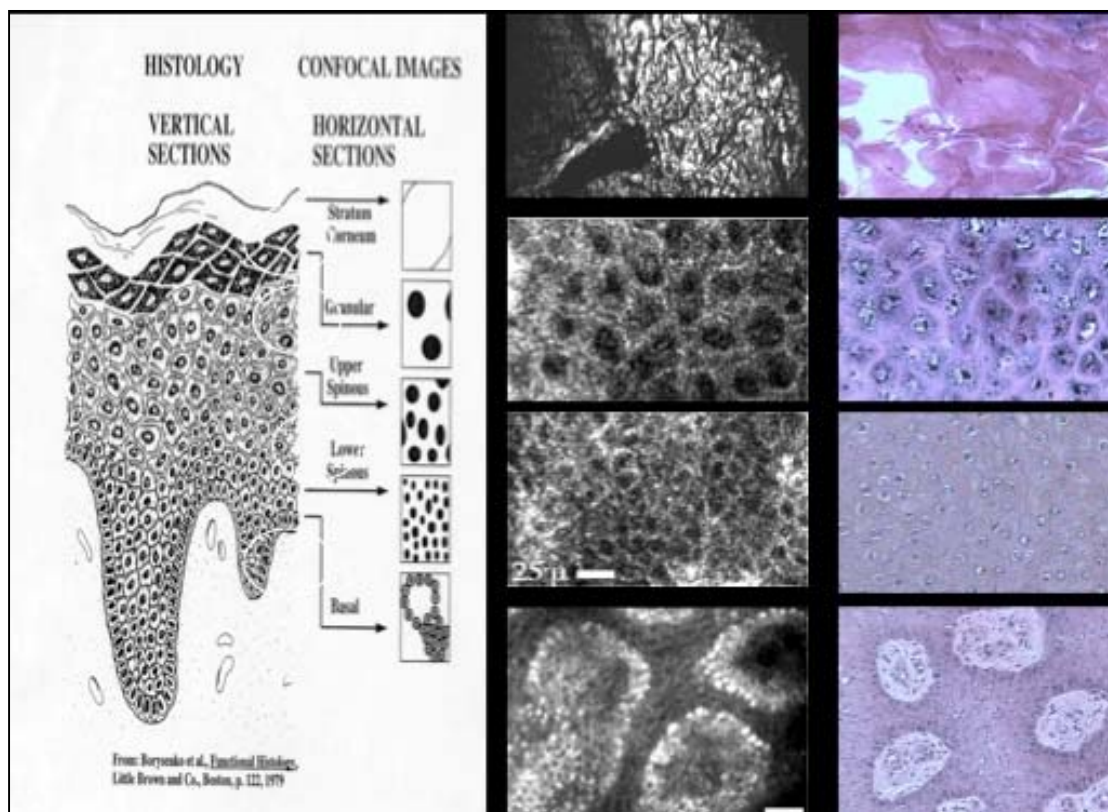
<p><b>1 – Camada epidérmica</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Estrato córneo: presença de células grandes poligonais brilhantes anucleadas</li> <li>2. Camada granulosa: células grandes brilhantes com citoplasma granuloso e núcleo oval escuro</li> <li>3. Camada espinhosa: padrão em “favo de mel”; células poligonais com núcleo escuro e citoplasma brilhante</li> <li>4. Camada basal: células basais brilhantes contendo melanina agrupadas no topo da papila formando o padrão em “pedra de calçamento”</li> </ol>
<p><b>2 – Junção dermo-epidérmica</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Melanócitos e ceratinócitos basais pequenos e com formato redondo formando anéis de células brilhantes ao redor de uma área escura (padrão riniforme)</li> </ol>
<p><b>3 – Derme papilar</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Fibras colágenas reticuladas ou em feixes</li> <li>2. Melanofagos: células grandes e brilhantes com bordas bem definidas ao redor de pequenos vasos</li> </ol>



**Figura 5** - Imagens da pele normal na microscopia confocal (0.5 x 0.5 mm).

**A.** O estrato córneo aparece como grupos de células brilhantes separadas por depressões cutâneas não-refletivas ou dermatoglifos. **B.** A camada granulosa apresenta padrão regular em “favo de mel” e queratinócitos poligonais com citoplasma granuloso e núcleo escuro central (setas). **C.** A camada espinhosa também apresenta padrão em “favo de mel” e os queratinócitos são menores com núcleo escuro central circundado por citoplasma brilhante (setas). **D.** Camada basal com aspecto em “pedras de calçamento”, formada pelo agrupamento de pequenas células brilhantes sem núcleo visível (asteriscos). **E.** Junção dermo-epidérmica composta por anéis (setas) circundando a derme papilar (asteriscos) representam as papilas demarcadas. **F.** A derme papilar apresenta trama reticular de fibras acinzentadas (asterisco) com vasos capilares centrais e circundada por anéis de células brilhantes correspondente aos queratinócitos basais (setas).





**Fonte:** Modificado de MARGHOOB et al. (2003)

**Figura 6** - Comparação entre MC e histopatologia (cortes histológicos transversais) na pele normal.

#### 1.4.2 Microscopia confocal nos Melanomas cutâneos

A MC do melanoma cutâneo revela células grandes, pleomórficas (redondas, estelares ou fusiformes), algumas com ramificações dendríticas e núcleos escuros dispostos excentricamente. Estas células podem ser identificadas nas camadas superficiais da epiderme (disseminação pagetóide), junção dermo-epidérmica (células atípicas isoladas ou em ninhos espessando os espaços interpilares) e na derme (células brilhantes nucleadas na papila dérmica). Também é comum a observação da desorganização do padrão arquitetural regular em “favo de mel” da camada

espinhosa, com má definição das bordas celulares e presença de partículas granulares brilhantes, que provavelmente representam melanina (“poeira de melanina”), distribuídas na epiderme. Os dendritos vistos no melanoma são espessos e escuros. A papila dérmica pode ser irregular em forma e tamanho, com bordas sem o anel brilhante de células basais (papilas não demarcadas) ou pode ser completamente inaparente devido a retificação da junção dermo-epidérmica. Agregados cerebriformes ou ninhos densos e esparsos de células atípicas brilhantes podem ocasionalmente ser identificados na derme (PELLACANI et al. 2005c; PELLACANI et al. 2007b; PELLACANI et al. 2009).

A MC foi testada recentemente e mostrou ter valor no manejo das lesões melanocíticas. GUITERA et al. (2009) demonstraram que no diagnóstico do melanoma cutâneo, a utilização da MC por especialistas resultou em sensibilidade semelhante à dermatoscopia (cerca de 90%), enquanto dobrou a especificidade (MC 68% vs. dermatoscopia 32%). A diferença na especificidade foi ainda mais pronunciada a favor da MC na avaliação de lesões pigmentadas claras e nas lesões melanocíticas rosadas que não apresentam achados dermoscópicos específicos (PELLACANI et al. 2007b; BRAGA et al. 2009; GUITERA et al. 2009).

GERGER et al. (2005) realizaram um estudo com 117 lesões melanocíticas (melanomas e nevos melanocíticos clinicamente suspeitos) e encontraram alta especificidade e sensibilidade (97,60% e 88,15%, respectivamente) para o diagnóstico de melanoma cutâneo, com a MC *in vivo*.

Três principais algoritmos diagnósticos foram desenvolvidos na MC para a avaliação complementar das lesões melanocíticas difíceis ao exame clínico e à dermatoscopia, resultando em alta acurácia diagnóstica para o melanoma cutâneo. Os achados mais relevantes são: atipia citológica na epiderme ou derme (células pagetóides arredondadas e células atípicas na derme) e atipia arquitetural (papilas não demarcadas e células basais atípicas na junção dermo-epidérmica) (PELLACANI et al. 2007b; SEGURA et al. 2009; GUITERA et al. 2010).

## **1.5 CARACTERÍSTICAS DA MICROSCOPIA CONFOCAL E HISTOPATOLOGIA EM CORTES PERPENDICULARES NAS LESÕES MELANOCÍTICAS – O QUE SE SABE ATUALMENTE**

Para a interpretação das imagens confocais é necessário um conhecimento profundo da dermatoscopia e seu significado histopatológico, pois os critérios descritos na MC têm correspondência precisa com as características dermatoscópicas por se apresentarem no mesmo plano, o plano horizontal (PELLACANI et al. 2005a e c).

Além disso, a MC tem um papel promissor no diagnóstico clínico das lesões pigmentadas da pele quando a dermatoscopia não consegue fazê-lo. Em trabalho realizado por GUITERA et al. (2009), 12% dos melanomas não foram diagnosticados pela dermatoscopia enquanto apenas 9% deles não foram diagnosticados pela microscopia confocal *in vivo*. Este estudo reforça

a importância da MC como um potencial método diagnóstico das lesões melanocíticas quando a dermatoscopia não realiza o diagnóstico clínico.

Algumas características dermatoscópicas foram estudadas e caracterizadas na microscopia confocal e histopatologia em cortes perpendiculares. São elas (**Anexo 1**):

### **1.5.1 Rede pigmentar**

A rede pigmentar é um dos critérios dermatoscópicos mais importantes para a realização do diagnóstico das lesões pigmentadas da pele e pode ser caracterizada como rede pigmentar típica ou atípica. A presença da rede pigmentar classifica as lesões melanocíticas e ajuda no diagnóstico diferencial entre nevos benignos (rede pigmentar típica) e melanoma cutâneo (rede pigmentar atípica) (REZZE et al. 2006b).

A rede pigmentar típica à MC é caracterizada pela presença de anéis de células poligonais brilhantes ao redor de uma área escura oval ou redonda que corresponde à papila dérmica (papila demarcada). Esta papila demarcada corresponde à dermatoscopia ao traçado e aos "buracos" da rede e ao exame histopatológico à presença de melanócitos e ceratinócitos pigmentados na junção dermoepidérmica, com cristas alongadas (PELLACANI et al. 2008).

A rede pigmentar atípica à MC é caracterizada por papilas não demarcadas, separadas por múltiplas células grandes e brilhantes, algumas atípicas e com dendritos, resultando no aumento do espaço interpapilar. Corresponde à rede alargada e hiperpigmentada à dermatoscopia e ao

desarranjo arquitetural da junção dermo-epidérmica, com melanócitos atípicos que muitas vezes formam ninhos celulares irregulares e confluentes ao exame histopatológico (PELLACANI et al. 2005a, 2008).

### **1.5.2 Glóbulos pigmentados**

Os glóbulos marrons regulares são caracterizados na MC por um aglomerado compacto de margens nítidas composto por células poligonais grandes com características morfológicas e refletividade semelhantes. A análise histopatológica revelou ninhos de células névicas compostos por nevocitos monomórficos localizados na junção dermo-epidérmica e na papila dérmica. O padrão dermatoscópico denominado *cobblestone* (descrito em nevos intradérmicos) foi caracterizado na MC por grandes agregados de células com aumento da papila dérmica e sem conexão com as células da camada basal. Na porção mais superior, os glóbulos são compostos por células grandes, redondas, nucleadas e brilhantes e frouxamente agrupadas. Na porção mais profunda, são compostos por agregados celulares mais compactos com aspecto homogêneo e contornos celulares menos nítidos. Na histopatologia, as células névicas formam ninhos e cordões que diminuem em tamanho com a profundidade e são separados por fibras (PELLACANI et al. 2005b, 2008).

Os glóbulos irregulares na MC são caracterizados por agregados celulares de formato redondo ou oval, compostos por células atípicas com brilho heterogêneo (SCOPE et al. 2007a; PELLACANI et al. 2008).

### 1.5.3 Pontos pigmentados

Os pontos pigmentados são representados na MC por células grandes isoladas ou, mais frequentemente, em pequenos grupamentos, com citoplasma brilhante e núcleo escuro nas camadas mais superficiais da epiderme (disseminação pagetóide). No exame histopatológico, são observados como pequenos ninhos de células melanocíticas pagetóides na epiderme. O acúmulo de melanina também pode ser evidenciado, correspondendo a estruturas brilhantes homogêneas na camada córnea (SCOPE et al. 2007a; PELLACANI et al. 2008).

Pontos azuis acinzentados (*peppering* - estrutura de regressão) são caracterizados por agregados de células globosas brilhantes (*plump cells*) na papila dérmica e correspondem histopatologicamente aos melanófagos na derme (SCOPE et al. 2007a; PELLACANI et al. 2008).

### 1.5.4 Estrias radiadas

As estrias radiadas apresentam-se como linhas paralelas de células basais interpapilares em projeção centrífuga, separadas por uma área escura estreita (derme). Na histopatologia correspondem aos ninhos de células na junção dermo-epidérmica que progridem em direção à periferia da lesão (SCOPE et al. 2007a, b; PELLACANI et al. 2008).

### 1.5.5 Pseudópodes

São muito semelhantes às estrias radiadas, porém apresentando um ninho periférico que caracteriza esta estrutura dermatoscopicamente. Na

microscopia confocal foram descritos como ninhos de células brilhantes conectados ao corpo do tumor por camadas de células frouxamente agregadas conferindo aspecto "em cometa" (PELLACANI et al. 2008).

#### **1.5.6 Hipopigmentação irregular**

A hipopigmentação irregular é caracterizada na MC pelo padrão em "favo de mel" (*honeycomb pattern*) nas camadas mais superficiais da epiderme e por pequenas papilas dérmicas demarcadas. Na histopatologia destaca-se a hipopigmentação epidérmica (PELLACANI et al. 2008).

#### **1.5.7 Áreas de hiperpigmentação ou *blotches***

A hiperpigmentação (borrão) ou *blotches* representa na MC um padrão em "pedra de calçamento" (*cobblestone pattern*) brilhante resultante da presença da melanina em abundância nos ceratinócitos epidérmicos. Algumas células globosas brilhantes (*plump cells*) podem ser visualizadas na derme tanto em lesões benignas quanto malignas. Ao exame histopatológico, a hiperpigmentação é caracterizada por melanina abundante nos ceratinócitos epidérmicos (PELLACANI et al. 2008).

#### **1.5.8 Véu azul-esbranquiçado**

O véu azul-esbranquiçado é caracterizado por desorganização epidérmica: infiltração pagetóide de células redondas brilhantes, papilas não demarcadas e atipia citológica na camada basal. Algumas lesões de melanoma cutâneo também apresentam ninhos celulares não homogêneos

e agrupamentos celulares cerebriiformes com células desagregadas infiltrando a papila dérmica (*plump cells* e células nucleadas). Na histopatologia há ortoceratose associada à agregação compacta de células pigmentadas em todas as camadas da epiderme e derme (PELLACANI et al. 2007a, 2008).

As características das lesões melanocíticas e não melanocíticas na MC foram detalhadas em vários trabalhos publicados na literatura médica internacional. No entanto, poucos artigos comparam as estruturas dermatoscópicas aos achados da MC e à histopatologia em cortes perpendiculares. SCOPE et al. (2007a), descreveram estes achados em um total de apenas 11 lesões melanocíticas e PELLACANI et al. (2008) realizaram um estudo com maior casuística com um total de 202 lesões melanocíticas.

O objetivo da maioria das publicações tem sido identificar as lesões malignas, descrever suas principais características e criar algoritmos diagnósticos. Pouca ênfase é dada ao uso da MC para a realização do diagnóstico específico *in vivo* e ao estudo dos aspectos citológicos e arquiteturais e suas correlações histológicas. A identificação na MC dos achados histológicos utilizados na avaliação das neoplasias melanocíticas ampliaria a utilidade do método no diagnóstico *in vivo* destes tumores.

Não existem relatos da comparação entre as características dermatoscópicas, a MC e os achados histopatológicos em cortes transversais (mesmo plano da dermatoscopia e microscopia confocal), como proposto neste estudo. Este projeto tem por meta estudar as bases da MC



nos melanomas cutâneos e nos nevos melanocíticos comuns e compará-las às características dermatoscópicas já padronizadas e amplamente utilizadas, e aos achados histopatológicos em cortes transversais e perpendiculares.

Neste estudo avaliamos 65 lesões com diagnóstico dermatoscópico de melanoma cutâneo, o que motivou a primeira publicação. Descrevemos a técnica para a obtenção dos cortes histológicos transversais e correlacionamos as principais características dermatoscópicas deste tumor com a MC e a histopatologia em cortes transversais e perpendiculares (**ARTIGO 1**).

Na segunda publicação descrevemos um caso enfatizando a importância da MC como método complementar no diagnóstico precoce de melanoma em nevo de spilus (**ARTIGO 2**).

## 2 ARTIGO 1

**Braga JC**, Macedo MP, Pinto C, Duprat J, Begnami MD, Pellacani G, Rezze GG. Learning reflectance confocal microscopy of melanocytic skin lesions through histopathologic transversal sections. **PLoS One** 2013 Dec 5;8(12):e81205. doi: 10.1371/journal.pone.0081205. eCollection 2013. PubMed PMID: 24339910; PubMed Central PMCID: PMC3855214.

# Learning Reflectance Confocal Microscopy of Melanocytic Skin Lesions through Histopathologic Transversal Sections

Juliana Casagrande Tavoloni Braga<sup>1</sup>, Mariana Petaccia Macedo<sup>2</sup>, Clovis Pinto<sup>2</sup>, João Duprat<sup>1</sup>, Maria Dirlei Begnami<sup>2</sup>, Giovanni Pellacani<sup>3</sup>, Gisele Gargantini Rezze<sup>1\*</sup>

**1** From the Cutaneous Oncology Department, A C Camargo Hospital, Sao Paulo, Brazil, **2** From the Anatomy Pathology Department, A C Camargo Hospital, Sao Paulo, Brazil, **3** From the Dermatology Department, University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy

## Abstract

Histopathologic interpretation of dermoscopic and reflectance confocal microscopy (RCM) features of cutaneous melanoma was timidly carried out using perpendicular histologic sections, which does not mimic the same plane of the image achieved at both techniques (horizontal plane). The aim of this study was to describe the transverse histologic sections research technique and correlate main dermoscopic features characteristic of cutaneous melanoma (atypical network, irregular globules and pseudopods) with RCM and histopathology in perpendicular and transverse sections in order to offer a more precise interpretation of in vivo detectable features. Four melanomas and 2 nevi with different dermoscopic clues have been studied. Lesion areas that showed characteristic dermoscopic features were imaged by dermoscopy and confocal microscopy and directly correlated with histopathology in perpendicular and transverse sections. We presented the possibility to perform transverse sections as a new approach to understand RCM features. Atypical network showed different aspects in the 2 melanomas: in one case it was characterized by pleomorphic malignant melanocytes with tendency to form aggregates, whereas in the other elongated dendritic cells crowded around dermal papillae, some of them forming bridges that resembled the mitochondrial aspect at confocal and histopathology transversal sections. Pigment globules in melanomas and nevi differed for the presence of large atypical cells in the former, and pseudopods showed up as elongated nests protruded toward the periphery of the lesion. Transverse histologic research sections have a consistent dermoscopic and confocal correlate, and it may represent an help in confocal feature interpretation and an advance in improving melanoma diagnosis and knowledge of the biology of melanocytic lesions.

**Citation:** Braga JCT, Macedo MP, Pinto C, Duprat J, Begnami MD, et al. (2013) Learning Reflectance Confocal Microscopy of Melanocytic Skin Lesions through Histopathologic Transversal Sections. PLoS ONE 8(12): e81205. doi:10.1371/journal.pone.0081205

**Editor:** H. Peter Soyer, The University of Queensland, Australia

**Received:** August 26, 2013; **Accepted:** October 19, 2013; **Published:** December 5, 2013

**Copyright:** © 2013 Braga et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** The study was supported by FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa no Estado de São Paulo - grant 2010/06455-1). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: ggrezze@hotmail.com

## Introduction

In the last decades development of new techniques, such as dermoscopy, improved melanoma diagnostic accuracy. Dermoscopic diagnosis is based on the identification of characteristic patterns related with specific histopathologic substrates [1,2].

Recently, in vivo reflectance confocal microscopy (RCM), a noninvasive imaging technique that produces horizontal images of the skin with cellular level resolution from the surface to the papillary dermis, offered the opportunity to detect characteristic histologic features, improving skin tumor diagnosis accuracy [3]. Like dermoscopy, RCM reveals morphologic details of architecture in the en face plane, but, in addition, it provides morphologic information on the cellular level [4–7].

The histopathologic interpretation of dermoscopic and RCM findings, using routine perpendicular sections, does not mimic the same plane of the image achieved at both techniques, which produce a horizontal overview of pigmented skin lesions [5,8]. Therefore, transverse histologic sections could contribute to better characterize the features observed by dermoscopy and RCM.

Although this is a research method considered being technically complicated, Rezze et al. have demonstrated that this is a procedure allowing a reliable correlation between dermoscopic features and histopathological findings [9].

In this study we sought to correlate main dermoscopic features characteristic of cutaneous melanoma (atypical network, irregular globules, radial streaming and pseudopods) with RCM and histopathology in perpendicular and transverse sections in order to offer a more precise interpretation of in vivo detectable features.

## Materials and Methods

### Study Population

Four melanomas, with dermoscopic diagnosis by pattern analysis method, have been studied: two of which showing atypical network, one case displaying irregular globules and one case presenting pseudopods. Moreover, two nevi with the benign counterpart of melanoma dermoscopic clues have been included as controls: a junctional nevus with typical network and a compound nevus with regular globules. Melanomas

**Table 1.** Summary of dermoscopic features, reflectance confocal microscopy and histopathologic aspects.

	<b>Dermoscopic feature</b>	<b>Confocal aspects</b>	<b>Transverse section</b>	<b>Perpendicular section</b>
<b>Case 1</b>	Slightly pigmented network	Irregular and dishomogeneous dermal papillae. Dendritic cells bulge from the epidermis toward the dermis forming "bridges" called mitochondria like structures.	An increased number of atypical melanocytes arranged around the dermal papillae. The atypical melanocytes protrude into the dermal papillae forming bridges thus confirming the mitochondrial structures in RCM.	Disarrangement of the rete ridge and the increased number of atypical melanocytes. It is not possible to see the mitochondrial structure in this view.
<b>Case 2</b>	Broadened pigmented network	Irregular and dishomogeneous dermal papillae. Demarcated and non-demarcated rings were separated by loosely thick interpapillary spaces.	Predominance of atypical melanocytes, isolated or in nests, enlarging the interpapillary spaces.	Disarrangement of the rete ridge and the increased number of atypical melanocytes in the epidermis.
<b>Case 3</b>	Typical network	Rings of bright polygonal cells surrounding roundish to oval dark areas corresponding to dermal papillae at DEJ. The papillae lacked cytologic atypia.	An increased number of isolated melanocytes are arranged around the dermal papillae and there are nevus cells nests within the epidermis. The interpapillary spaces are preserved.	Elongated rete ridges and presence of single and nests of nevus cells in the DEJ
<b>Case 4</b>	Irregular globules	Irregularly shaped clusters with cells that are nonhomogeneous in morphologic features and reflectivity. Dense cell clusters consisted of large homogeneous polygonal cells tightly aggregated in a roundish regular structure.	Large amount of atypical melanocytes predominantly in nests with variable size and shape within the epidermis and the dermis.	Compact aggregates of atypical melanocytes with a slight intercellular dis cohesion, variable in size and shape, predominantly distributed at the DEJ and in the papillary dermis.
<b>Case 5</b>	Regular globules	Compact aggregates with sharp margin of large polygonal cells similar in morphologic features and reflectivity, forming polyhedral structures.	Mostly singly nevocytes around the papillae (at the DEJ) and dense nests composed of nevus cells within the dermis surrounded by a narrow band of epidermis.	Singly nevus cells at the DEJ and well-circumscribed melanocytic nests composed of typical, large and monomorphous nevocytes, disposed in an organized manner within the dermis.
<b>Case 6</b>	Pseudopods	Compact aggregates of atypical cells are distributed in a linear arrangement toward the periphery with a dense nest at the extremity, similar a globulelike structure within the epidermis.	Nests of atypical cells are arranged in a linear manner throughout the periphery of the lesion.	Nests of atypical melanocytes are distributed contiguously toward the periphery along the DEJ.

doi:10.1371/journal.pone.0081205.t001

presented in this paper were equal to or larger than 1.0 cm in diameter, with a clear-cut dermoscopic diagnosis based on the previously described pattern analysis method. Patients were recruited at the Department of Cutaneous Oncology of the Brazilian Cancer Hospital A. C. Camargo, São Paulo. All patients signed an informed consent and this study was approved by the A C Camargo Cancer Center Ethics Committee (CEP 1524/11).

**Instruments.** Digital dermoscopy imaging was performed by high-resolution digital dermoscope (DermLite Foto; 3GEN LLC, Dana Point, CA) for all cases. RCM images were acquired by means of near-infrared reflectance confocal laser scanning microscope (Vivascope 1500®; Lucid Inc., Rochester, NY, USA). Instruments and acquisition procedures are described elsewhere [10,11].

Briefly, the RCM adapter ring was centered onto the lesion area of interest, to ensure a direct correlation among dermoscopic, confocal microscopic, and histopathologic features. A low-resolution dermoscopic camera integrated into Vivascope software was used to allow precise confocal navigation and to look at dermoscopic images (VivaCam®).

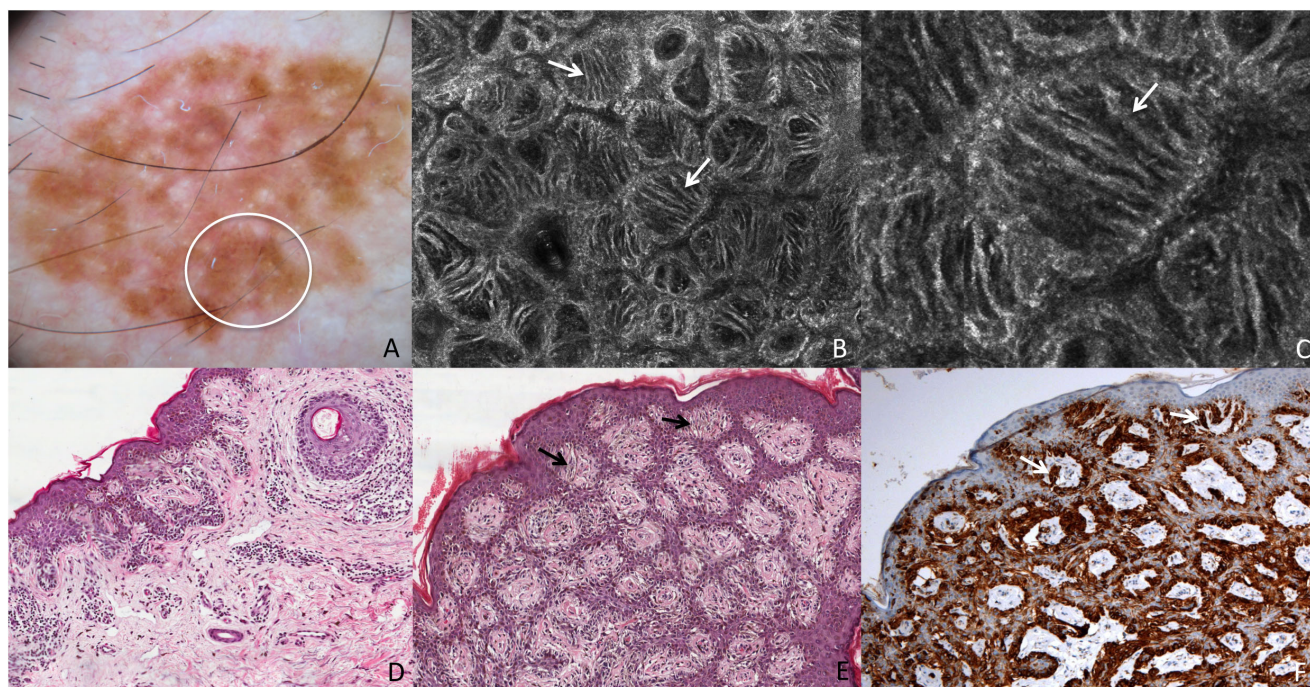
Confocal image acquisition included a minimum of 3 mosaics (Vivablock®), corresponding to montages of single high resolution images acquired in an automated series at the same depth, with an area ranging from 4×4 to 8×8 mm at three different depth levels (i.e. intraepidermal, dermal-epidermal junction and superficial

dermis). Moreover, series of high-resolution images (capture and stack images) were obtained at different levels from the surface down to the papillary dermis. Each image (1000×1000 pixels) corresponds to a horizontal section at a selected depth with a 500×500 μm field of view with an approximately 1 μm lateral resolution.

After dermoscopic and RCM image acquisition, an ink mark at 1 pole of the specimen was positioned to make its orientation easier.

**Histopathologic procedure.** After the dermoscopic diagnosis of cutaneous melanoma, we selected one of the following features for biopsy: atypical network, irregular globules, radial streaming or pseudopods. To avoid interference with Breslow's index, selected features were always restricted to the epidermis. The site of the interest area was marked with a silk suture. After the excisional biopsy, the tissue was formalin fixed and paraffin embedded.

Afterward the marked area was removed using a 4 mm punch biopsy and the remaining tissue sample was used for routine diagnosis according to the Pathology Department's protocol. Before the punch sample being processed, it is anticipated the final report of the pathologist. If there is no conflict as to the final diagnosis, the biopsy sample was sliced into two halves: one of the fragments had perpendicular sections and the other had serial microscopic transverse sections from the epidermis toward the dermis, adapted from Headington [12].



**Figure 1. Superficial spreading melanoma *in situ*.** This lesion shows on dermoscopy (A) a slightly pigmented network (white circle corresponds to the punch area). RCM mosaic image (B,  $1 \times 1$  mm) at the level of the DEJ shows irregular and dishomogeneous dermal papillae with dendritic cells (white arrows). RCM individual image (C,  $0,5 \times 0,5$  mm) at the level of the DEJ shows dendritic cells forming “bridges” called mitochondria-like structures (white arrow). Perpendicular section (D) shows disarrangement of the rete ridge and the increased number of atypical melanocytes. Transverse section (E, HE staining) shows atypical melanocytes protruding into the dermal papillae forming bridges (black arrows). Transverse section (F, Melan-A staining) shows cells positive for Melan-A protruding into the dermal papillae (white arrows).  
doi:10.1371/journal.pone.0081205.g001

In our protocol extra paraffin is added to avoid wearing out the *stratum corneum* with the first slices. Consecutive  $5 \mu\text{m}$  thick sections are taken from the tissue block starting from the outer layer of the *stratum corneum* to the dermis, and then stained with Haematoxylin & Eosin (H&E) for correlation with the confocal findings. The other half of the biopsy was conventionally sectioned and stained. Breslow's index is revised in this fragment just to ensure that it was equal or thinner than the remaining excisional specimen.

Histopathologic pictures were acquired using ScanScope Digital Slide Scanner (Aperio, Vista, CA, USA).

### Image Description

Dermoscopic image description of each pattern was performed according to the definition of the literature [1,2,8]. The RCM images were described using the terms previously proposed and recently summarized in a consensus terminology glossary [13–21]. Histopathologic description was performed and it was mainly based on the presence and distribution of typical/atypical melanocytes and pigmented keratinocytes within epidermis and dermal-epidermal junction (DEJ), and melanophages, inflammatory infiltrate and vessels within the dermis.

### Results

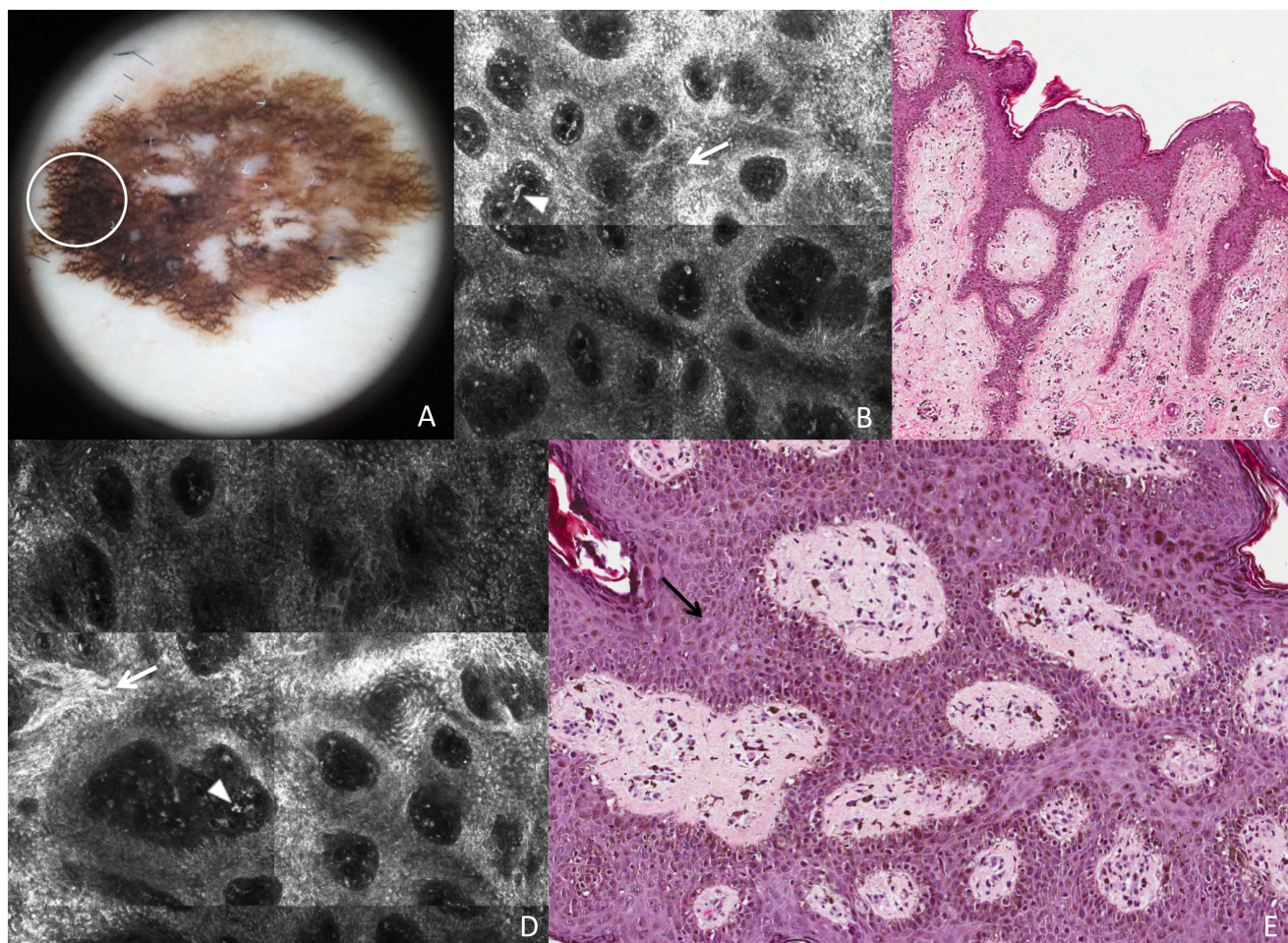
Confocal aspects and their histologic substrates (perpendicular and transverse sections) for each dermoscopic feature are summarized in the table 1. In none of the cases the procedure interfered with Breslow thickness determination.

### Pigment Network

There were 3 cases presenting pigmented network on dermoscopy. Two melanomas were characterized by atypical network, whereas a nevus showed a typical network.

Concerning the two melanomas with atypical network, one was showing a tiny thin slightly pigmented presented network (Figure 1A). Melanoma diagnosis was suspected on a clinical base since the lesion as a solitary large mole with history of slow growth over years. The other lesion displayed an irregularly broadened pigmented network (Figure 2A). When using RCM, the atypical pigment network corresponded to a meshwork pattern [22] with irregular and dishomogeneous dermal papillae.

In correspondence of the tiny thin network pattern, a dendritic cell proliferation at the DEJ was observed in RCM. In some instances, some dendritic elongated cells were bulging from the epidermis into the papillae originating “bridges” apparently within the papillary dermis (Figures 1B and C). These figures resemble mitochondria like structures in electron microscopy. The dendritic cell proliferation in the basal layer (accounting for “atypical cells at the DEJ” according with the RCM-score definition) resulted in a positive major criterion for melanoma diagnosis, though the total score was less than the optimal threshold (3 points) for melanoma diagnosis<sup>18</sup>. Perpendicular histologic sections revealed a disarrangement of the rete ridge and increased number of atypical melanocytes in single units and small nests at the DEJ, describing an *in situ* melanoma (Figure 1D). On the other hand, transverse histologic sections revealed an increased number of atypical melanocytes arranged around the dermal papillae. Some of these melanocytes seems to protrude into the interior of the dermal papillae forming bridges that resemble the mitochondrial structures in RCM (Figure 1E and F). RCM study of the broadened



**Figure 2. Superficial spreading melanoma *in situ*.** This lesion shows on dermoscopy (A) a broadened pigmented network (white circle corresponds to the punch area). RCM mosaic images (B and D, 1×1 mm) at the level of the DEJ show demarcated and non-demarcated rings separated by loosely thick interpapillary spaces (white arrows) and some plump bright cells and bright dots are visible within dermal papillae (arrowheads). Perpendicular section (C) shows disarrangement of the rete ridge and the increased number of atypical melanocytes in the epidermis. Transverse section (E) shows predominance of atypical melanocytes, isolated or in nests, enlarging the interpapillary spaces (black arrow).  
doi:10.1371/journal.pone.0081205.g002

atypical pigmented network (Figure 2A) showed irregular enlarged meshes constituted by a pleomorphic (both roundish and dendritic) melanocytic proliferation (Figures 2B and D). Papillary contours are well outlined, but the overall architecture is irregular, with unevenly enlarged meshes corresponding to the broadened network lines as evaluated upon dermoscopy. Some plump bright cells and bright dots were visible within dermal papillae (Figures 2B and D). Transverse histologic sections revealed the exact RCM outlines, with meshes filled of a proliferation of pleomorphic malignant melanocytes with some tendency to aggregates into nests, and inflammatory infiltrate within dermal papillae (Figure 2E). Perpendicular sections showed elongated cristae with a junctional proliferation of atypical melanocytes (Figure 2C).

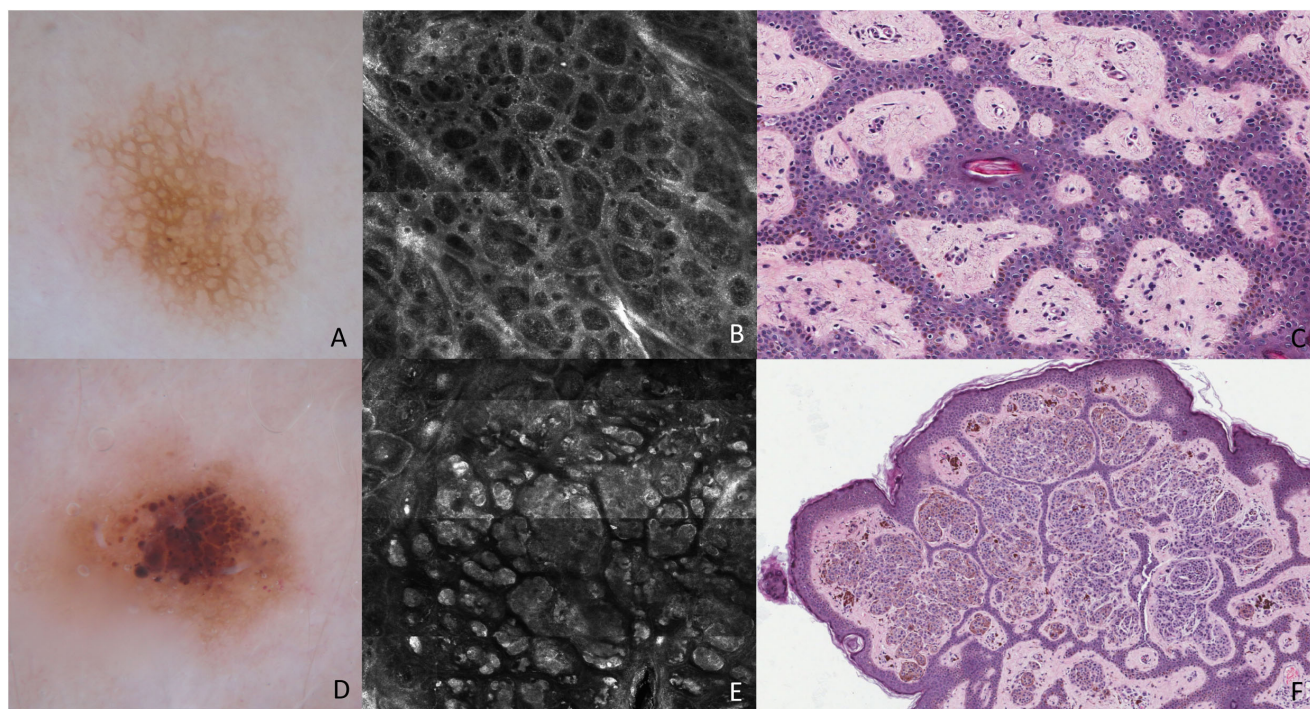
Concerning typical network (Figure 3A), on RCM it was characterized by rings of bright polygonal cells (small melanocytes and melanin-rich keratinocytes) surrounding roundish to oval dark areas corresponding to dermal papillae at dermoepidermal junction. Rings were clearly outlining the papillary contours and were separated by a thin, structureless, slightly refractive space that sharply contrasted with the dark background (edged papillae) (Figure 3B). No atypical cells were detectable. Routine histologic analysis revealed elongated rete ridges and single cells and few

small nests of nevus cells at DEJ. In the transverse histologic sections, an increased number of isolated melanocytes were arranged around the dermal papillae that accounted for the higher brightness of the cells within the rings at RCM examination. (Figure 3C).

#### Pigment Globules and Peripheral Structures (Pseudopods)

The 2 melanomas and the nevus included in the study were characterized by large clusters of bright cells forming nests at RCM examination, regardless for globules and pseudopods. Pigment globules in the melanoma (Figure 4A) showed up as irregularly shaped compact clusters of large atypical cells, non homogeneous in shape and reflectivity (Figure 4D). These dense cell clusters were predominantly bulging within the dermal papillae, connected with the DEJ on one side (Figure 4B).

On perpendicular histologic analysis, atypical globules made of dense clusters of nonhomogeneous cells appeared as compact aggregates of pleomorphic melanocytes with a slight intercellular dis cohesion, variable in size and shape, predominantly distributed at the DEJ and in the papillary dermis (Figure 4C). Transverse histologic sections revealed large amount of atypical melanocytes



**Figure 3. Melanocytic Nevi.** These lesions show typical network (A) and regular globules (D), on dermoscopy. RCM mosaic image (B,  $1 \times 1$  mm) at the level of the DEJ shows rings of bright polygonal cells surrounding roundish to oval dark areas corresponding to dermal papillae at DEJ. Transverse section (C) shows isolated melanocytes arranged around the dermal papillae and there are nevus cells nests within the epidermis. RCM mosaic image (E,  $1,5 \times 1,5$  mm) at the level of the DEJ and dermis shows compact aggregates of large polygonal cells similar in morphologic features and reflectivity, forming polyhedral structures. Transverse section (F) shows dense nests composed of nevus cells within the dermis surrounded by a narrow band of epidermis.

doi:10.1371/journal.pone.0081205.g003

predominantly in nests within the epidermis and the dermis related to the globules on dermoscopy and RCM (Figure 4E). Occasionally the nests within the epidermis were confluent, corresponding to broadened network meshes intermingled with the globular aspect visible on dermoscopy, and frequently connected with epidermis.

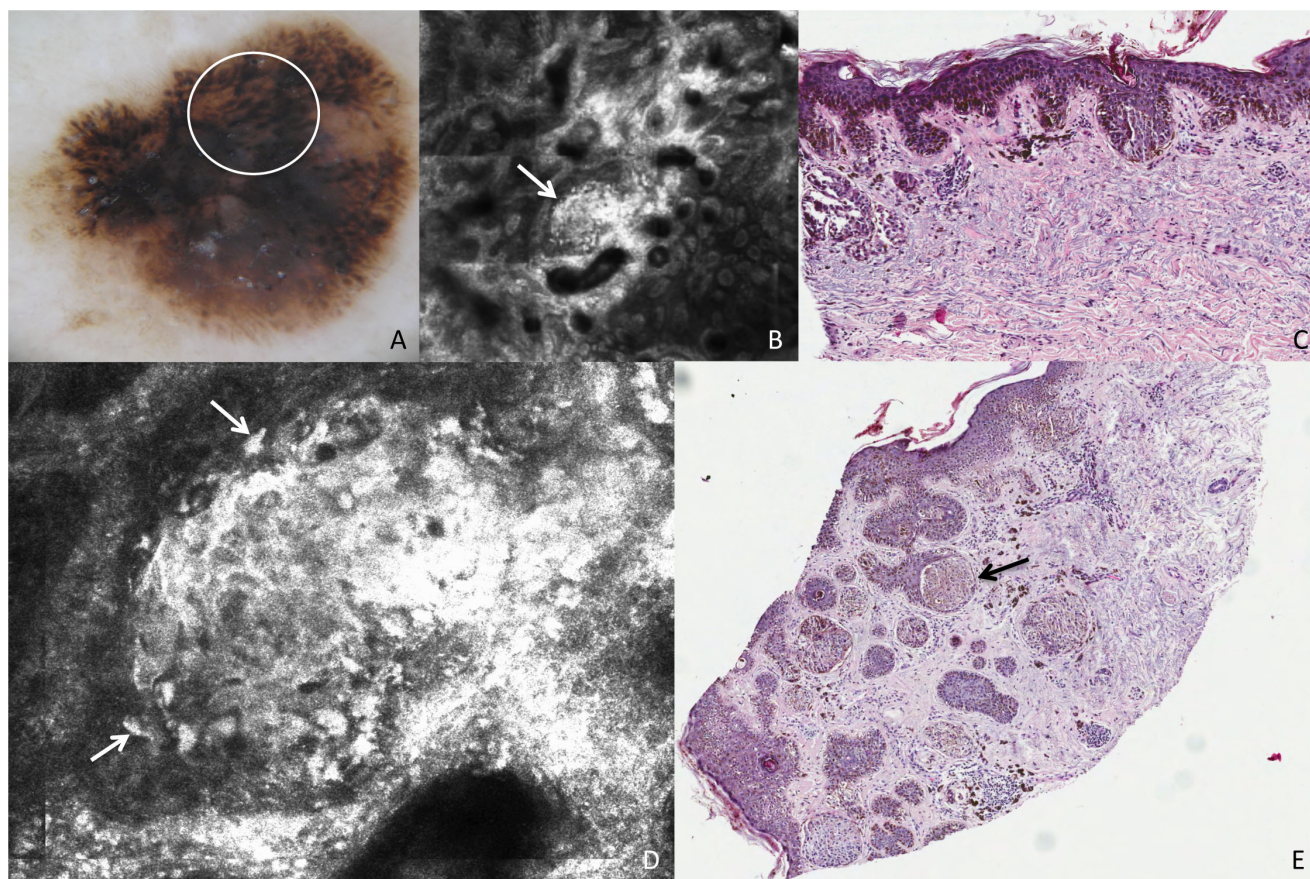
Similarly, pseudopods (Figure 5A) corresponded to clusters of melanocytes, connected with the epidermis, arranged in elongated parallel strands with club-shaped bulges projected toward the periphery. On the internal side, round to oval compact nests with a similar cellular texture were visible at RCM and corresponded to pigment globules upon dermoscopy (Figure 5B). These nests (both peripheral and internal ones) were composed of cell aggregates with ill-defined cellular demarcations and heterogeneous brightness, but they were lacking an evident cytologic atypia (Figure 5C). On perpendicular histologic analysis, malignant melanocytes were arranged predominantly in nests at the epidermis and the DEJ (Figure 5D). Upon traditional histopathologic sections peripheral nests did not differ from the internal ones. In the transverse histologic sections of the DEJ, nests of atypical cells were arranged in a linear manner throughout the periphery of the lesion, and, differently from perpendicular sections, differences of shape were visible between peripheral and internal nests (Figure 5E).

Concerning the globular nevus, an accurate correspondence in shape was observed between brown globules on dermoscopy (Figure 3D) and the dense melanocytic clusters on RCM (Figure 3E), appearing as compact aggregates with sharp margin of large polygonal cells similar in morphologic features and reflectivity, forming polyhedral structures (dense clusters). Routine histologic examination revealed a predominance of well-circum-

scribed melanocytic nests and cords of typical, monomorphous nevocytes, mainly located within the dermal papillae, and separated by thin epidermal cristae. Transverse histologic sections revealed mostly large dense nests composed of large cohesive nevus cells within the dermis surrounded by a narrow band of epidermis (Figure 3F).

## Discussion

RCM is a noninvasive imaging technique with cellular resolution, offering the opportunity to detect characteristic histologic features in vivo and it has enhanced our ability to assess skin tumors. The fact that RCM evaluates the tissue in the horizontal plane as dermoscopy, and presents high magnification with a cellular-level resolution, such as histopathology, suggests that this technique is a research tool for an excellent correlation with both these methods [5–7]. The histologic correspondence of some confocal features has been demonstrated, [4,14–17,19] although numerous patterns still have to be clearly defined. The increasing interest in using RCM in specialized skin cancer centers derives from the possibility of having a more accurate presurgical diagnosis for different skin tumors, resulting in demonstrated improvement in diagnostic accuracy, especially for melanocytic lesions, also with respect to dermoscopy [3,20,22]. Interpretation of dermoscopic and RCM features of cutaneous melanoma is based on histologic description of perpendicular sections of the lesions that does not reflect the overview achieved by both techniques. This paper sought to describe the value of transverse histologic sections as a tool to better characterize the structures observed either in dermoscopy and in confocal microscopy. We



**Figure 4. Superficial spreading melanoma, Breslow thickness 0,8 mm.** This lesion shows on dermoscopy (A) irregular globules (white circle). RCM mosaic image (B, 1,5×1,5 mm) at the level of the DEJ shows irregularly shaped clusters (white arrow). Perpendicular section (C) shows compact aggregates of atypical melanocytes with a slight intercellular discohension. RCM individual image (D, 0,5×0,5 mm) at the level of the DEJ shows a cluster with cells that are nonhomogeneous in morphologic features and reflectivity (white arrows). Transverse section (E) shows large amount of atypical melanocytes predominantly in nests with variable size and shape within the epidermis and the dermis. The black arrow points to the nest that makes the exact correlation with confocal image.  
doi:10.1371/journal.pone.0081205.g004

demonstrated that transverse histologic sections have a strong and consistent dermoscopic and confocal correlate, and it may be useful for a more accurate interpretation of confocal and dermoscopic alterations, as well as for detection of new diagnostic findings related with specific histopathologic substrates. Furthermore, the possibility of recognizing *in vivo* cytologic patterns and following them up over time may help to identify MM precursors and to understand the biology of melanocytic lesions [23].

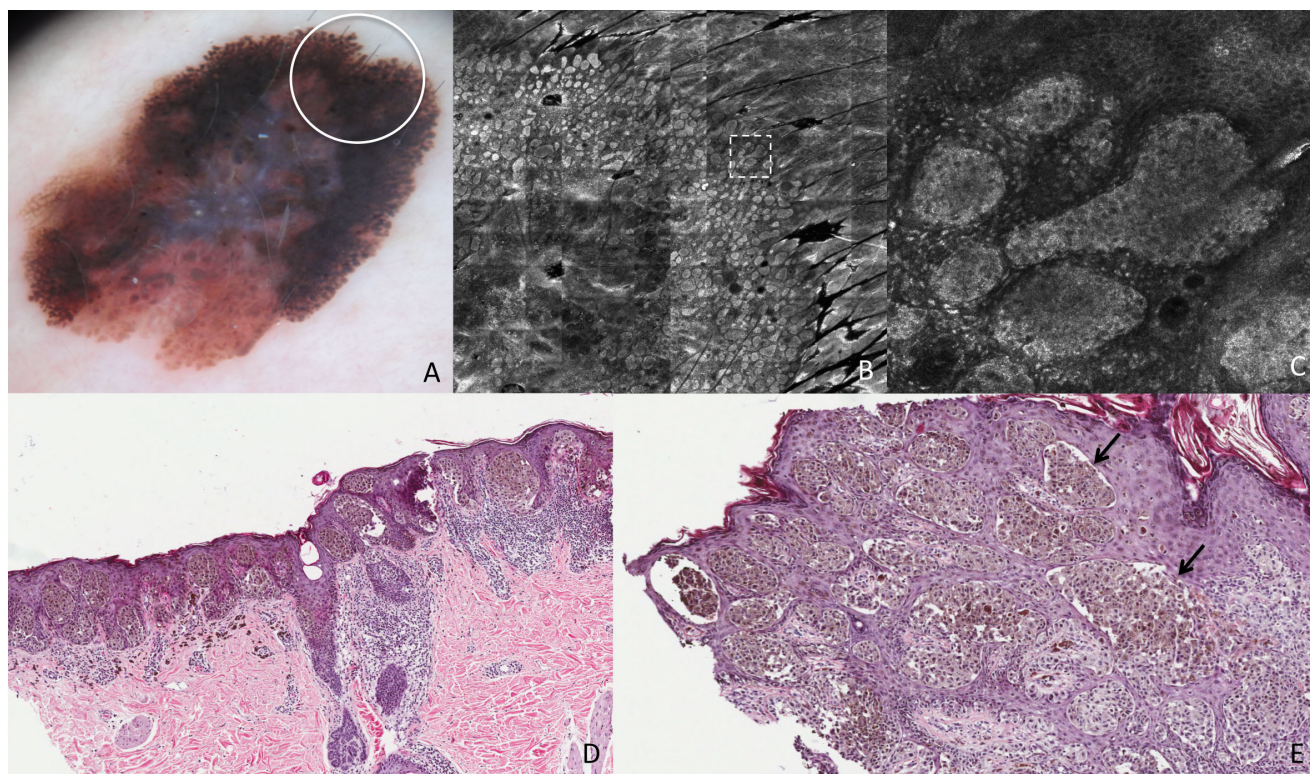
One of the most important dermoscopic criteria in the diagnosis of pigmented skin lesions is represented by the pigmented network [2,24–26]. The dermoscopic appearance of a network has been correlated to histopathological findings; the thicker pigmented rete ridges correspond to the dark brown lines and the thinner pigmented suprapapillary plates correspond to the tan holes [27]. Alterations of network line width and hole size are frequently observed in MMs [16]. On RCM, the atypical network with slightly pigmented lines showed the presence of elongated and spindle cells around and crossing the dermal papillae. This finding is observable in confocal and in transversal sections only, and could not be seen in perpendicular ones. Moreover, it was related with a tiny light pigmented network, which is not different from a slightly irregular network frequently visible in benign lesions. This melanoma represents an exception from the usual presentation of melanoma in dermoscopy and RCM, lacking atypical network and

other dermoscopic clues, as well as round pagetoid cells, striking DEJ disarrangement and round/pleomorphic atypical cells in single units and in clusters at the DEJ upon RCM. However, this peculiar pattern corresponded to proliferation of malignant melanocytes mainly in single units at the DEJ, thus accounting for being a relevant diagnostic clue, also in consideration of its evident difference from the RCM substrate in typical pigment network in the nevus.

The broadened pigmented network presented more rounded and polygonal cells than spindle and elongated cells mainly enlarging the rete ridges. We believe the existence of elongated and spindle cells leads to the papillae non-edged in RCM. Thus, we could observe the cytologic and architectural features in the transverse sections were more consistent, showing an exact correlation to dermoscopic pigment network and its corresponding confocal feature.

Dermoscopic globules in nevus and melanoma can be differentiated through cytologic atypia by means of RCM. RCM cell clusters correspond to histopathologic melanocytic nests. Dense clusters of monomorphous cells not connected with epidermis but surrounded by the epithelium characterized the nevus. Unlikely, striking cellular atypia was observable in the nests of the melanoma. Similarly, in transversals we could observe clearly the epithelium surrounding the nests of nevocytes in the





**Figure 5. Superficial spreading melanoma, Breslow thickness 0,79 mm.** This lesion shows on dermoscopy (A) pseudopods (white circle corresponds to the punch area). RCM mosaic image (B, 3×3 mm) at the level of the DEJ shows compact aggregates of atypical cells distributed in a linear arrangement toward the periphery with a dense nest at the extremity (the area inside the dashed square is represented in figure C). RCM individual image (C, 0,5×0,5 mm) at the level of the DEJ shows a pseudopod in detail, characterized by elongated, dense and bright peripheral aggregate. Perpendicular section (D) shows nests of atypical melanocytes distributed contiguously toward the periphery along the DEJ. Transverse section (E) shows nests of atypical cells arranged in a linear manner throughout the periphery of the lesion (black arrows).  
doi:10.1371/journal.pone.0081205.g005

nevus and the nests of atypical melanocytes in the melanoma, as they appear in RCM.

Interestingly, pseudopods in melanoma did not show striking cytological pleomorphism at RCM. In histopathology they correspond to confluent nests of pigmented melanoma cells at the periphery of the lesion, in agreement with the concept that these dermoscopic features are specific for the radial growth phase of melanoma [28]. In our case, melanocytic nests at the periphery of the lesion were constituted by medium-sized and quite monomorphic melanoma cells, showing only nuclear striking pleomorphism.

To sum up, from our study we showed the possibility to distinguish the benign or malignant nature of a dermoscopic pattern through its cytological analysis as it can be achieved by *in vivo* RCM. Histopathologic transversal sections helped us to correlate peculiar RCM findings with their substrate. Moreover, in case of pseudopods a striking RCM cytological pleomorphism does not represent a clue for melanoma diagnosis, since nuclear atypia in absence of cell morphology pleomorphism is not evaluable through RCM.

Last, we presented in our study the possibility to easily, safely and reliably perform transverse sections as a new approach to study and understand RCM feature meaning. Considering the

disagreement among pathologists on the diagnosis of MM versus benign melanocytic lesion and the less-than-ideal reproducibility of some histologic features of dysplastic nevi and MM, we may state that the identified RCM features and its direct correlation with transverse sections can help the evaluation of melanocytic lesions by both dermatologists and pathologists, [29] allowing for analysis of the tissue correlates of specific dermoscopic structures [6,21].

Combination of dermoscopy, RCM and transverse histologic sections may represent an advance in melanoma diagnosis and knowledge on the biology of melanocytic lesions.

## Acknowledgments

We thank Dr. Francisco Paschoal for giving us some insights.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JCTB GGR MDB. Performed the experiments: JCTB MPM CP MDB GGR. Analyzed the data: JCTB MDB GP GGR. Contributed reagents/materials/analysis tools: JCTB CP JD MDB GGR. Wrote the paper: JCTB MDB GP GGR. Critical revision: MDB GP JD GGR. Approved final version: MDB JD GGR.

## References

- Argenziano G, Soyer HP, Chimenti S, Talamini R, Corona R, et al. (2003) Dermoscopy of pigmented skin lesions: results of a consensus meeting via the Internet. *Journal of the American Academy of Dermatology* 48: 679–693.
- Pehamberger H, Steiner A and Wolff K (1987) *In vivo* epiluminescence microscopy of pigmented skin lesions. I. Pattern analysis of pigmented skin lesions. *Journal of the American Academy of Dermatology* 17: 571–583.

3. Guitera P, Menzies SW, Longo C, Cesinaro AM, Scolyer RA, et al. (2012) In vivo confocal microscopy for diagnosis of melanoma and basal cell carcinoma using a two-step method: analysis of 710 consecutive clinically equivocal cases. *The Journal of investigative dermatology* 132: 2386–2394.
4. Longo C, Zalaudek I, Argenziano G and Pellacani G (2012) New directions in dermatopathology: in vivo confocal microscopy in clinical practice. *Dermatologic clinics* 30: 799–814.
5. Pellacani G, Longo C, Malvehy J, Puig S, Carrera C, et al. (2008) In vivo confocal microscopy and histopathologic correlations of dermoscopic features in 202 melanocytic lesions. *Archives of dermatology* 144: 1597–1608.
6. Scope A, Benvenuto-Andrade C, Agero AL, Halpern AC, Gonzalez S, et al. (2007) Correlation of dermoscopic structures of melanocytic lesions to reflectance confocal microscopy. *Archives of dermatology* 143: 176–185.
7. Scope A, Gill M, Benvenuto-Andrade C, Halpern AC, Gonzalez S, et al. (2007) Correlation of dermoscopy with in vivo reflectance confocal microscopy of streaks in melanocytic lesions. *Archives of dermatology* 143: 727–734.
8. Soyer HP, Kenet RO, Wolf IH, Kenet BJ and Cerroni L (2000) Clinicopathological correlation of pigmented skin lesions using dermoscopy. *European journal of dermatology : EJD* 10: 22–28.
9. Rezze GG, Scramim AP, Neves RI and Landman G (2006) Structural correlations between dermoscopic features of cutaneous melanomas and histopathology using transverse sections. *Am J Dermatopathol* 28: 13–20.
10. Pellacani G, Cesinaro AM, Grana C and Seidenari S (2004) In vivo confocal scanning laser microscopy of pigmented Spitz nevi: comparison of in vivo confocal images with dermoscopy and routine histopathology. *Journal of the American Academy of Dermatology* 51: 371–376.
11. Rajadhyaksha M, Grossman M, Esterowitz D, Webb RH and Anderson RR (1995) In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin: melanin provides strong contrast. *The Journal of investigative dermatology* 104: 946–952.
12. Headington JT (1984) Transverse microscopic anatomy of the human scalp. A basis for a morphometric approach to disorders of the hair follicle. *Archives of dermatology* 120: 449–456.
13. Busam KJ, Charles C, Lee G and Halpern AC (2001) Morphologic features of melanocytes, pigmented keratinocytes, and melanophages by in vivo confocal scanning laser microscopy. *Mod Pathol* 14: 862–868.
14. Langley RG, Rajadhyaksha M, Dwyer PJ, Sober AJ, Flotte TJ, et al. (2001) Confocal scanning laser microscopy of benign and malignant melanocytic skin lesions in vivo. *Journal of the American Academy of Dermatology* 45: 365–376.
15. Pellacani G, Bassoli S, Longo C, Cesinaro AM and Seidenari S (2007) Diving into the blue: in vivo microscopic characterization of the dermoscopic blue hue. *Journal of the American Academy of Dermatology* 57: 96–104.
16. Pellacani G, Cesinaro AM, Longo C, Grana C and Seidenari S (2005) Microscopic in vivo description of cellular architecture of dermoscopic pigment network in nevi and melanomas. *Archives of dermatology* 141: 147–154.
17. Pellacani G, Cesinaro AM and Seidenari S (2005) In vivo assessment of melanocytic nests in nevi and melanomas by reflectance confocal microscopy. *Mod Pathol* 18: 469–474.
18. Pellacani G, Cesinaro AM and Seidenari S (2005) Reflectance-mode confocal microscopy of pigmented skin lesions—improvement in melanoma diagnostic specificity. *Journal of the American Academy of Dermatology* 53: 979–985.
19. Pellacani G, Cesinaro AM and Seidenari S (2005) Reflectance-mode confocal microscopy for the in vivo characterization of pagetoid melanocytosis in melanomas and nevi. *The Journal of investigative dermatology* 125: 532–537.
20. Pellacani G, Guitera P, Longo C, Avramidis M, Seidenari S, et al. (2007) The impact of in vivo reflectance confocal microscopy for the diagnostic accuracy of melanoma and equivocal melanocytic lesions. *The Journal of investigative dermatology* 127: 2759–2765.
21. Scope A, Benvenuto-Andrade C, Agero AL, Malvehy J, Puig S, et al. (2007) In vivo reflectance confocal microscopy imaging of melanocytic skin lesions: consensus terminology glossary and illustrative images. *Journal of the American Academy of Dermatology* 57: 644–658.
22. Guitera P, Pellacani G, Longo C, Seidenari S, Avramidis M, et al. (2009) In vivo reflectance confocal microscopy enhances secondary evaluation of melanocytic lesions. *The Journal of investigative dermatology* 129: 131–138.
23. Pellacani G, Scope A, Ferrari B, Pupelli G, Bassoli S, et al. (2009) New insights into neovogenesis: in vivo characterization and follow-up of melanocytic nevi by reflectance confocal microscopy. *Journal of the American Academy of Dermatology* 61: 1001–1013.
24. Kenet RO, Kang S, Kenet BJ, Fitzpatrick TB, Sober AJ, et al. (1993) Clinical diagnosis of pigmented lesions using digital epiluminescence microscopy. Grading protocol and atlas. *Archives of dermatology* 129: 157–174.
25. Pehamberger H, Binder M, Steiner A and Wolff K (1993) In vivo epiluminescence microscopy: improvement of early diagnosis of melanoma. *The Journal of investigative dermatology* 100: 356S–362S.
26. Steiner A, Binder M, Schemper M, Wolff K and Pehamberger H (1993) Statistical evaluation of epiluminescence microscopy criteria for melanocytic pigmented skin lesions. *Journal of the American Academy of Dermatology* 29: 581–588.
27. Yadav S, Vossaert KA, Kopf AW, Silverman M and Grin-Jorgensen C (1993) Histopathologic correlates of structures seen on dermoscopy (epiluminescence microscopy). *Am J Dermatopathol* 15: 297–305.
28. Menzies SW, Crotty KA and McCarthy WH (1995) The morphologic criteria of the pseudopod in surface microscopy. *Archives of dermatology* 131: 436–440.
29. Corona R, Mele A, Amini M, De Rosa G, Coppola G, et al. (1996) Interobserver variability on the histopathologic diagnosis of cutaneous melanoma and other pigmented skin lesions. *J Clin Oncol* 14: 1218–1223.

### 3 ARTIGO 2

**Tavoloni Braga JC**, Gomes E, Macedo MP, Pinto C, Duprat J, Begnami MD, Rezze GG. Early detection of melanoma arising within nevus spilus. **J Am Acad Dermatol.** 2014 Feb;70(2):e31-2. doi: 10.1016/j.jaad.2013.09.011. PubMed PMID: 24438974.

---

# Early detection of melanoma arising within nevus spilus

Juliana Casagrande Tavoloni Braga, MD,<sup>a</sup> Elimar Gomes, MD,<sup>a</sup> Mariana Petaccia Macedo, MD,<sup>b</sup> Clóvis Pinto, MD, PhD,<sup>b</sup> João Duprat, MD, PhD,<sup>a</sup> Maria Dirlei Begnami, MD, PhD,<sup>b</sup> and Gisele Gargantini Rezze, MD, PhD<sup>a</sup>  
*São Paulo, Brazil*

## CLINICAL PRESENTATION

A 31-year-old white man presented with dysplastic nevus syndrome (DNS) and nevus spilus (NS) on the middle left aspect of his back. There was no personal or family history of melanoma noted, and the patient underwent total body mapping and digital dermoscopy. During the examination of the patient's skin, the dermatologist noted a lesion within the NS with irregular borders, varied coloration, and a 6-mm diameter (Fig 1, A).

## DERMOSCOPIC APPEARANCE

The dermoscopic evaluation revealed a broadened network, structureless areas, and a few pepper-like granules (Fig 1, B).

## CONFOCAL MICROSCOPY APPEARANCE

Reflectance confocal microscopy (RCM) revealed a few atypical cells corresponding to pagetoid spread at the papillary dermis and an atypical meshwork pattern with enlarged interpapillary spaces and atypical melanocytes infiltration at the dermoepidermal junction (Fig 1, C).

## HISTOLOGIC DIAGNOSIS

An excisional biopsy specimen was obtained, and the histopathologic analysis confirmed in situ malignant melanoma (Fig 1, D and E).

---

From the Departments of Cutaneous Oncology<sup>a</sup> and Anatomy Pathology,<sup>b</sup> A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo.

Funding sources: None.

Conflicts of interest: None declared.

Reprint requests: Gisele Gargantini Rezze, MD, PhD, Department of Cutaneous Oncology, A.C. Camargo Cancer Center, Rua Barata

---

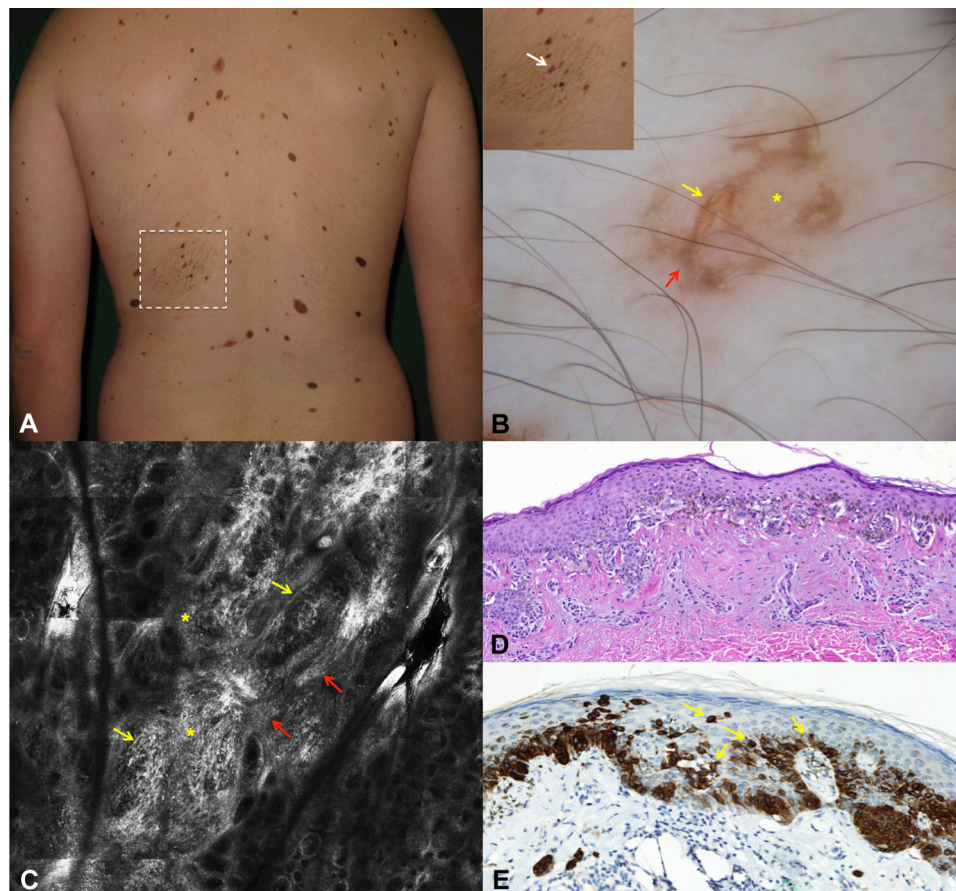
Ribeiro, 380 cj34, São Paulo, SP 01308-000, Brazil. E-mail: [ggrezze@hotmail.com](mailto:ggrezze@hotmail.com).

J Am Acad Dermatol 2014;70:e31-2.

0190-9622/\$36.00

© 2013 by the American Academy of Dermatology, Inc.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2013.09.011>



**Fig 1.** Melanoma arising within nevus spilus. **A**, Clinical picture showing patient with dysplastic nevus syndrome and nevus spilus (NS; *dashed square*). **B**, Dermoscopy of the suspected lesion within the NS (*white arrow*) revealed a broadened network (*yellow arrow*), structureless brown pigmentation (*yellow asterisk*), and pepper-like granules (*red arrow*) areas. **C**, Reflectance confocal microscopy of the central area of suspected lesion (*white arrow*) highlighted the meshwork pattern (*red arrows*), enlarged interpapillary spaces (*yellow asterisks*), and dendritic atypical cell infiltration of the dermal papilla (*yellow arrows*). **D**, The histopathologic examination revealed that this was an in situ malignant melanoma. **E**, Histopathology emphasizing the atypical dendritic cells within the epidermis and dermoepidermal junction as seen in reflectance confocal microscopy (*yellow arrows*). (**D**, Hematoxylin–eosin stain; **E**, melanin A stain; original magnifications: **B**,  $\times 10$ ; **E**,  $\times 200$ .)

### KEY MESSAGE

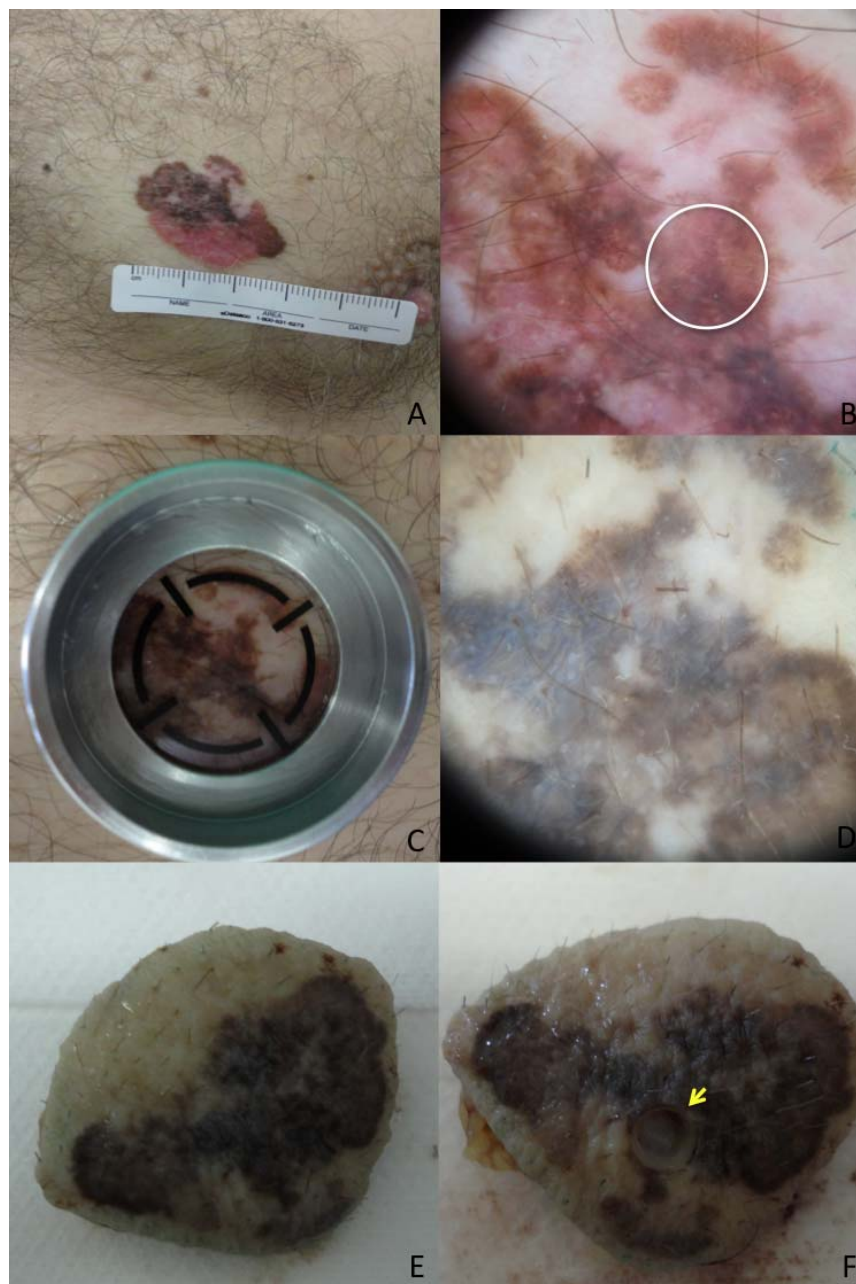
The prevalence of NS is estimated to be 1% to 2%; malignant transformation is rare. Nevertheless, patients with NS should be carefully evaluated for melanoma. In this case, the dermoscopic findings suspicious for melanoma were corroborated by RCM. Several studies have shown that RCM may help differentiate benign from malignant melanocytic lesions when used in conjunction with dermoscopy. There is no standardized management approach for NS, but we believe that sequential digital dermoscopy, with RCM if available, may assist in the detection of early melanoma.

## 4 COMENTÁRIOS

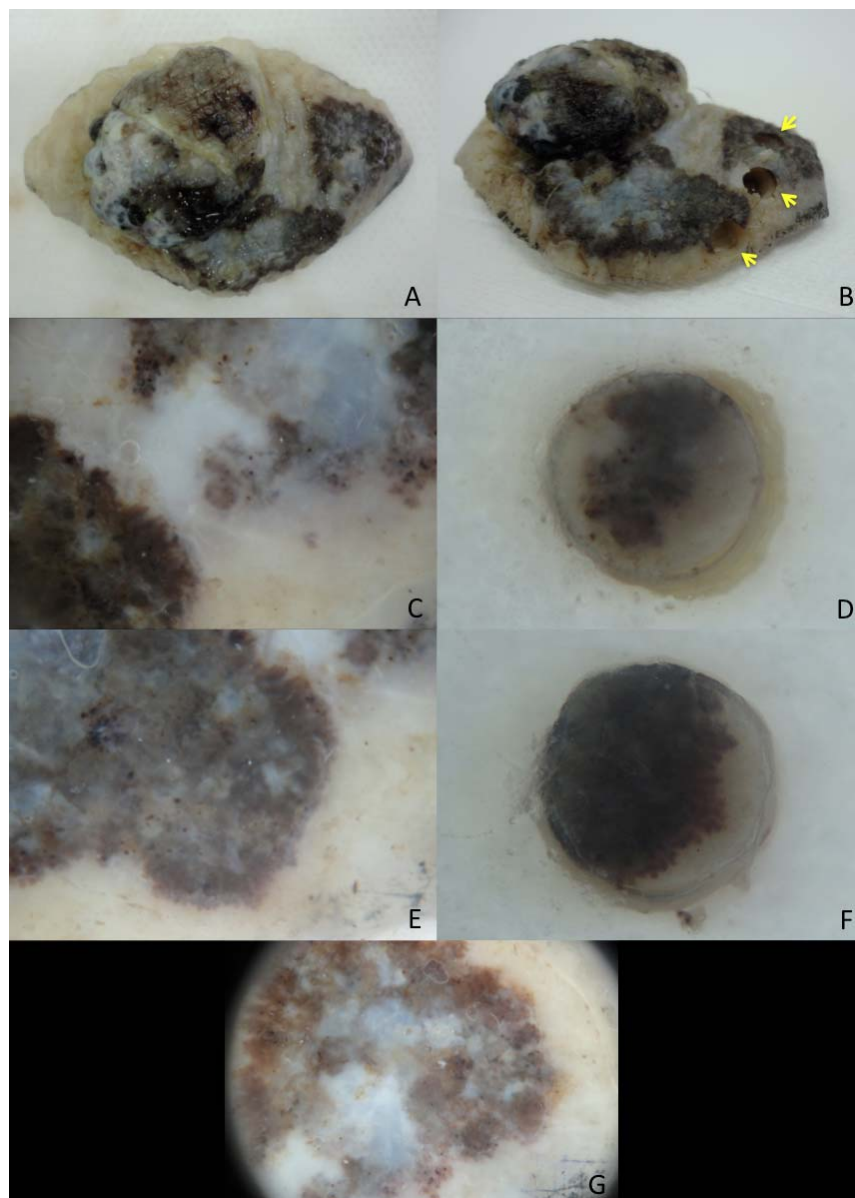
### 4.1 RESULTADOS

Os participantes deste estudo prospectivo foram recrutados durante a consulta médica realizada no ambulatório do Núcleo de Câncer da Pele e Dermatologia do A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, durante o período de junho de 2011 a abril de 2013. Após o consentimento pós-informado assinado (**Anexo 2**), as informações referentes aos pacientes foram registradas em protocolo preenchido durante a consulta médica. Foram incluídos a identificação, os dados demográficos, os antecedentes pessoais e informações relativas à história clínica. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do A.C. Camargo Cancer Center (Projeto de Pesquisa n° 1524/11) (**Anexo 3**). As lesões em couro cabeludo, região palmo-plantar, face, aparato ungueal e mucosa (regiões de difícil acesso para a dermatoscopia e microscopia confocal) foram excluídas.

Foram avaliadas 65 lesões com diagnóstico dermatoscópico de melanoma cutâneo de 63 pacientes, nas quais foram realizados o exame de MC e o processamento anatomopatológico. O *punch* foi efetuado na peça cirúrgica exatamente na área com a característica dermatoscópica de interesse (**Figuras 7 e 8**). Todos os pacientes foram analisados quanto ao sexo, idade, cor da pele e localização do melanoma. Uma paciente apresentava 3 melanomas sincrônicos, todos incluídos nesse estudo.



**Figura 7** - Realização do *punch* na peça cirúrgica. Melanoma extensivo superficial, Breslow 0,62 mm. **A.** Imagem clínica de placa eritematoacastanhada irregular no tronco. **B.** Dermatoscopia da estrutura dermatoscópica selecionada para estudo (rede pigmentar). **C.** Posicionamento do anel metálico para realização da microscopia confocal (MC). **D.** Dermatoscopia *ex vivo* da estrutura dermatoscópica selecionada (rede pigmentar). **E.** Imagem da peça cirúrgica. **F.** Imagem da peça cirúrgica sem o *punch* (seta amarela).



**Figura 8** - Dermatoscopia *ex vivo*. Melanoma extensivo superficial, Breslow 10,0 mm.  
**A.** Imagem da peça cirúrgica. **B.** Imagem da peça cirúrgica após retirada dos *punch* (setas amarelas). **C.** Dermatoscopia *ex vivo* da estrutura dermatoscópica selecionada (glóbulos). **D.** Dermatoscopia *ex vivo* do *punch* (glóbulos). **E.** Dermatoscopia *ex vivo* da estrutura dermatoscópica selecionada (pseudópodes). **F.** Dermatoscopia *ex vivo* do *punch* (pseudópodes). **G.** Dermatoscopia *ex vivo* da estrutura dermatoscópica selecionada (véu azul-esbranquiçado).



Dos 63 pacientes avaliados, 28 (44,4%) eram do sexo feminino e 35 (55,6%) do sexo masculino (**Tabela 1**). A idade ao diagnóstico variou de 28 a 90 anos com uma média de 58 anos (DP 15,56 anos).

**Tabela 1** - Classificação em relação ao sexo

<b>Sexo</b>	<b>Frequência</b>	<b>%</b>
Feminino	28	44,4
Masculino	35	55,6
Total	63	100,0

Destes pacientes, 62 (98,4%) eram brancos e 1 (1,6%) amarelo, nenhum paciente pardo ou negro (**Tabela 2**).

**Tabela 2** - Classificação em relação à raça

<b>Raça</b>	<b>Frequência</b>	<b>%</b>
Branca	62	98,4
Não branca	0	0,0
Amarela	1	1,6
Total	63	100,0

No que se refere à localização anatômica das lesões, das 65 lesões avaliadas, 35 (54%) estavam localizadas no tronco, 15 (23%) nos membros inferiores, 10 (15%) nos membros superiores e 5 (8%) no pescoço (**Tabela 3**).

**Tabela 3** - Classificação em relação à localização anatômica

Localização	Frequência	%
Pescoço	5	8
Membros superiores	10	15
Tronco	35	54
Membros inferiores	15	23
Total	65	100

No que diz respeito ao diagnóstico anatomopatológico, 59 (91%) eram melanomas e 6 (9%) não melanomas, que foram incluídos por interesse de estudo visto que suas características dermatoscópicas e da MC eram muito semelhantes às observadas nos melanomas cutâneos (**Tabela 4**). Dos 6 casos não melanomas, 4 eram nevos melanocíticos atípicos, 1 fibrose cicatricial e 1 ceratose seborréica com derrame pigmentar.

**Tabela 4** - Classificação em relação ao diagnóstico anatomopatológico

Diagnóstico Anatomopatológico	Frequência	%
Não Melanoma	6	9
Melanoma	59	91
Total	65	100

Quanto ao tipo histológico dos melanomas, 53 (90%) eram extensivo superficial, 3 (5%) nodular e 3 (5%) lentigo maligno (**Tabela 5**).

**Tabela 5** - Classificação em relação ao tipo histológico

Tipo Histológico	Frequência	%
Extensivo Superficial	53	90
Nodular	3	5
Lentigo Maligno	3	5
Total	59	100

Em 25 casos (42,4%), os melanomas eram *in situ*. Em relação à profundidade de infiltração (índice de Breslow), 19 (32,2%) eram melanomas < 1 mm, 6 (10,1%) entre 1,01 e 2 mm, 4 (6,8%) entre 2,01 e 4 mm, e 5 (8,5%) > 4 mm (**Tabela 6**). O índice de Breslow variou entre 0,2 e 10 mm, com uma média de 2,1 mm (DP 2,72 mm).

**Tabela 6** - Classificação em relação à profundidade de infiltração (Breslow)

Índice de Breslow	Frequência	%
<i>in situ</i>	25	42,4
< 1 mm	19	32,2
1,01 a 2 mm	6	10,1
2,01 a 4 mm	4	6,8
> 4 mm	5	8,5
Total	59	100,0

Regressão estava presente em 9 casos (15%). Havia nevo pré-existente em 14 casos (24%). Dos melanomas invasivos, 10 (29%) apresentavam ulceração e 19 (56%) mitose. Em relação à fase de crescimento, 11 (32%) apresentavam crescimento radial e 23 (68%) vertical. Já em relação ao nível de Clark, 10 (29%) eram melanomas Clark II, 14 (41%) Clark III, 8 (24%) Clark IV e 2 (6%) Clark V (**Tabela 7**).

**Tabela 7** - Classificação em relação às características anatomopatológicas

<b>Característica anatomopatológica</b>	<b>Categoria</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Ulceração	Ausência	24	71
	Presença	10	29
Clark	II	10	29
	III	14	41
	IV	8	24
	V	2	6
Regressão	Ausência	50	85
	Presença	9	15
Nevo pré-existente	Ausência	45	76
	Presença	14	24
Crescimento	Radial	11	32
	Vertical	23	68
Mitose	com mitose	19	56
	sem mitose	15	44

Quanto às características dermatoscópicas analisadas, 32 (39%) eram rede pigmentar, 11 (13%) glóbulos irregulares, 11 (13%) pseudópodes, 4 (5%) estrias radiadas, 7 (8%) véu azul-esbranquiçado, 9 (11%) *peppering*, 5 (6%) *blotch*, 3 (4%) área de despigmentação e 1 (1%) hipopigmentação irregular (**Tabela 8**).

**Tabela 8** – Áreas analisadas – características dermatoscópicas

<b>Categoria dermatoscópica</b>	<b>Frequência</b>	<b>%</b>
Rede Pigmentar Atípica	32	39
Glóbulos irregulares	11	13
Pseudópodes	11	13
Estrias radiadas	4	5
Véu azul-esbranquiçado	7	8
<i>Peppering</i>	9	11
<i>Blotch</i>	5	6
Área de Despigmentação	3	4
Hipopigmentação Irregular	1	1
Total	83	100

No total analisamos 83 características dermatoscópicas, pois uma paciente apresentou 3 melanomas sincrônicos; nos melanomas maiores de 3 cm foi realizado mais de 1 *punch*; e em alguns fragmentos de *punch* havia mais de uma característica dermatoscópica.

Foi elaborado um quadro geral descritivo com todos os casos incluídos nesse estudo, contendo: localização da lesão, diagnósticos confocal e anatomopatológico, e características dermatoscópicas avaliadas (**Anexo 4**).

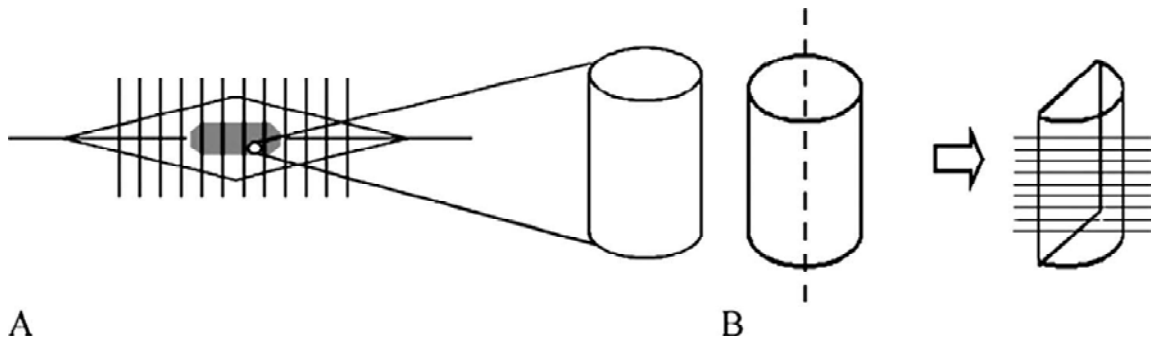
## 4.2 DISCUSSÃO

A MC oferece uma nova abordagem na avaliação das lesões melanocíticas com melhor acurácia diagnóstica (GUITERA et al. 2009). É uma técnica não invasiva, *in vivo*, que tem a capacidade de analisar a morfologia celular com resolução aproximada à histopatologia. O fato da MC avaliar o tecido no plano horizontal como a dermatoscopia e apresentar resolução celular como a histopatologia, faz com que esta técnica ocupe o espaço existente entre esses dois métodos.

Algumas publicações comparam as características dermatoscópicas aos achados da MC e à histopatologia em cortes perpendiculares, fornecendo a base para o estudo da morfologia tecidual das lesões melanocíticas (PELLACANI et al. 2005a, SCOPE et al. 2007a; PELLACANI et al. 2008). Porém, postula-se que para se obter uma precisa correlação entre os achados dermatoscópicos, confocais e histopatológicos, cortes

transversais seriados da amostra deveriam ser realizados (SCOPE et al. 2007a). Apesar do método para aquisição dos cortes histológicos transversais ser considerado tecnicamente complicado na literatura e ainda não padronizado (SCOPE et al. 2007a), demonstramos tratar-se de um procedimento aplicável e que permite uma excelente correlação entre as características dermatoscópicas, a MC e a histopatologia.

Na primeira etapa deste projeto, aperfeiçoamos a técnica dos cortes transversais previamente descrita por REZZE et al. (2006a) que é fundamentada em secções seriadas do espécime a partir da derme em direção à epiderme. Se as secções forem realizadas a partir da epiderme, uma menor quantidade de cortes é necessária, a epiderme fica mais retificada e, conseqüentemente, as imagens adquiridas são mais precisas para a correlação com a dermatoscopia e MC. Parafina extra foi adicionada à superfície de corte para evitar o desgaste do estrato córneo nas primeiras fatias. O índice de Breslow foi revisado no fragmento convencional do *punch* e mostrou-se menor ou igual ao restante da peça cirúrgica em todos os casos. Esta metodologia, baseada no método de Headington, mostrou-se de fácil execução e permitiu a realização dos cortes histológicos transversais sem causar prejuízo para os pacientes (HEADINGTON 1984; REZZE et al. 2006a) (**Figura 9**). Através desta técnica, conseguimos caracterizar melhor as estruturas observadas tanto na dermatoscopia quanto na MC.



**Fonte:** Modificado por REZZE et al. (2006b).

**Figura 9 - Método de Headington.** A. A peça cirúrgica é fixada em formol tamponado 10% por no mínimo 24 horas. Posteriormente, a área a ser estudada é retirada da peça excisada, utilizando-se um *punch* de 4 mm, para realização dos cortes histológicos perpendiculares e transversais. B. O cilindro obtido com o *punch* (espécime) é seccionado em duas metades: um desses fragmentos é incluído, transversalmente, no bloco de parafina e seções consecutivas (5 µm) são realizadas das camadas mais superficiais do estrato córneo em direção à derme, e então, coradas com Hematoxilina e Eosina.

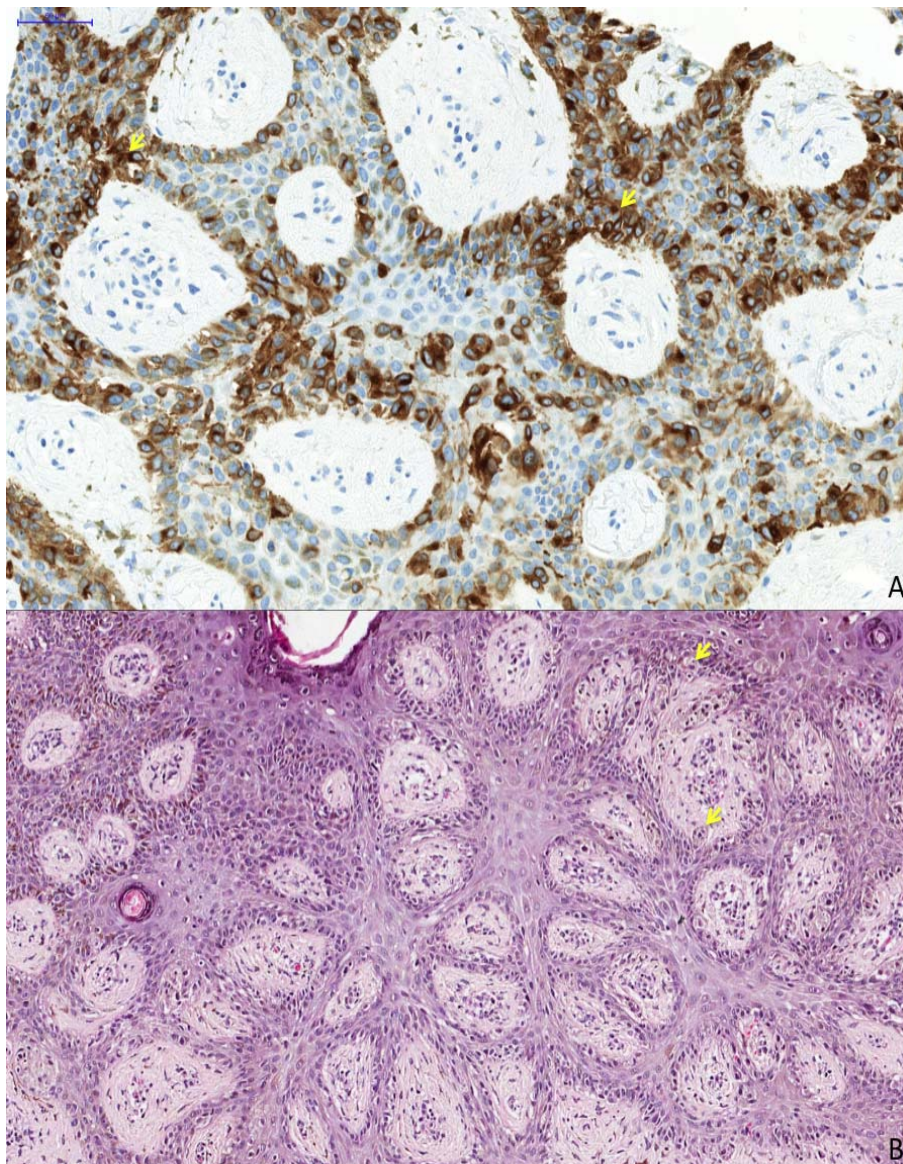
Neste estudo, examinamos um total de 65 lesões que apresentavam características dermatoscópicas sugestivas de melanoma cutâneo e comparamos estes achados à MC e aos cortes histológicos (perpendicular e transversal).

Um dos mais importantes critérios dermatoscópicos no diagnóstico das lesões melanocíticas é representado pela rede pigmentar. Uma rede mais pigmentada com traçado espesso e “buracos” irregulares é frequentemente observada nos melanomas cutâneos (ARGENZIANO et al. 2003). Observamos dois tipos de rede pigmentar nos 32 casos avaliados neste estudo: rede atípica ligeiramente pigmentada e rede atípica alargada.

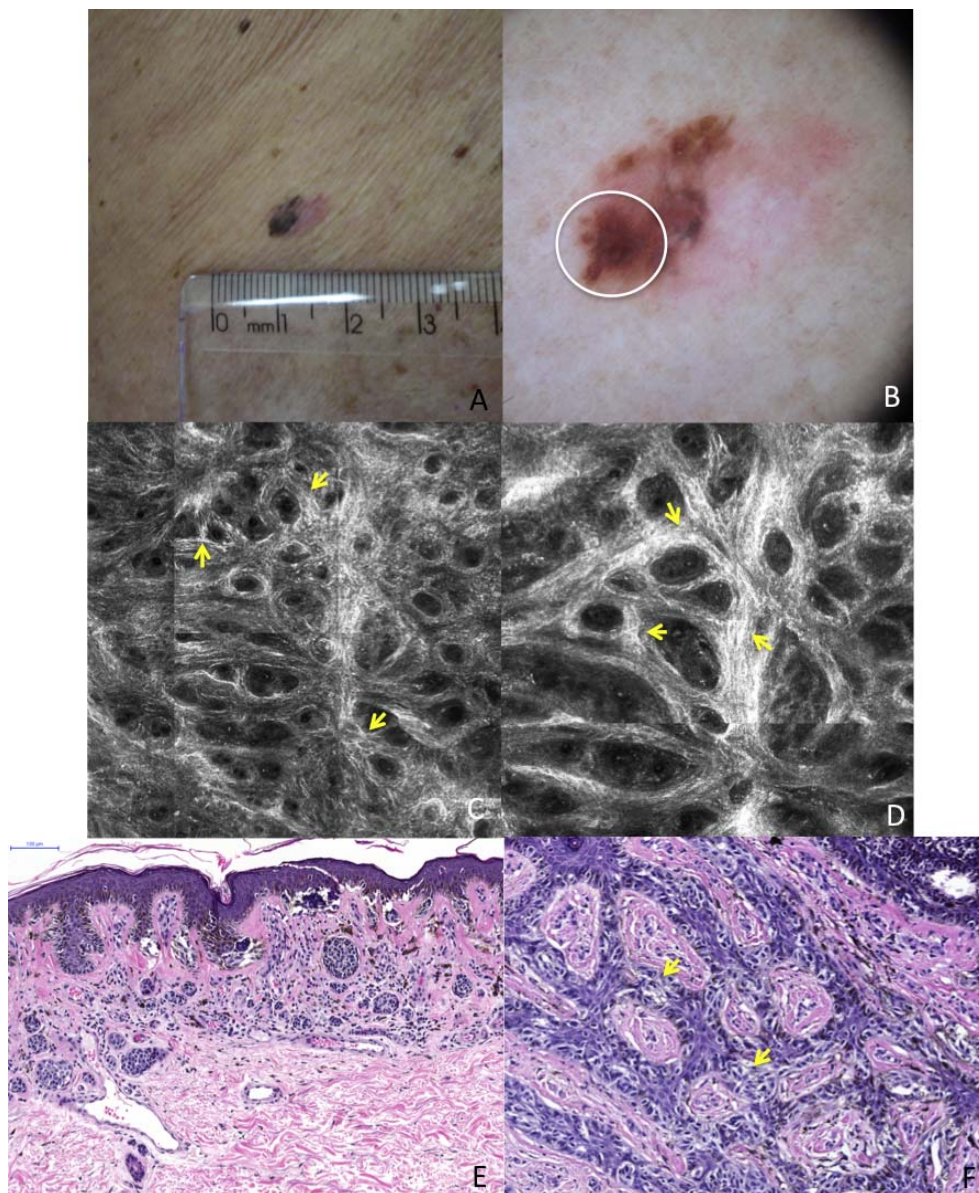
Em 19 casos (59%) de rede pigmentar, a MC revelou papilas dérmicas com brilho heterogêneo e irregulares no tamanho e forma. As papilas eram demarcadas e não demarcadas, separadas entre si por espaços interpapilares ampliados pela presença de células redondas

nucleadas e/ou dendríticas. Nos cortes transversais, observamos predomínio de melanócitos atípicos, isolados ou em ninhos, ampliando os espaços interpapilares. Essa proliferação desordenada de melanócitos atípicos na JDE pode obscurecer os ceratinócitos basais dispostos ao redor das papilas, resultando na formação das papilas não demarcadas visualizadas na MC (GILL et al. 2013) (**Figura 10**). Os achados citológicos e arquiteturais observados na MC nos casos de rede pigmentar foram mais consistentes com aqueles observados nos cortes transversais (**Figuras 11, 12 e 13**).

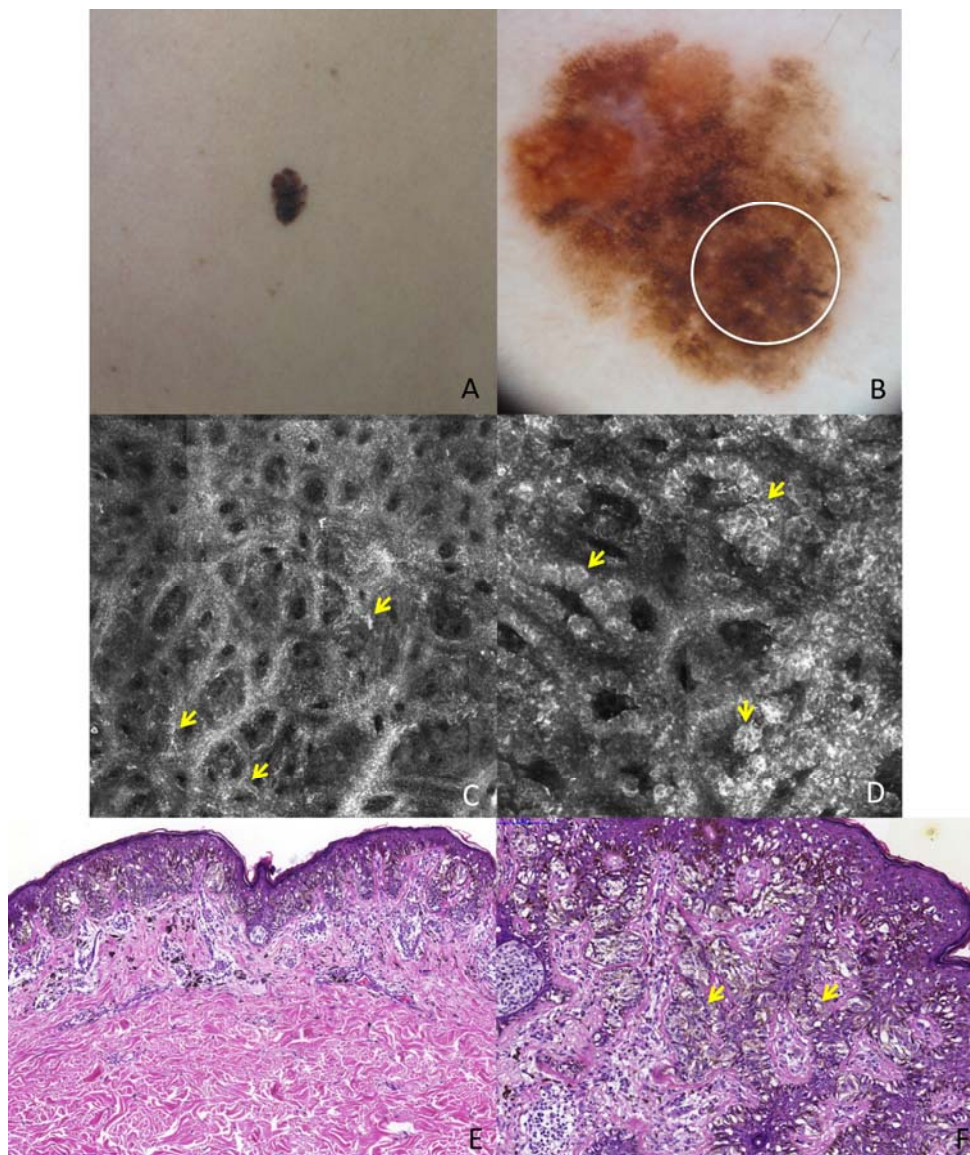




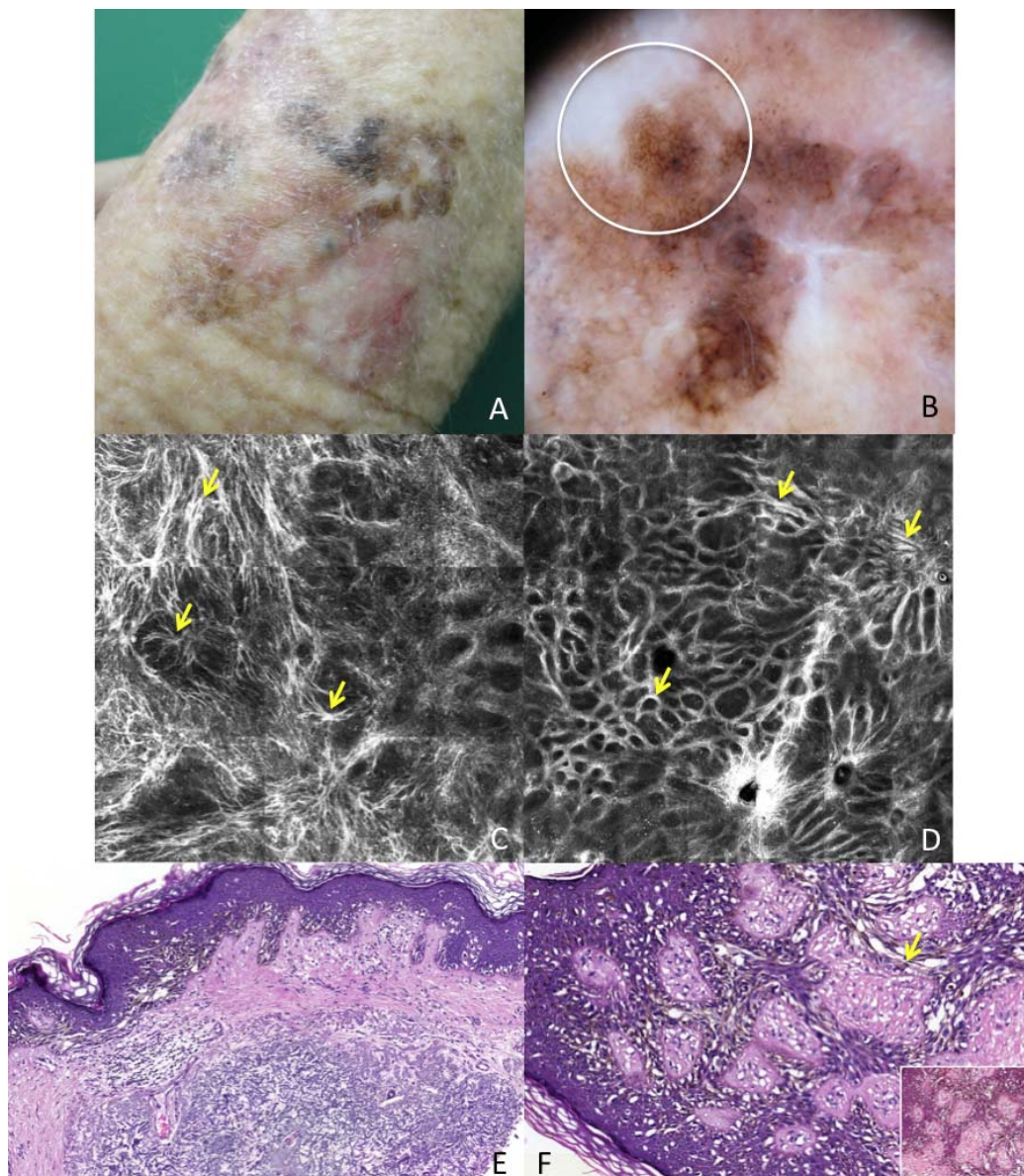
**Figura 10** - Papilas não demarcadas. Melanoma extensivo superficial, *in situ*. **A.** Corte histológico transversal (imunohistoquímica Melan A) mostra número aumentado de melanócitos atípicos organizados ao redor das papilas dérmicas e entre os ceratinócitos basais (setas amarelas). **B.** Corte histológico transversal (coloração HE) mostra número aumentado de melanócitos atípicos organizados ao redor das papilas dérmicas (setas amarelas), ampliando os espaços interpapilares.



**Figura 11** - Melanoma extensivo superficial, Breslow 0,27 mm: rede pigmentar atípica. **A.** Imagem clínica de uma placa eritematoacastanhada irregular em extremidade. **B.** Dermatoscopia mostra rede pigmentar atípica (círculo branco corresponde à área do *punch*). **C.** Imagem em mosaico na MC (1,5 x 1,5 mm), no nível da JDE, demonstrando papilas não demarcadas irregulares, separadas por espaços interpapilares alargados pela presença de células atípicas dendríticas (setas amarelas). **D.** Imagem em mosaico na MC (0,75 x 0,75 mm), no nível da JDE, mostra células atípicas dendríticas nos espaços interpapilares (setas amarelas). **E.** Corte histológico perpendicular (coloração HE) mostra presença de grande quantidade de melanócitos atípicos na JDE. **F.** Corte histológico transversal (coloração HE) mostra número aumentado de melanócitos atípicos isolados ou em ninhos ampliando os espaços interpapilares na JDE (setas amarelas).

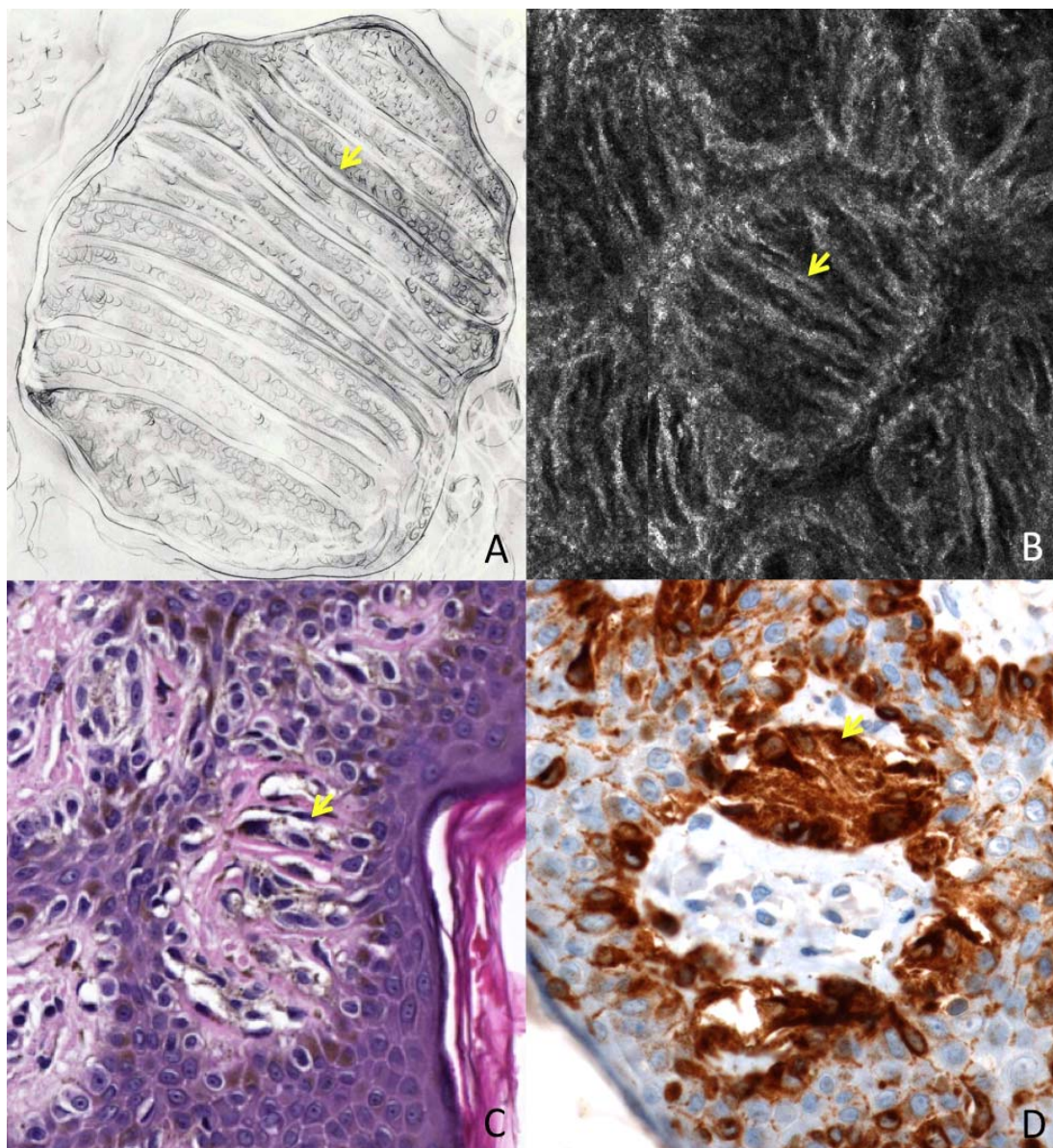


**Figura 12** - Melanoma extensivo superficial, *in situ*: rede pigmentar atípica. **A.** Imagem clínica de uma placa enegrecida irregular no dorso. **B.** Dermatoscopia mostra rede pigmentar atípica (círculo branco corresponde à área do *punch*). **C.** Imagem em mosaico na MC (1,5 x 1,5 mm), no nível da JDE, demonstrando papilas não demarcadas irregulares, separadas por espaços interpapilares alargados pela presença de células atípicas dendríticas (setas amarelas). **D.** Imagem em mosaico na MC (1 x 1 mm), no nível da JDE, mostra papilas demarcadas e não demarcadas irregulares, separadas por espaços interpapilares alargados pela presença de células atípicas isoladas ou em ninhos (setas amarelas). **E.** Corte histológico perpendicular (coloração HE) mostra presença de grande quantidade de melanócitos atípicos isolados ou em ninhos na JDE. **F.** Corte histológico transversal (coloração HE) mostra número aumentado de melanócitos atípicos isolados ou em ninhos organizados ao redor das papilas dérmicas (setas amarelas).

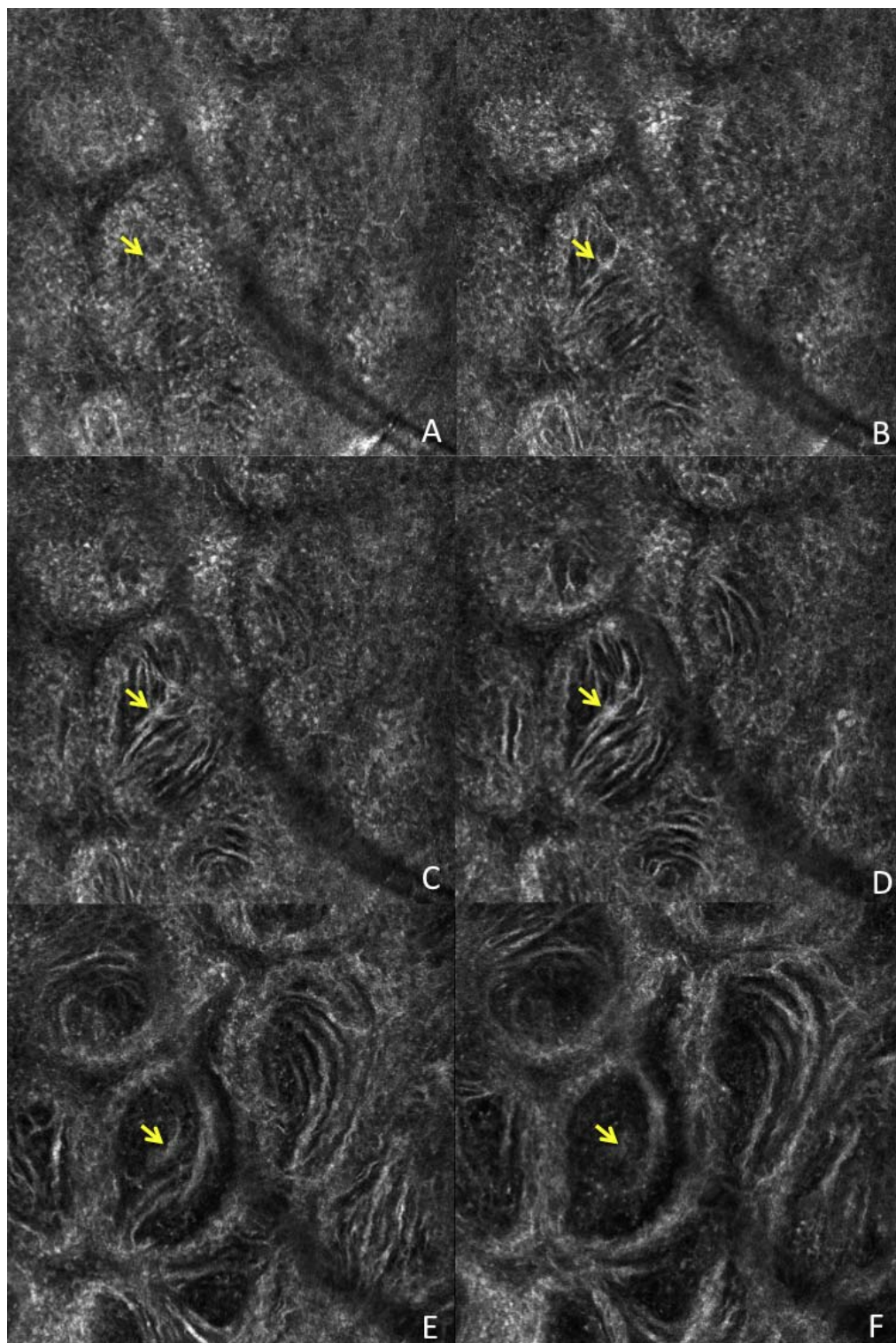


**Figura 13** - Melanoma extensivo superficial, *in situ*: rede pigmentar atípica. **A.** Imagem clínica de uma placa eritematoacastanhada irregular em extremidade. **B.** Dermatoscopia mostra rede pigmentar atípica (círculo branco corresponde à área do *punch*). **C.** Imagem em mosaico na MC (1,25 x 1,25 mm), no nível da JDE, demonstrando papilas não demarcadas irregulares, separadas por espaços interpapilares alargados pela presença de células atípicas dendríticas (setas amarelas). **D.** Imagem em mosaico na MC (3,5 x 3,5 mm), no nível da JDE, mostra espaços interpapilares alargados e papilas de diferentes tamanhos e formas (setas amarelas). **E.** Corte histológico perpendicular (coloração HE) mostra presença de grande quantidade de melanócitos atípicos na JDE. **F.** Corte histológico transversal (coloração HE) mostra número aumentado de melanócitos atípicos ampliando os espaços interpapilares na JDE (setas amarelas).

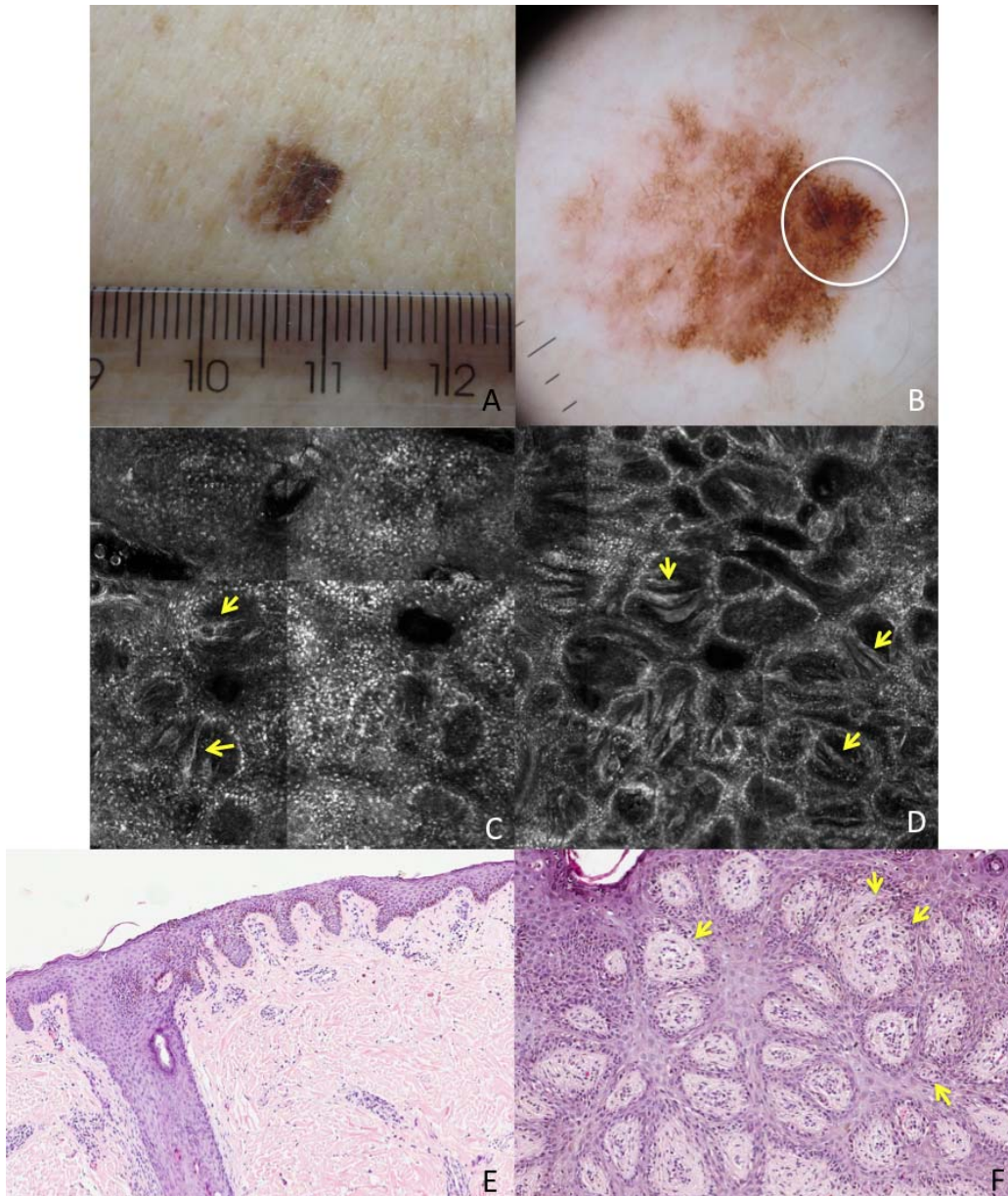
Nos 13 casos (41%) restantes de rede pigmentar, identificamos e descrevemos um novo critério na MC que foi denominado “papila em mitocôndria” pela sua semelhança à imagem de uma mitocôndria na microscopia eletrônica (**Figura 14**). Na MC, as “papilas em mitocôndria” aparecem como numerosas células dendríticas alongadas no nível da junção dermo-epidérmica. Algumas dessas células projetam-se da epiderme para o interior da papila, originando “pontes” dentro da derme papilar que são melhor visualizadas no nível da JDE (**Figura 15**). O substrato para justificar a presença dessas estruturas foi encontrado apenas nos cortes histológicos transversais que revelou um número aumentado de melanócitos atípicos organizados ao redor das papilas dérmicas, alguns projetando-se para o interior da derme (**Figuras 16, 17 e 18**). A imunohistoquímica pelo Melan A confirmou que essas células projetadas para o interior das papilas são melanócitos atípicos (**Figura 14**).



**Figura 14** - Papilas em mitocôndria. **A.** Desenho esquemático de uma mitocôndria na microscopia eletrônica. **B.** “Papilas em mitocôndria” na microscopia confocal. **C.** “Papilas em mitocôndria” na histopatologia (coloração HE). **D.** “Papilas em mitocôndria” na histopatologia (imunohistoquímica Melan A).

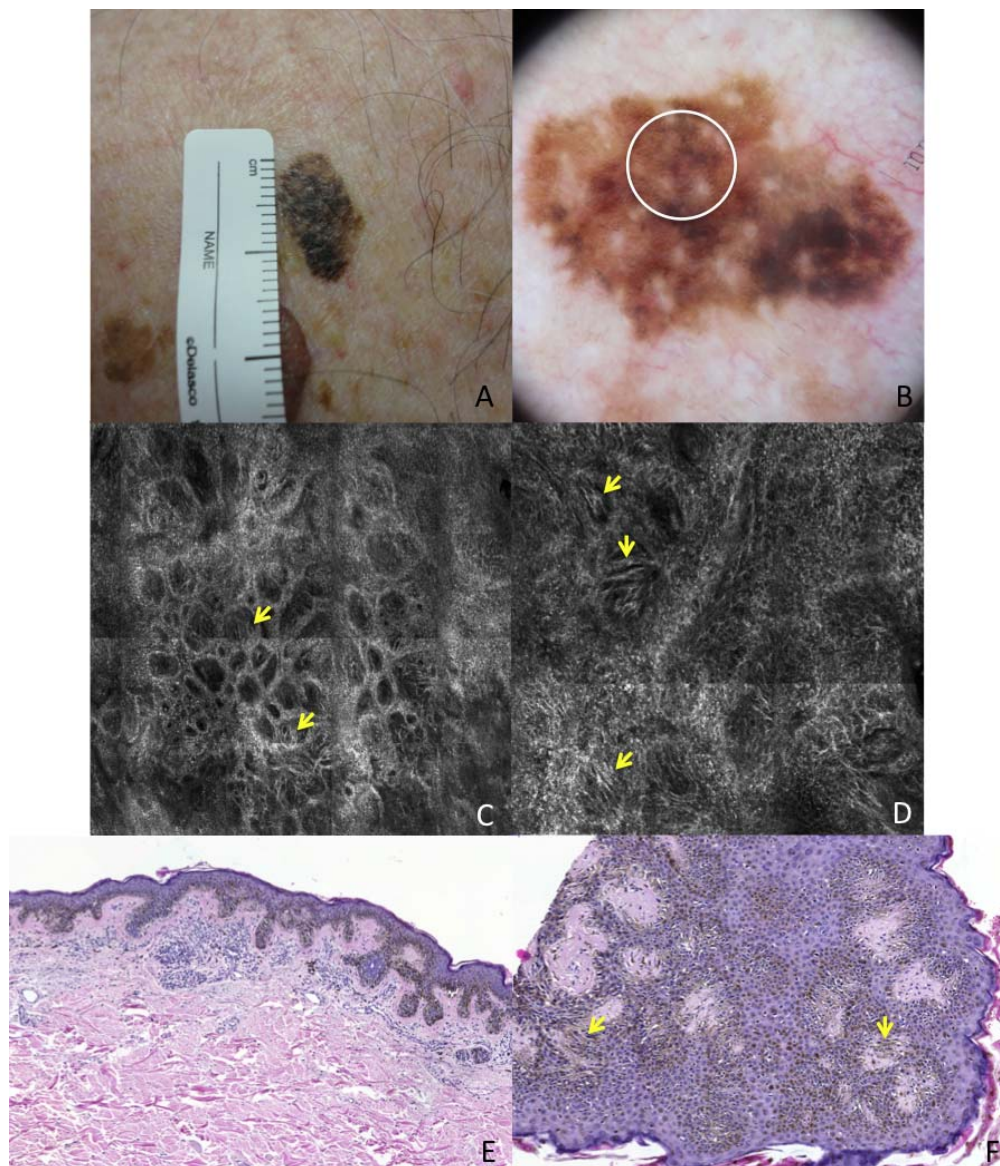


**Figura 15** - *Stack* das “papilas em mitocôndria” desde a epiderme até a derme papilar (**A a F**). Essa estrutura é melhor visualizada no nível da junção dermo-epidérmica (**D**).

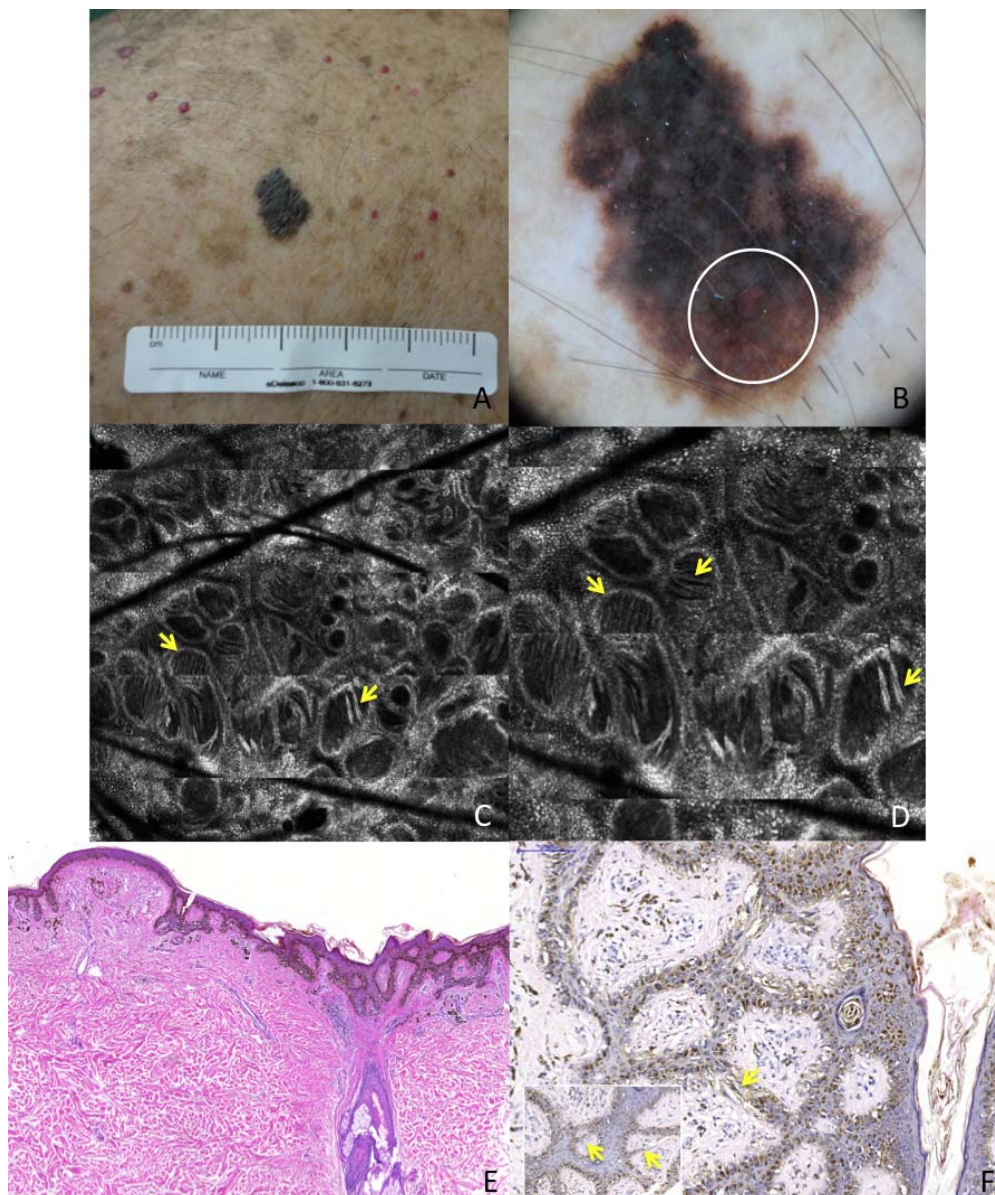


**Figura 16** - Melanoma extensivo superficial, *in situ*: rede pigmentar atípica. **A.** Imagem clínica de uma placa enegrecida irregular no dorso. **B.** Dermatoscopia com rede pigmentar atípica (círculo branco corresponde à área do *punch*). **C.** Imagem em mosaico na MC (1 x 1 mm), no nível da camada basal/JDE, demonstrando papilas dérmicas irregulares e brilho heterogêneo com células dendríticas (setas amarelas). **D.** Imagem em mosaico na MC (3 x 3 mm), no nível da JDE, mostra células dendríticas projetando-se em direção à derme formando “pontes” chamadas de “papilas em mitocôndria” (setas amarelas). **E.** Corte histológico perpendicular (coloração HE) mostra presença de grande quantidade de melanócitos atípicos na JDE. **F.** Corte histológico transversal (coloração HE) mostra número aumentado de melanócitos atípicos organizados ao redor das papilas dérmicas (setas amarelas), alguns desses melanócitos prejetam-se em direção à derme.





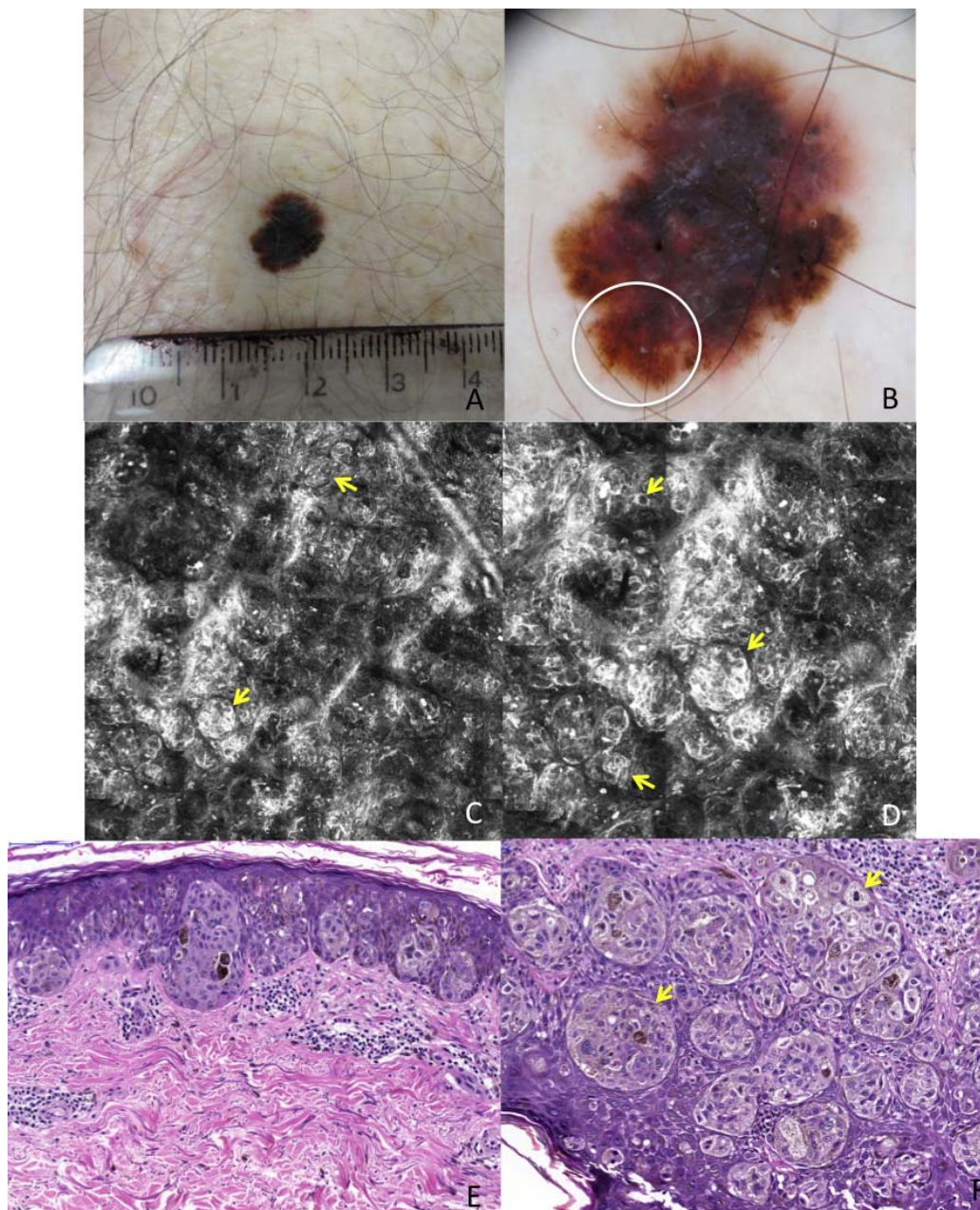
**Figura 17** - Melanoma extensivo superficial, Breslow 0,26 mm: rede pigmentar atípica. **A.** Imagem clínica de uma placa enegrecida irregular no tronco. **B.** Dermatoscopia mostra rede pigmentar atípica (círculo branco corresponde à área do *punch*). **C.** Imagem em mosaico na MC (2 x 2 mm), no nível da JDE, demonstrando papilas dérmicas irregulares e de brilho heterogêneo com células dendríticas (setas amarelas). **D.** Imagem em mosaico na MC (1 x 1 mm), no nível da JDE, mostra células dendríticas projetando-se da epiderme em direção à derme formando "pontes" chamadas de "papilas em mitocôndria" (setas amarelas). **E.** Corte histológico perpendicular (coloração HE) mostra desorganização das cristas interpapilares e presença de grande quantidade de melanócitos atípicos na JDE, nessa área o melanoma é *in situ*. **F.** Corte histológico transversal (coloração HE) mostra número aumentado de melanócitos atípicos organizados ao redor das papilas dérmicas, alguns desses melanócitos prejetam-se em direção à derme formando "pontes" (setas amarelas).



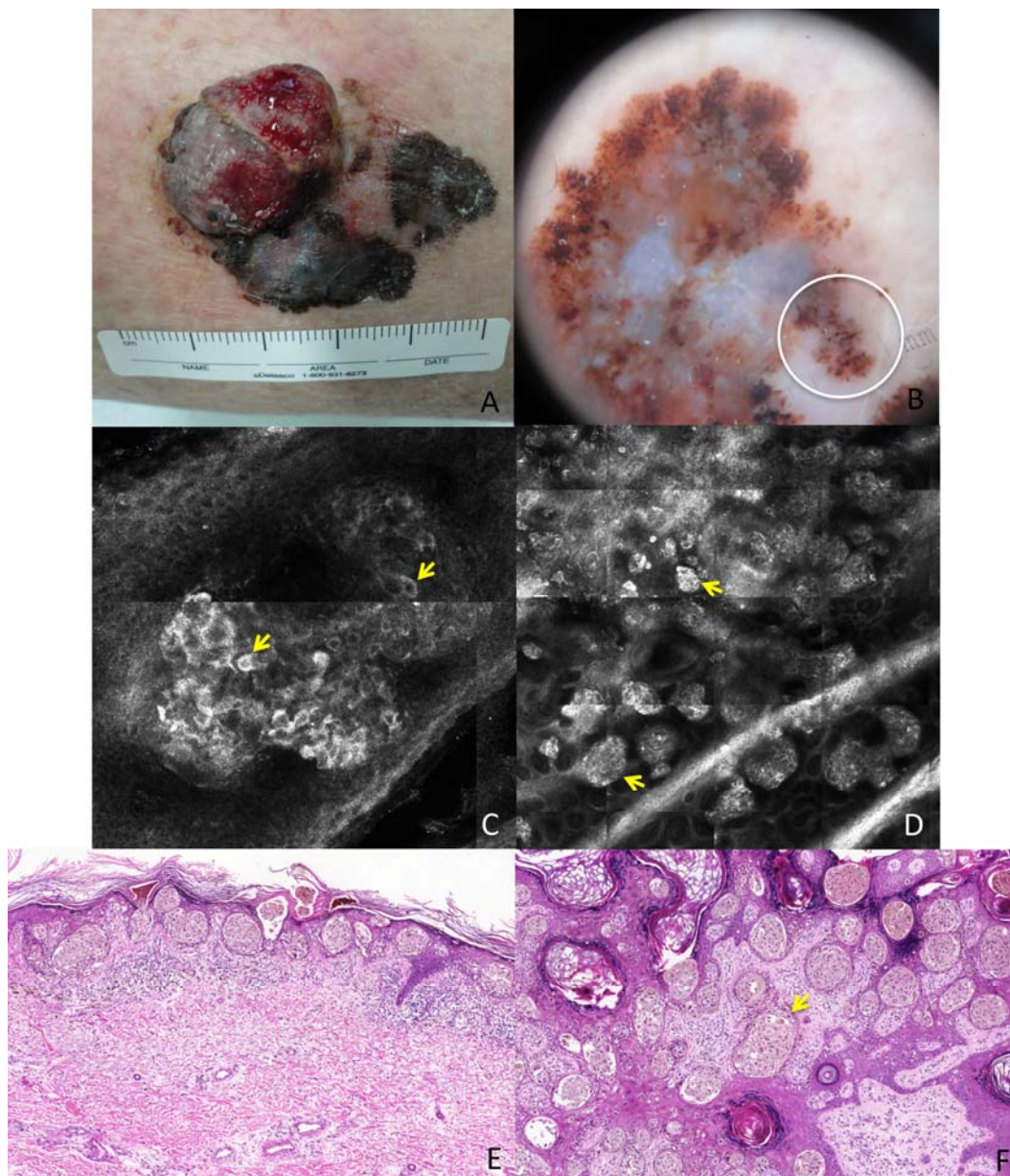
**Figura 18** - Melanoma extensivo superficial, *in situ*: rede pigmentar atípica. **A.** Imagem clínica de uma placa enegrecida irregular no dorso. **B.** Dermatoscopia mostra rede pigmentar atípica (círculo branco corresponde à área do *punch*). **C.** Imagem em mosaico na MC (2 x 2 mm), no nível da JDE, demonstrando papilas dérmicas irregulares e de brilho heterogêneo com células dendríticas (setas amarelas). **D.** Imagem em mosaico na MC (1,5 x 1,5 mm), no nível da JDE, mostra células dendríticas projetando-se da epiderme em direção à derme formando “pontes” chamadas de “papilas em mitocôndria” (setas amarelas). **E.** Corte histológico perpendicular (coloração HE) mostra desorganização das cristas interpapilares e presença de grande quantidade de melanócitos atípicos na JDE. **F.** Corte histológico transversal (coloração HE) mostra número aumentado de melanócitos atípicos organizados ao redor das papilas dérmicas, alguns desses melanócitos prejetam-se em direção à derme formando “pontes” (setas amarelas).

Encontramos as “papilas em mitocôndria” em 3 casos com diagnóstico anatomopatológico de nevo melanocítico atípico e em 10 de melanoma *in situ*, a maioria exibindo rede atípica ligeiramente pigmentada à dermatoscopia. O conhecimento dessas estruturas pelo dermatopatologista e a troca de informações com o dermatologista pode auxiliar no diagnóstico daqueles casos em que a diferenciação entre melanoma *in situ* e nevo melanocítico atípico for difícil histologicamente. Talvez as “papilas em mitocôndria” possam representar uma alteração estrutural incipiente em casos de melanoma *in situ* inicial, detectável à MC antes mesmo que os critérios diagnósticos histológicos sejam identificados nos cortes convencionais. Estudos futuros serão necessários para validar a importância dessa nova característica na MC e para avaliar se a identificação desse achado específico pode melhorar a acurácia diagnóstica do melanoma cutâneo.

Os glóbulos irregulares aparecem na MC como agregados compactos irregulares de grandes células atípicas com morfologia e brilho heterogêneos. A atipia celular é notável e as células são frouxamente agregadas entre si (agregados “denso e esparso”). Similarmente, nos cortes histológicos transversais observamos ninhos compactos de melanócitos pleomórficos, variáveis no tamanho e forma, distribuídos na JDE e derme papilar (**Figuras 19 e 20**).

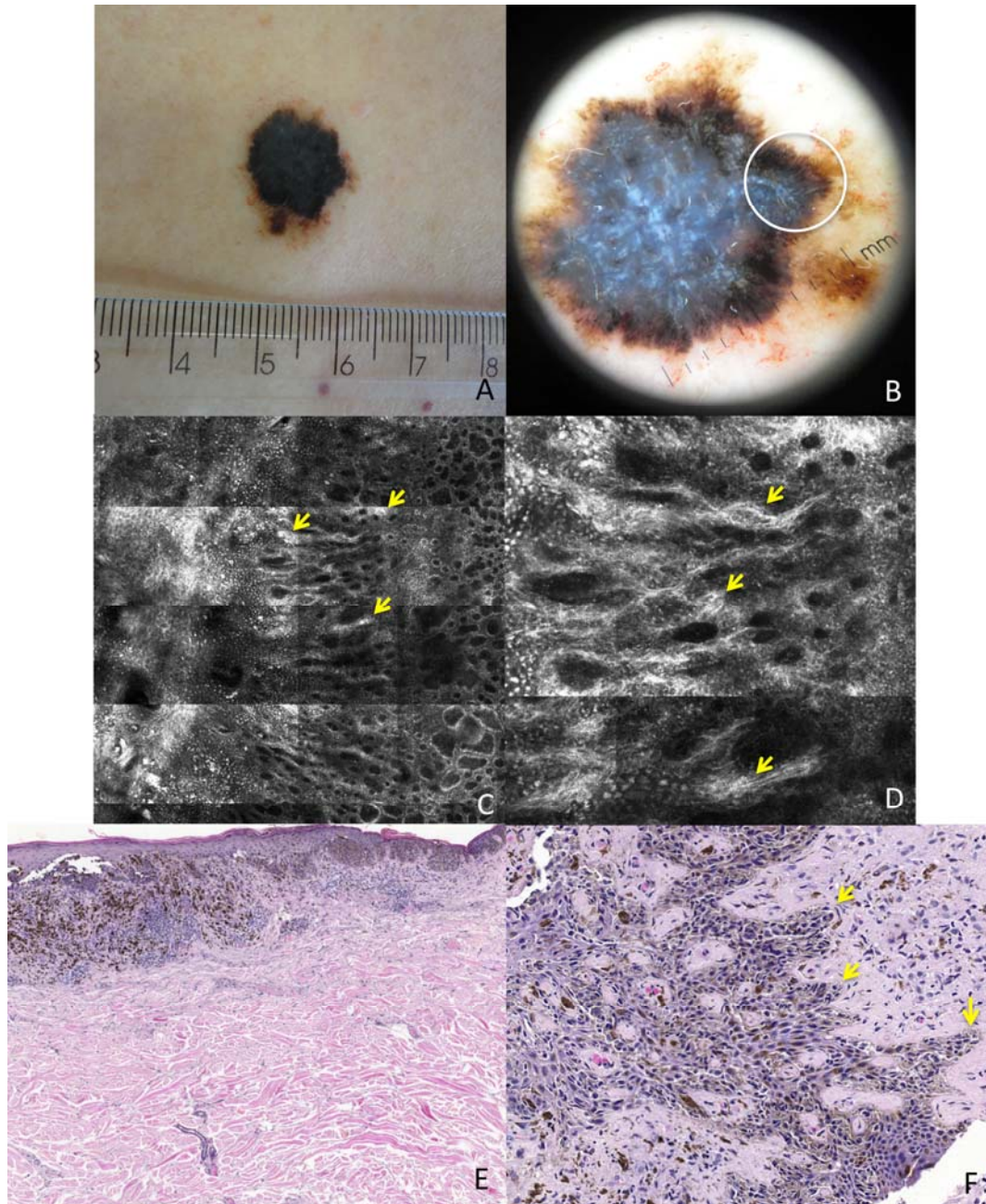


**Figura 19** - Melanoma extensivo superficial, Breslow 1,0 mm: glóbulos irregulares. **A.** Imagem clínica de uma placa enegrecida irregular em extremidade (coxa). **B.** Dermatoscopia mostra glóbulos irregulares (círculo branco corresponde à área do *punch*). **C.** Imagem em mosaico na MC (2 x 2 mm), no nível da JDE, demonstrando agregados irregulares compostos de células com morfologia e brilho heterogêneos (setas amarelas). **D.** Imagem em mosaico na MC (1 x 1 mm), no nível da JDE, mostra agregados de células atípicas com morfologia e brilho heterogêneos (setas amarelas). **E.** Corte histológico perpendicular (coloração HE) mostra ninhos de melanócitos atípicos distribuídos na JDE. **F.** Corte histológico transversal (coloração HE) mostra grande quantidade de melanócitos atípicos predominantemente em ninhos de tamanho e formato variáveis dentro da epiderme e JDE (setas amarelas).

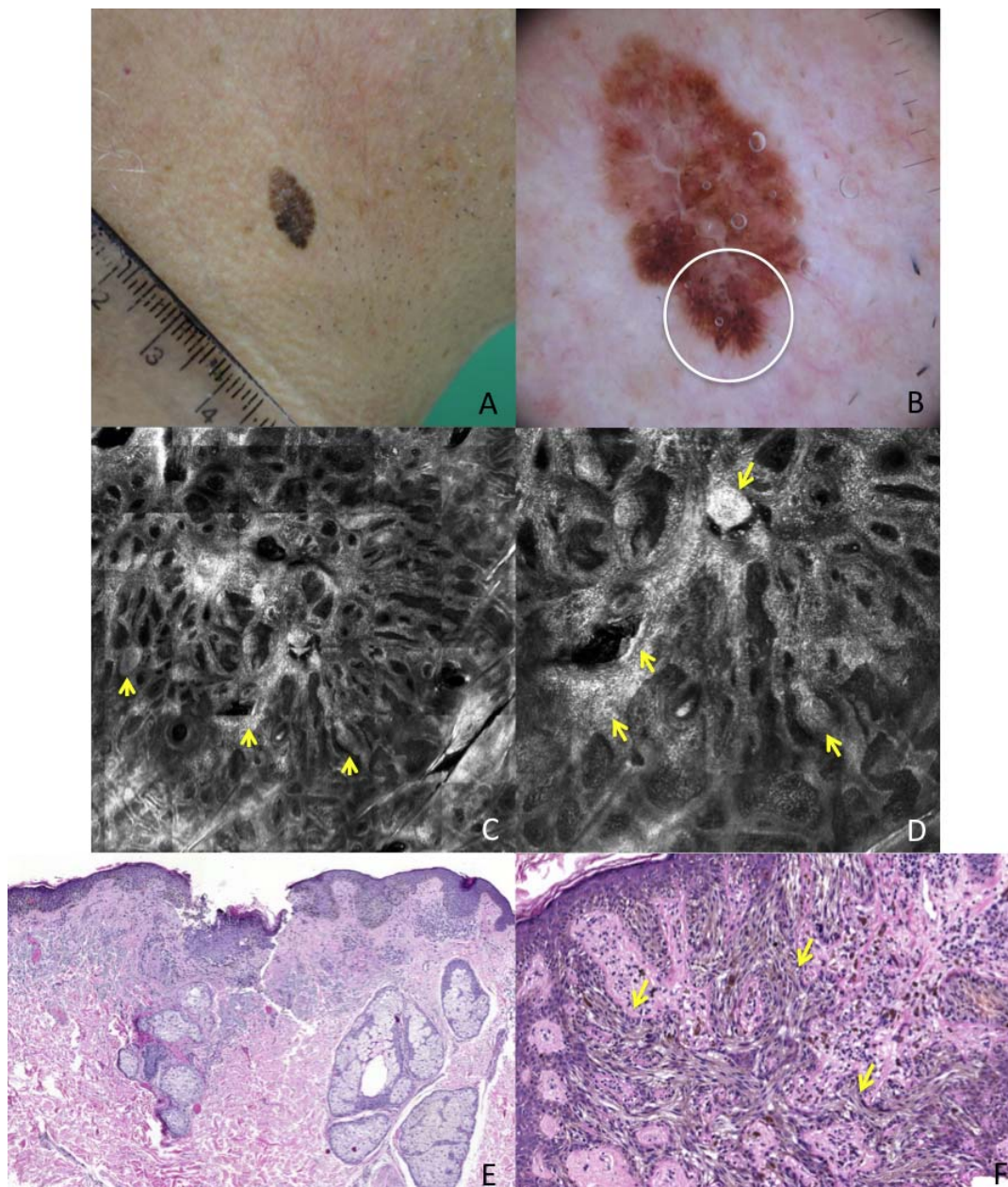


**Figura 20** - Melanoma extensivo superficial, Breslow 10,0 mm: glóbulos irregulares. **A.** Imagem clínica de tumoração enegrecida sangrenta em extremidade (perna). **B.** Dermatoscopia mostra glóbulos irregulares (círculo branco corresponde à área do *punch*). **C.** Imagem em mosaico na MC (0,5 x 0,5 mm), no nível da JDE, demonstrando agregado irregular “denso e esparso” composto de células atípicas com morfologia e brilho heterogêneos (setas amarelas). **D.** Imagem em mosaico na MC (2 x 2 mm), no nível da JDE, mostra agregados irregulares com morfologia e brilho heterogêneos (setas amarelas). **E.** Corte histológico perpendicular (coloração HE) mostra ninhos de melanócitos atípicos distribuídos na JDE. **F.** Corte histológico transversal (coloração HE) mostra grande quantidade de melanócitos atípicos predominantemente em ninhos de tamanho e formato variáveis dentro da epiderme e JDE (seta amarela).

As estrias radiadas são estruturas dermatoscópicas que levam à suspeita de melanoma, principalmente quando assimetricamente distribuídas. Elas representam a extensão radial do tumor e portanto, são de difícil correlação com os achados histopatológicos convencionais (SCOPE et al. 2007a, b). Na MC, essas estruturas apareceram como linhas paralelas brilhantes e/ou agregados de células atípicas alongadas, projetados em direção à periferia e contíguos com o centro da lesão. Nos cortes transversais, encontramos a exata representação histológica das estrias radiadas que aparecem como ninhos alongados de melanócitos atípicos progredindo centrifugamente em direção à periferia da lesão (**Figuras 21 e 22**). Não foi possível observar esses achados nos cortes histológicos perpendiculares onde o plano de visão é vertical.



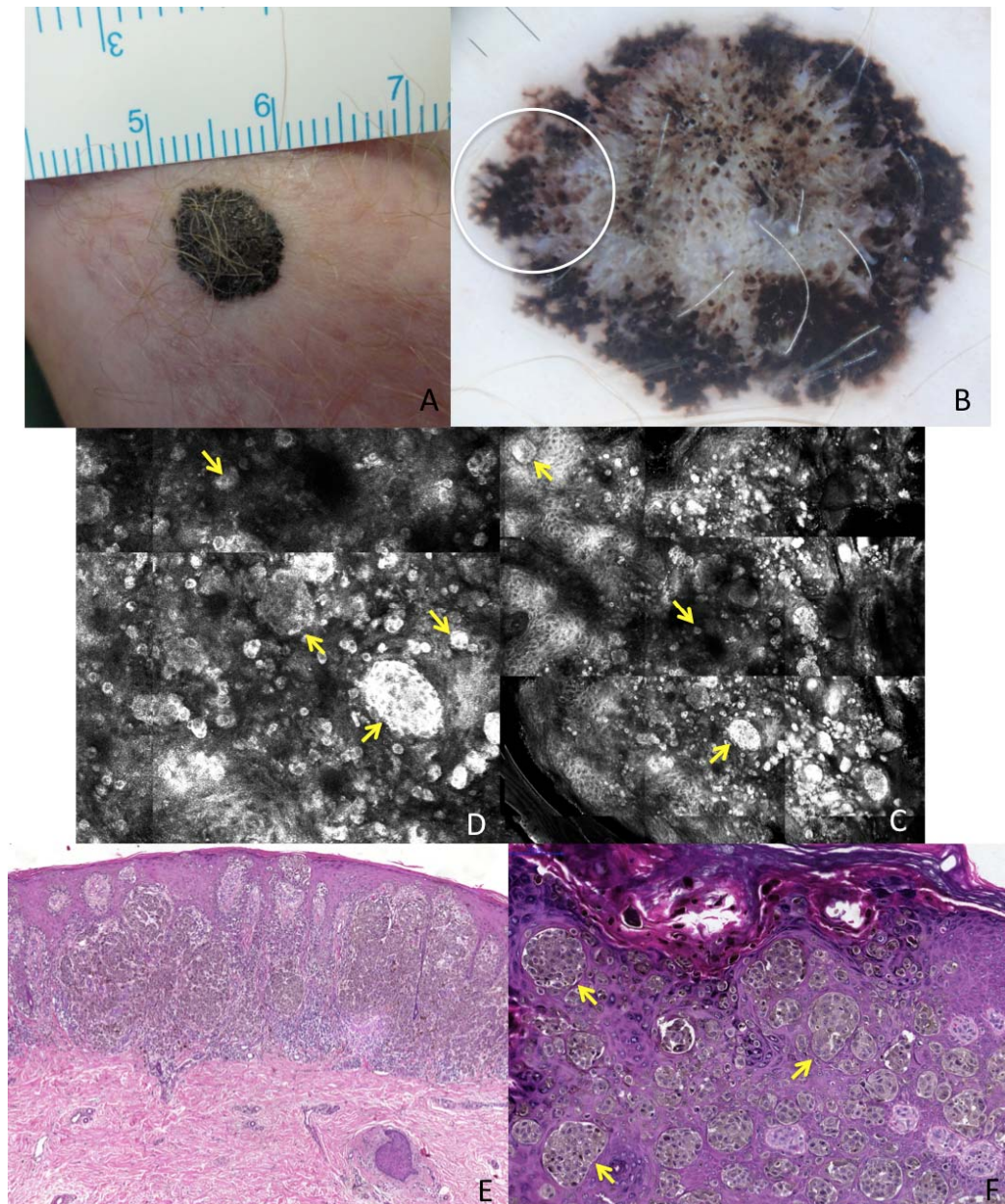
**Figura 21** - Melanoma extensivo superficial, *in situ*: estrias radiadas. **A.** Imagem clínica de placa enegrecida no dorso. **B.** Dermatoscopia mostra estrias radiadas (círculo branco corresponde à área do *punch*). **C.** Imagem em mosaico na MC (2 x 2 mm), no nível da JDE, demonstrando linhas paralelas brilhantes de células atípicas projetadas em direção à periferia da lesão (setas amarelas). **D.** Imagem em mosaico na MC (0,5 x 0,5 mm), no nível da JDE, mostra linhas paralelas brilhantes de células atípicas dendríticas (setas amarelas). **E.** Corte histológico perpendicular (coloração HE) mostra ninhos de melanócitos atípicos na JDE que progridem em direção à periferia da lesão. **F.** Corte histológico transversal (coloração HE) mostra ninhos alongados de melanócitos atípicos que progridem centrifugamente em direção à periferia da lesão (setas amarelas).



**Figura 22** - Melanoma extensivo superficial, Breslow 0,5 mm: estrias radiadas. **A.** Imagem clínica de placa enegrecida em região cervical. **B.** Dermatoscopia mostra estrias radiadas (círculo branco corresponde à área do *punch*). **C.** Imagem em mosaico na MC (3 x 3 mm), no nível da JDE, demonstrando linhas paralelas e agregados brilhantes de células atípicas projetados em direção à periferia da lesão (setas amarelas). **D.** Imagem em mosaico na MC (0,75 x 0,75 mm), no nível da JDE, mostra linhas paralelas e agregados brilhantes de células atípicas (setas amarelas). **E.** Corte histológico perpendicular (coloração HE) mostra ninhos de melanócitos atípicos na JDE. **F.** Corte histológico transversal (coloração HE) mostra ninhos arredondados e alongados de melanócitos atípicos que progridem centrifugamente em direção à periferia da lesão (setas amarelas).

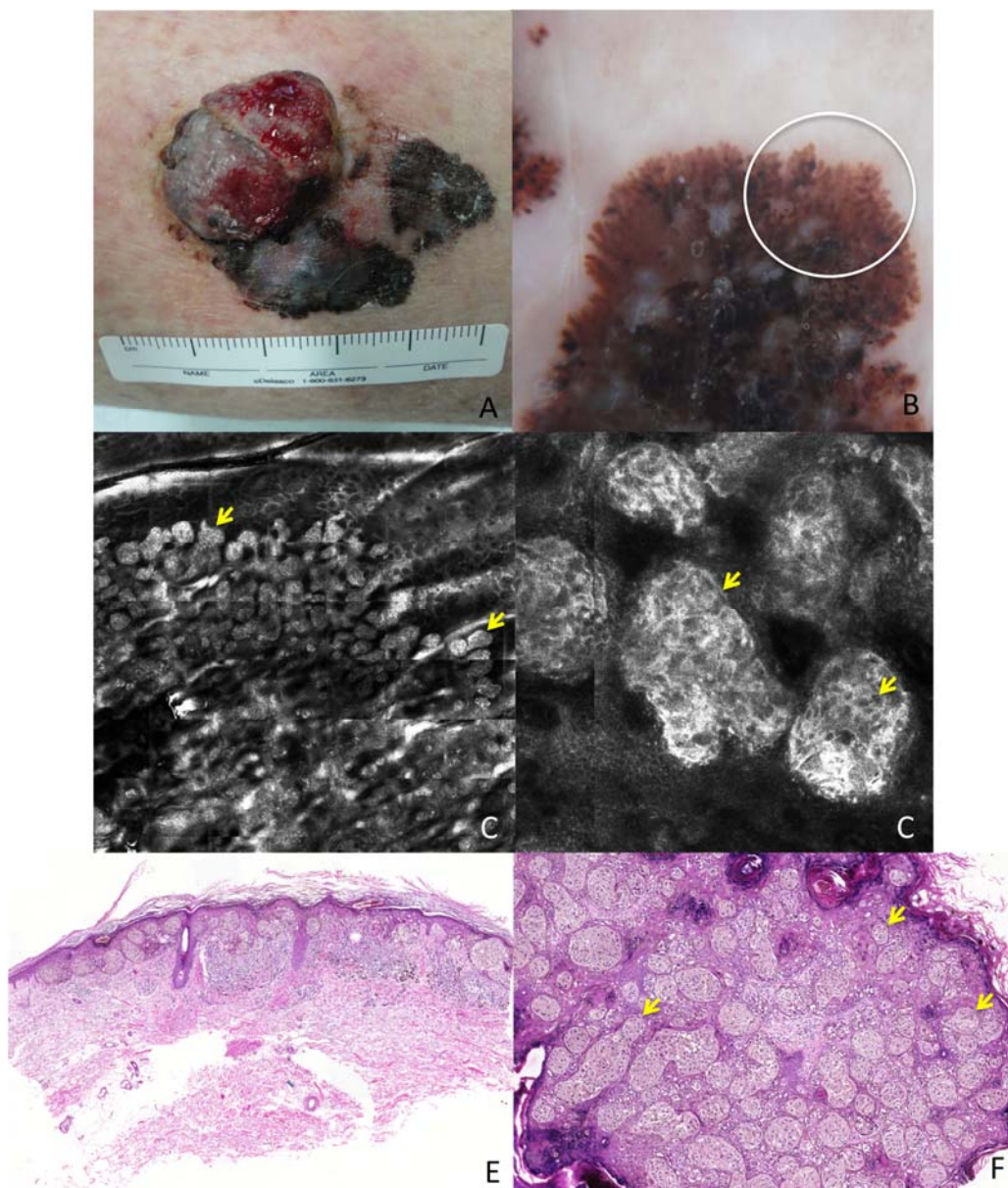


Os pseudópodes foram visualizados na MC como agregados de melanócitos organizados em cordões paralelos alongados com estrutura globular na extremidade, localizados logo abaixo da camada basal e distribuídos linearmente em direção à periferia. Em alguns casos deste estudo, os agregados apresentaram brilho heterogêneo mas sem atipia celular evidente; e em outros, encontramos agregados irregulares com algumas células pleomórficas. Nos cortes transversais, os pseudópodes corresponderam a ninhos arredondados e/ou alongados de melanócitos atípicos organizados de maneira linear em direção à periferia da lesão, afirmando o conceito de que essas estruturas são específicas da fase de crescimento radial do melanoma (MENZIES et al. 1995) (**Figuras 23 e 24**). Na análise histológica perpendicular, os melanócitos atípicos estavam organizados predominantemente em ninhos na epiderme e JDE.



**Figura 23** - Melanoma extensivo superficial, Breslow 1,5 mm: pseudopódes.

**A.** Imagem clínica de placa enegrecida na extremidade (dorso do pé). **B.** Dermatoscopia mostra pseudópodes (círculo branco corresponde à área do *punch*). **C.** Imagem em mosaico na MC (0,5 x 0,5 mm), no nível da JDE, demonstrando agregados compactos de células atípicas (setas amarelas). **D.** Imagem em mosaico na MC (1,5 x 1,5 mm), no nível da JDE, mostra agregados compactos de células atípicas distribuídos linearmente em direção à periferia da lesão, com um ninho denso na extremidade (setas amarelas). **E.** Corte histológico perpendicular (coloração HE) mostra ninhos de melanócitos atípicos distribuídos de forma contígua em direção à periferia, ao longo da JDE. **F.** Corte histológico transversal (coloração HE) mostra ninhos de melanócitos atípicos dispostos linearmente ao longo da periferia da lesão (setas amarelas).



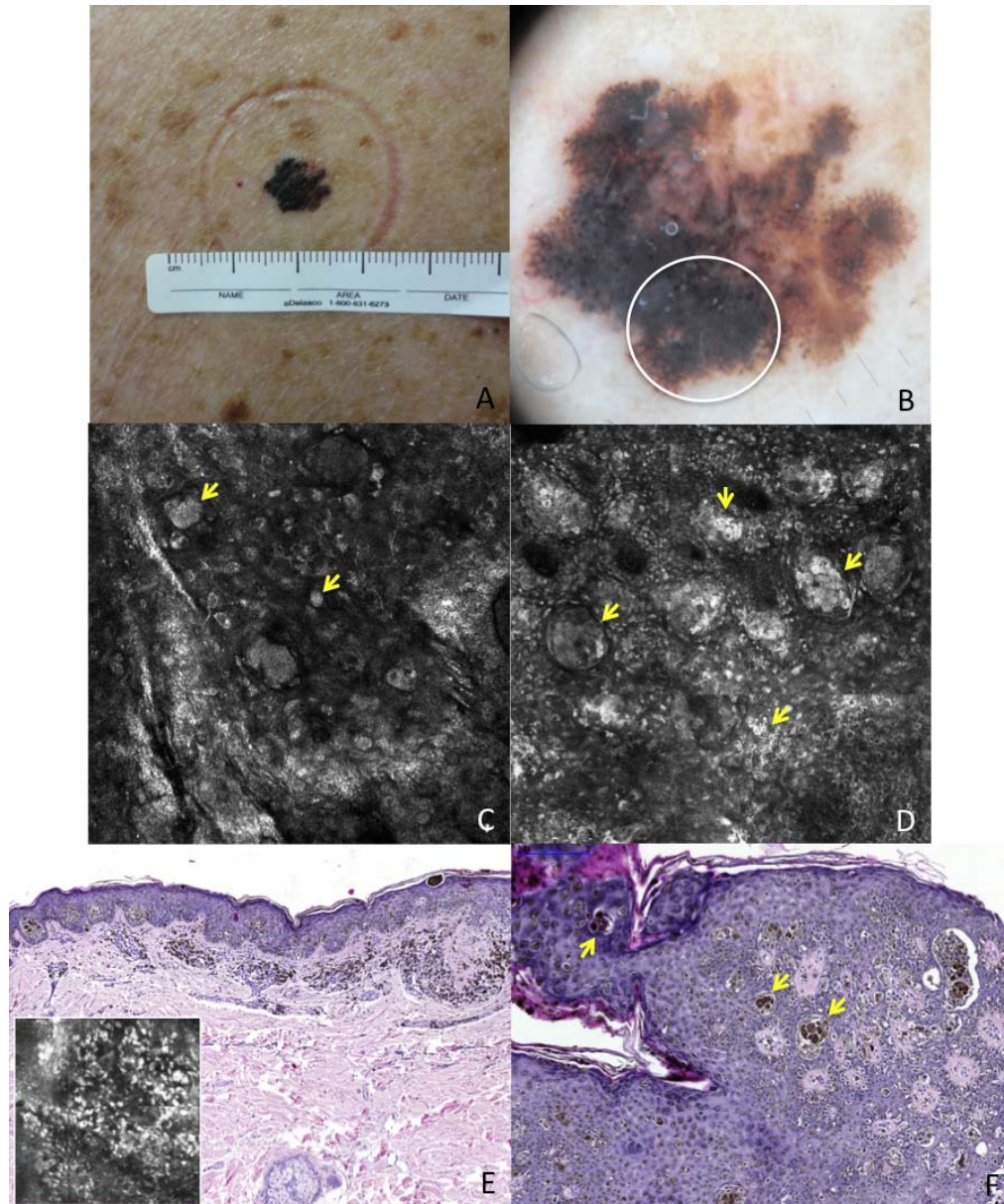
**Figura 24** - Melanoma extensivo superficial, Breslow 10,0 mm: pseudópodes.

**A.** Imagem clínica de tumoração enegrecida sangrante em extremidade (perna). **B.** Dermatoscopia mostra pseudópodes (círculo branco corresponde à área do *punch*). **C.** Imagem em mosaico na MC (3,5 x 3,5 mm), no nível da JDE, demonstrando agregados compactos com brilho heterogêneo distribuídos linearmente em direção à periferia da lesão, com um ninho denso na extremidade (setas amarelas). **D.** Imagem em mosaico na MC (0,5 x 0,5 mm), no nível da JDE, mostra agregados compactos com brilho heterogêneo (setas amarelas). **E.** Corte histológico perpendicular (coloração HE) mostra ninhos de melanócitos atípicos distribuídos de forma contígua em direção à periferia, ao longo da JDE. **F.** Corte histológico transversal (coloração HE) mostra ninhos arredondados e alongados de melanócitos atípicos dispostos linearmente ao longo da periferia da lesão (setas amarelas).

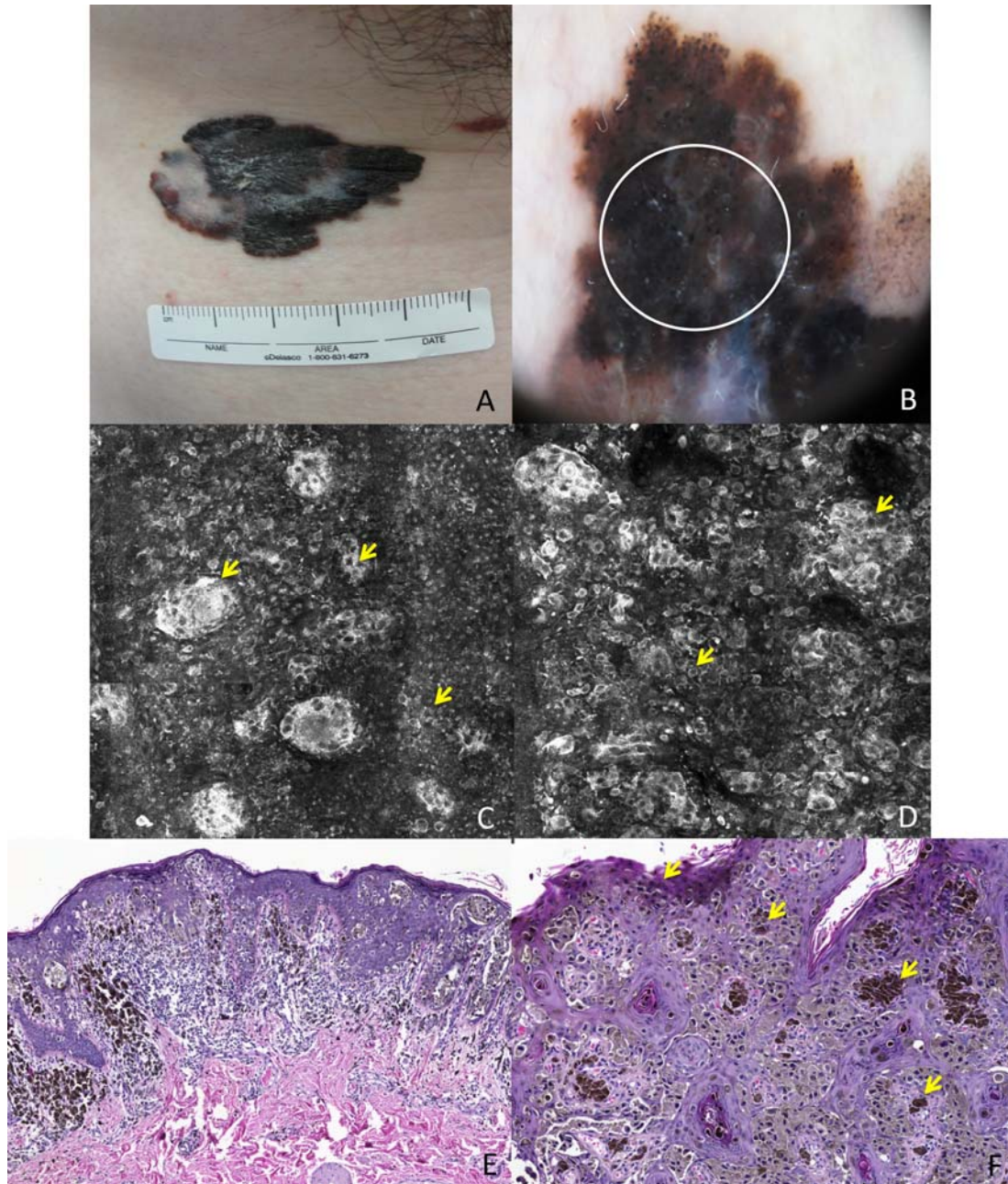
SCOPE et. al (2007b) e PELLACANI et al. (2008) também não identificaram características na MC que pudessem diferenciar as estrias radiadas e pseudópodes observados nos melanomas daqueles identificados nos nevos melanocíticos. Trabalhos futuros com maior casuística serão necessários para confirmar esses achados na MC e esclarecer sua natureza morfológica e biológica.

Não existe relato na literatura das características do *blotch* e véu azul-esbranquiçado nos cortes histológicos transversais. Neste estudo, descrevemos esses achados através da avaliação de 5 casos de *blotch* e 7 de véu azul-esbranquiçado.

Na MC, as áreas de *blotch* mostraram células brilhantes redondas e anucleadas no estrato córneo, grande quantidade de células atípicas isoladas ou em agregados brilhantes na epiderme, e células globosas (*plump cells*) na derme. Em alguns casos, observamos desorganização da JDE pela presença de células atípicas redondas nucleadas e/ou dendríticas isoladas ou em agregados. Nos cortes transversais, encontramos grande quantidade de ninhos pigmentados na epiderme, alguns melanócitos atípicos isolados e melanófagos na derme, associados à paraceratose e ortoceratose. A ortoceratose e paraceratose podem justificar o encontro, na MC, das células brilhantes anucleadas na camada córnea. Já o importante brilho e refletividade das células é explicado pela pigmentação abundante dentro dos ceratinócitos e melanócitos atípicos, observada nos cortes histológicos transversais (**Figura 25 e 26**).

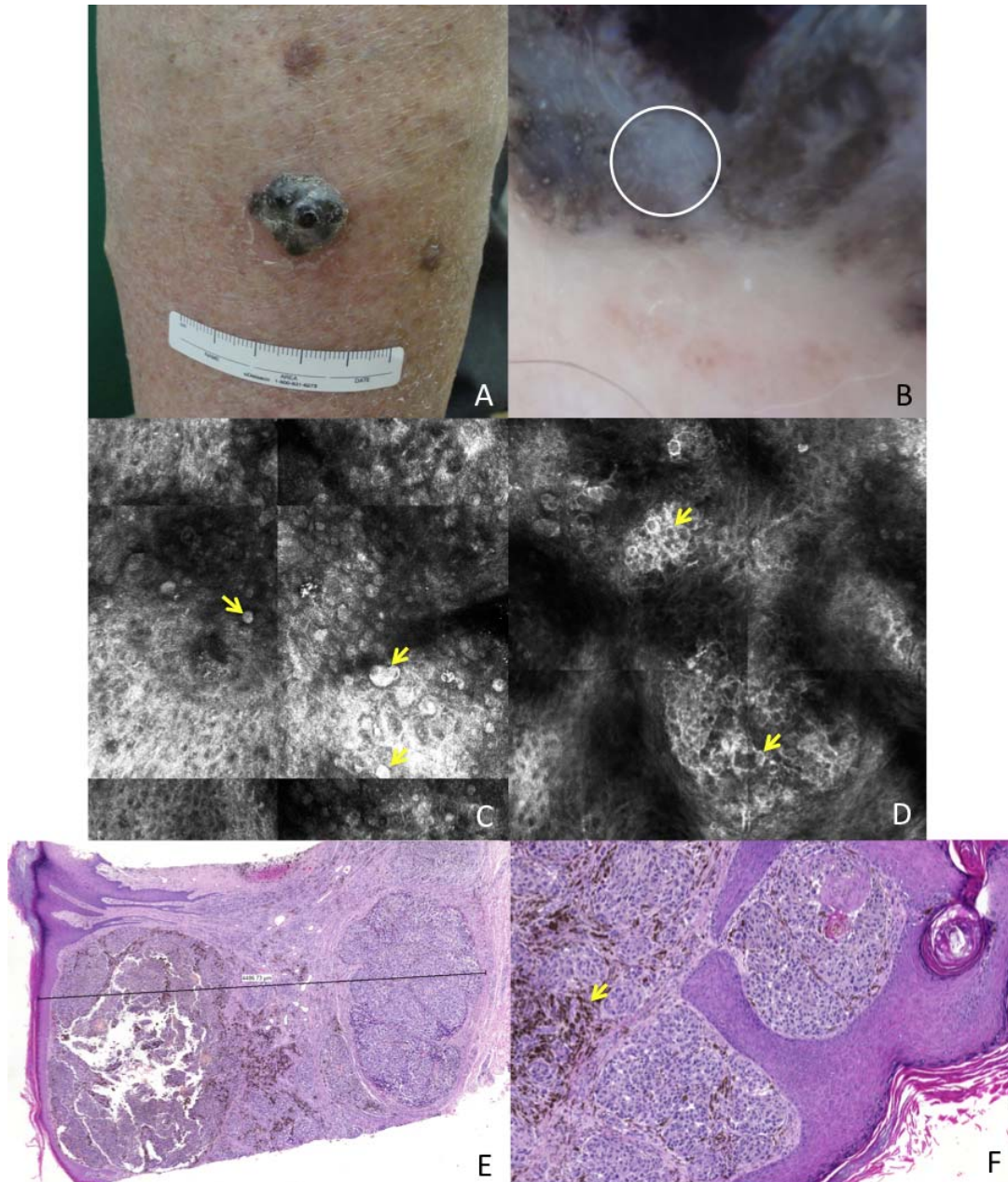


**Figura 25** - Melanoma extensivo superficial, Breslow 0,5 mm: *blotch*. **A.** Imagem clínica de placa enegrecida no dorso. **B.** Dermatoscopia mostra *blotch* (círculo branco corresponde à área do *punch*). **C.** Imagem em mosaico na MC (0,5 x 0,5 mm), no nível do estrato córneo, demonstrando células brilhantes grandes e redondas anucleadas (setas amarelas). **D.** Imagem em mosaico na MC (0,75 x 0,75 mm), no nível da camada basal e JDE, mostra agregados brilhantes compostos de células atípicas (setas amarelas). **E.** Corte histológico perpendicular (coloração HE) mostra pigmentação melânica importante em todas as camadas epidérmicas e derme. No quadrado branco, imagem individual na MC (0,5 x 0,5 mm), no nível da derme, demonstrando grande quantidade de células globosas – *plump cells*. **F.** Corte histológico transversal (coloração HE) mostra grande quantidade de ninhos pigmentados na epiderme e JDE, associados à ortoceratose e paraceratose (setas amarelas).



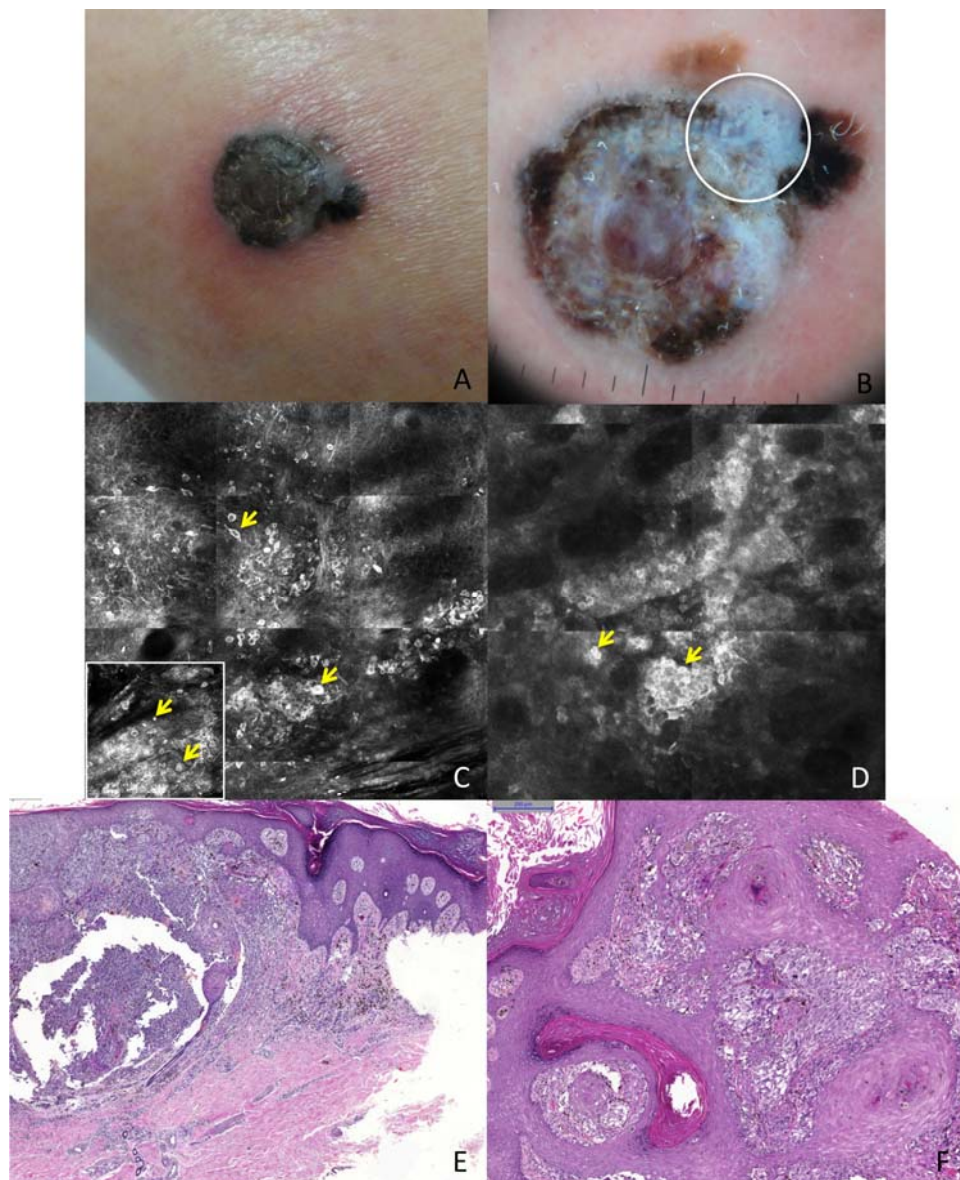
**Figura 26** - Melanoma extensivo superficial, Breslow 1,75 mm: *blotch*. **A.** Imagem clínica de placa enegrecida irregular no tronco. **B.** Dermatoscopia mostra *blotch* (círculo branco corresponde à área do *punch*). **C.** Imagem em mosaico na MC (0,75 x 0,75 mm), no nível da camada basal, demonstrando agregados brilhantes de células atípicas em grande quantidade (setas amarelas). **D.** Imagem em mosaico na MC (0,75 x 0,75 mm), no nível da camada basal e JDE, mostra agregados brilhantes compostos de células atípicas (setas amarelas). **E.** Corte histológico perpendicular (coloração HE) mostra pigmentação melânica importante em todas as camadas epidérmicas e derme. **F.** Corte histológico transversal (coloração HE) mostra grande quantidade de ninhos pigmentados na epiderme, associados à paraceratose (setas amarelas).

O véu azul-esbranquiçado é visualizado na dermatoscopia como área azulada ou esbranquiçada irregular e foi reportado ser uma característica específica para diagnóstico do melanoma espesso (MASSI et al. 2001; ARGENZIANO et al. 2003; PELLACANI et al. 2007a). Na MC, observamos desorganização epidérmica com infiltração de células pagetóides redondas e dendríticas, papilas não demarcadas na JDE, células nucleadas atípicas com morfologia e brilho heterogêneos isoladas ou em agregados irregulares localizadas predominantemente na derme e/ou presença de células globosas (*plump cells*) na derme. Essas características confirmam as descrições prévias associadas ao véu azul-esbranquiçado na MC (PELLACANI et al. 2007a, 2008). Nos cortes transversais, encontramos número aumentado de melanócitos atípicos pigmentados isolados ou em ninhos infiltrando a derme e melanófagos em grande quantidade, associados à paraceratose e ortoceratose. Esses achados apresentaram excelente associação com as características observadas na MC e acrescentaram uma visão horizontal complementar das características arquiteturais no nível da JDE e derme papilar (**Figuras 27 e 28**).



**Figura 27** - Melanoma extensivo superficial, Breslow 5,3 mm: véu azul-esbranquiçado. **A.** Imagem clínica de tumoração enegrecida em extremidade (perna). **B.** Dermatoscopia mostra véu azul-esbranquiçado (círculo branco corresponde à área do *punch*). **C.** Imagem em mosaico na MC (0,5 x 0,5 mm), no nível da camada córnea, demonstrando células brilhantes grandes e redondas anucleadas (setas amarelas). **D.** Imagem em mosaico na MC (0,75 x 0,75 mm), no nível da JDE e derme papilar, mostra agregados brilhantes compostos de células com morfologia e brilho heterogêneos (setas amarelas). **E.** Corte histológico perpendicular (coloração HE) mostra agregação compacta de células atípicas pigmentadas na derme e melanóforos em grande quantidade. **F.** Corte histológico transversal (coloração HE) mostra células atípicas pigmentadas em ninhos e melanóforos em grande quantidade na derme (setas amarelas).



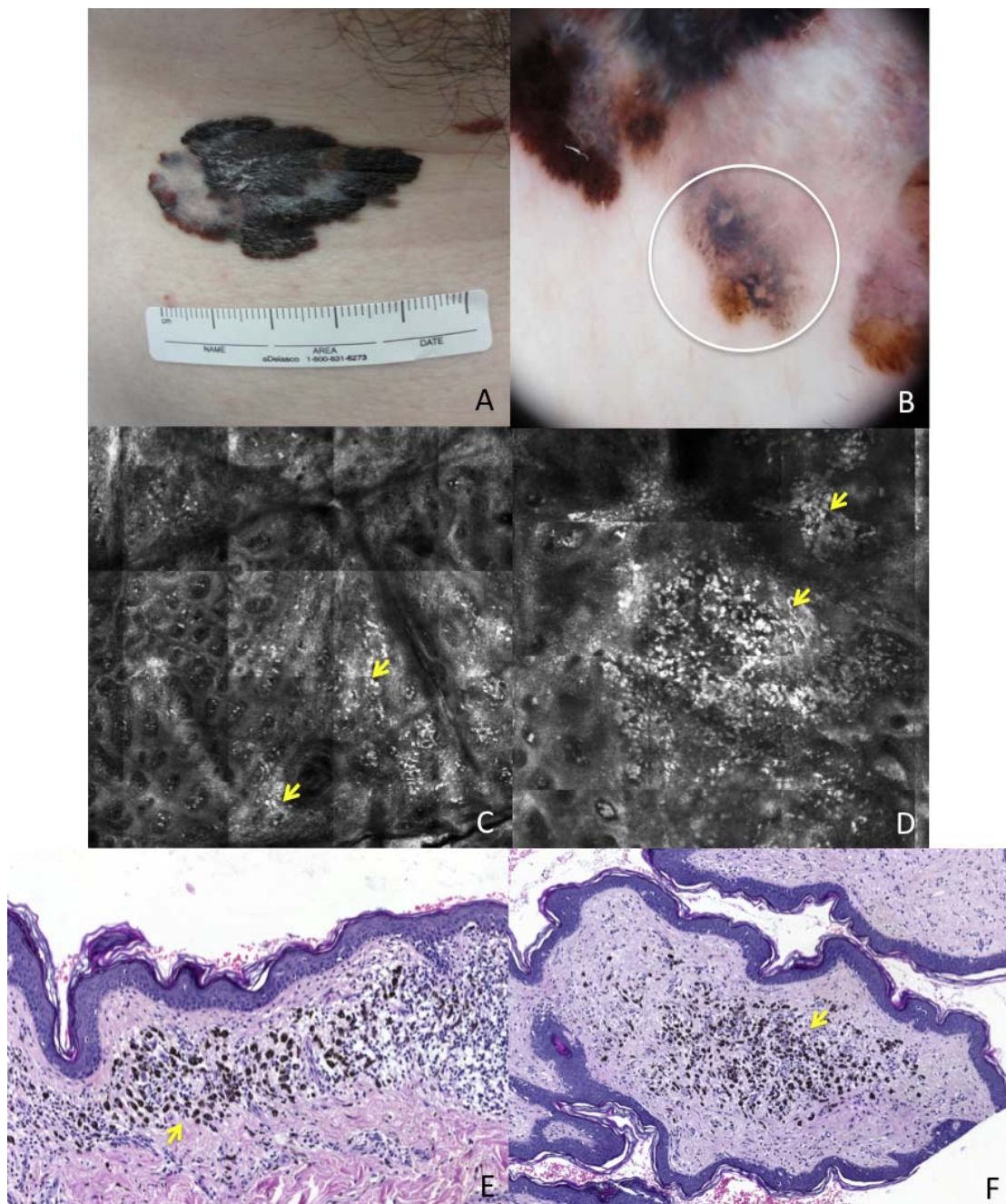


**Figura 28** - Melanoma extensivo superficial, Breslow 2,1 mm: véu azul-esbranquiçado. **A.** Imagem clínica de tumoração enegrecida em extremidade (perna). **B.** Dermatoscopia mostra véu azul-esbranquiçado (círculo branco corresponde à área do *punch*). **C.** Imagem em mosaico na MC (1,5 x 1,5 mm), no nível da camada espinhosa e basal, demonstrando grande quantidade de células pagetóides (setas amarelas). No quadrado branco, imagem individual na MC (0,5 x 0,5 mm) no nível do estrato córneo, demonstrando células brilhantes grandes e redondas anucleadas (setas amarelas). **D.** Imagem em mosaico na MC (1 x 1 mm), no nível da derme papilar, mostra grande quantidade de células atípicas redondas nucleadas isoladas ou em agregados heterogêneos (setas amarelas). **E.** Corte histológico perpendicular (coloração HE) mostra acantose, agregação compacta de células atípicas pigmentadas na JDE e derme, associada à ortoceratose. **F.** Cortes histológicos transversais (coloração HE) mostram presença de células atípicas pigmentadas isoladas ou em ninhos em grande quantidade e ortoceratose.

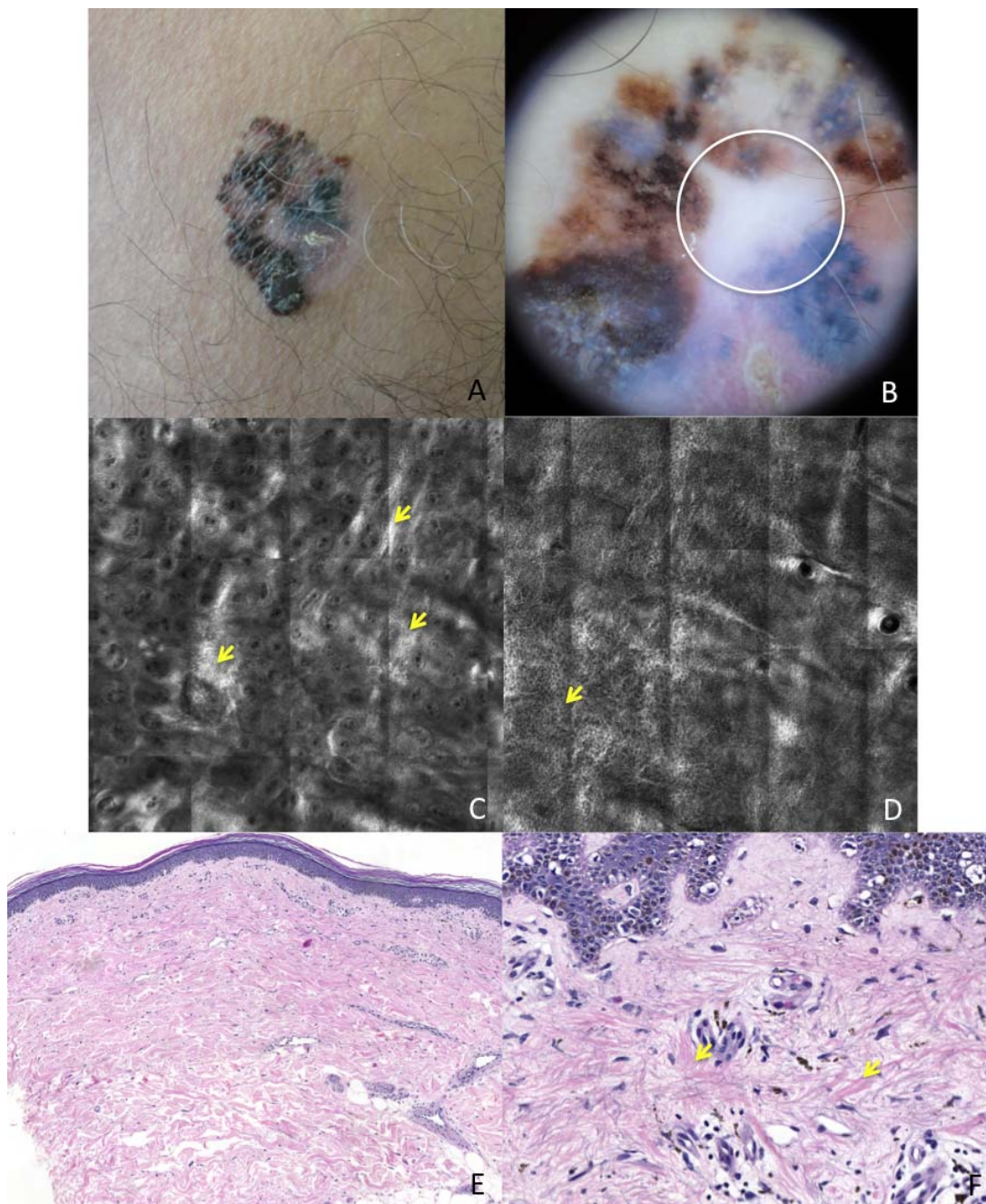
Avaliando os casos deste estudo, observamos que a principal diferença entre o *blotch* e o véu azul-esbranquiçado tanto na MC quanto nos cortes histológicos transversais está na localização dos achados. Nos casos de *blotch*, as principais características estão localizadas na epiderme e JDE, enquanto que nos casos de véu, na JDE e derme. Esses dados reforçam a teoria das cores na dermatoscopia, onde o preto representa melanina em melanócitos e ceratinócitos localizados na epiderme e o azul, melanina em melanócitos e melanófagos localizados na derme papilar (ARGENZIANO et al. 2003; MALVEHY et al. 2007). Uma das limitações da MC é o fato da profundidade da imagem ser restrita e prejudicar a avaliação da derme reticular, podendo justificar a não visualização de melanófagos (*plump cells*) em alguns dos nossos casos.

Nos cortes transversais do único caso estudado de hipopigmentação irregular observamos arquitetura epidérmica regular e pouca pigmentação nas camadas epidérmicas. Estes achados foram consistentes com os descritos na MC e nos cortes histológicos perpendiculares (PELLACANI et al. 2008).

As estruturas de regressão são representadas na dermatoscopia por área de despigmentação (área branca irregular) e/ou área clara irregular com pontos azul-acinzentados (*peppering*) (ARGENZIANO et al. 2003). Avaliamos 12 casos de regressão, todos mostraram padrão em favo de mel (*honeycomb*) epidérmico e transição dermoepidérmica imperceptível sem a visualização da JDE. Na derme, observamos bandas colágenas formando uma rede grosseira e agregados de células globosas (*plump cells*). Esses achados foram consistentes com a ausência de pigmentação epidérmica, fibras colágenas espessas e melanófagos na derme papilar, observados nos cortes histológicos transversais (**Figuras 29 e 30**).



**Figura 29** - Melanoma extensivo superficial, Breslow, 1,75 mm: *peppering*. **A.** Imagem clínica de placa enegrecida irregular no tronco. **B.** Dermatoscopia mostra *peppering* (círculo branco corresponde à área do *punch*). **C.** Imagem em mosaico na MC (2 x 2 mm), no nível da derme papilar, demonstrando células globosas brilhantes - *plump cells* (setas amarelas). **D.** Imagem em mosaico na MC (1,5 x 1,5 mm), no nível da derme papilar, mostra agregados brilhantes de células globosas - *plump cells* (setas amarelas). **E.** Corte histológico perpendicular (coloração HE) mostra ausência de pigmentação epidérmica e grande quantidade de melanófagos na derme (seta amarela). **F.** Corte histológico transversal (coloração HE) mostra grande quantidade de melanófagos na derme (seta amarela).



**Figura 30** - Melanoma extensivo superficial, Breslow 1,55 mm: área de despigmentação. **A.** Imagem clínica de placa enegrecida irregular em extremidade (coxa). **B.** Dermatoscopia mostra área de despigmentação / área branca irregular (círculo branco corresponde à área do *punch*). **C.** Imagem em mosaico na MC (2 x 2 mm), no nível da derme papilar, mostra bandas colágenas formando rede grosseira (setas amarelas). **D.** Imagem em mosaico na MC (2 x 2 mm), no nível da camada espinhosa, demonstrando padrão *honeycomb* epidérmico (seta amarela). **E.** Corte histológico perpendicular (coloração HE) mostra ausência de pigmentação epidérmica e fibrose na derme. **F.** Corte histológico transversal (coloração HE) mostra fibras colágenas espessas na derme (setas amarelas).

O **Quadro 3** resume os achados na MC e nos cortes histológicos transversais e perpendiculares dos critérios dermatoscópicos nos melanomas cutâneos.

<b>Critério dermatoscópico</b>	<b>Definição</b>	<b>Características Microscopia Confocal <i>In Vivo</i></b>	<b>Cortes Histológicos Transversais</b>	<b>Cortes Histológicos Perpendiculares</b>
Rede atípica ligeiramente pigmentada	Trama irregular de tonalidade acastanhada e traçado fino.	Papilas dérmicas irregulares e com brilho heterogêneo. Células dendríticas projetam-se da epiderme em direção à derme formando “pontes” chamadas de “papilas em mitocôndria”.	Número aumentado de melanócitos atípicos organizados ao redor das papilas dérmicas. Alguns desses melanócitos atípicos projetam-se em direção à derme, confirmando, assim, as “papilas em mitocôndria” visualizadas na MC.	Presença de grande quantidade de melanócitos atípicos na JDE. As “papilas em mitocôndria” não são visualizadas nesses cortes.
Rede atípica alargada	Alargamento da rede pigmentar e/ou acentuação irregular da pigmentação.	Papilas dérmicas irregulares e com brilho heterogêneo. Papilas demarcadas e não demarcadas, separadas por espaços interpapilares alargados pela presença de células atípicas (dendríticas e/ou redondas nucleadas).	Predomínio de melanócitos atípicos, isolados ou em ninhos, ampliando os espaços interpapilares na JDE.	Presença de grande quantidade de melanócitos atípicos isolados ou em ninhos na JDE. Cristas interpapilares alongadas.
Glóbulos Irregulares	Estruturas circulares de formato irregular e tamanhos variados.	Agregados irregulares compostos de células com morfologia e brilho heterogêneos.	Grande quantidade de melanócitos atípicos predominantemente em ninhos de tamanho e formato variáveis na JDE e derme papilar.	Ninhos de melanócitos atípicos, variáveis em tamanho e formato, distribuídos predominantemente na JDE e derme papilar.
Pseudópodes	Estruturas lineares paralelas na periferia da lesão, com um bulbo periférico.	Agregados compactos de células atípicas na JDE, distribuídos linearmente em direção à periferia, com um ninho denso na extremidade (estrutura semelhante ao glóbulo).	Ninhos arredondados e/ou alongados de melanócitos atípicos organizados de maneira linear em direção à periferia da lesão.	Ninhos de melanócitos atípicos distribuídos de forma contígua em direção à periferia, ao longo da JDE.

### Cont/ Quadro 3

<b>Critério dermatoscópico</b>	<b>Definição</b>	<b>Características Microscopia Confocal In Vivo</b>	<b>Cortes Histológicos Transversais</b>	<b>Cortes Histológicos Perpendiculares</b>
Estrias radiadas	Estruturas lineares paralelas na periferia da lesão.	Linhas paralelas brilhantes e/ou agregados brilhantes de células atípicas(dendríticas e/ou nucleadas arredondadas) projetadas em direção à periferia da lesão.	Ninhos arredondados e/ou alongados de melanócitos atípicos que progridem centrifugamente em direção à periferia da lesão.	Ninhos de melanócitos atípicos na JDE que progridem em direção à periferia da lesão.
Véu azul-esbranquiçado	Área azulada ou esbranquiçada irregular.	Presença de agregados brilhantes, em grande quantidade, predominantemente na derme, compostos de células com morfologia e brilho heterogêneos e/ou presença de células globosas ( <i>plump cells</i> ) na derme. Células brilhantes grandes e redondas anucleadas no estrato córneo.	Presença de células atípicas pigmentadas isoladas ou em ninhos, em grande quantidade, predominantemente na derme e/ou presença de melanófagos em grande quantidade, associados à paraceratose e ortoceratose.	Ninhos compactos de células atípicas pigmentadas na JDE e derme, e/ou melanófagos em grande quantidade na derme, associados à paraceratose e ortoceratose.
Hiperpigmentação irregular ou borrões ( <i>blotch</i> )	Área de coloração escura (marrom, preta) irregular, com ausência de estruturas.	Presença de agregados brilhantes compostos de células atípicas, em grande quantidade, na epiderme, associados à presença de células globosas ( <i>plump cells</i> ) na derme. Células brilhantes grandes e redondas anucleadas no estrato córneo.	Presença de grande quantidade de ninhos pigmentados na epiderme e melanófagos na derme, associados à paraceratose e ortoceratose.	Pigmentação melânica importante em todas as camadas epidérmicas e derme, associada à paraceratose e ortoceratose
Estruturas de regressão	Área branca irregular ou área clara irregular com pontos azul-acinzentados ( <i>peppering</i> )	Padrão <i>honeycomb</i> epidérmico, transição dermo-epidérmica imperceptível sem a visualização da JDE. Na derme, bandas colágenas formando uma rede grosseira com agregados de células globosas ( <i>plump cells</i> ) ou fusiformes ( <i>spindle cells</i> ) brilhantes.	Ausência de pigmentação epidérmica e fibras colágenas espessas na derme papilar. Presença de melanófagos, inclusive em manguito ao redor dos vasos, na derme.	Ausência de pigmentação epidérmica. Fibrose importante e melanófagos na derme.

Este estudo explorou sistematicamente os substratos na MC das principais características dermatoscópicas encontradas nos melanomas cutâneos, com o objetivo de compará-los aos achados histopatológicos nos cortes transversais. Uma descrição abrangente dos aspectos citológicos e arquiteturais foi realizada através da possibilidade de correlação das três técnicas (dermatoscopia, MC e histopatologia) no mesmo plano visual. Os cortes histológicos transversais possibilitaram uma interpretação mais precisa dos principais achados na MC nos melanomas cutâneos.

Na segunda publicação relacionada a este projeto descrevemos um caso que enfatiza a importância da MC no diagnóstico e diferenciação das lesões pigmentadas benignas e malignas, principalmente nas situações onde o exame dermatoscópico é duvidoso. Neste caso de nevo de spilus em paciente com a síndrome do nevo atípico, uma lesão com característica dermatoscópica inespecífica, e diferente das demais, chamou a atenção do dermatologista que optou por realizar a MC. A identificação de células pagetóides na epiderme, padrão *meshwork* na JDE e células atípicas dendríticas ampliando os espaços interpapilares, auxiliou o diagnóstico de melanoma *in situ* em nevo de spilus. A utilização da MC na análise de lesões pré-selecionadas pela dermatoscopia ou pelo exame de mapeamento corporal e dermatoscopia digital, reduz o número de exéreses desnecessárias de lesões benignas com alta acurácia diagnóstica (GUITERA et al. 2009). O papel da MC é de complementar a dermatoscopia e não de substituí-la, pois é um exame mais demorado e seu uso permanece restrito para a avaliação de lesões selecionadas.

### 4.3 POSSIBILIDADES DE PUBLICAÇÕES FUTURAS

Com base nos dados encontrados neste projeto, elaboramos alguns estudos a serem desenvolvidos.

Não existem relatos na literatura sobre os achados do *blotch* e do véu azul-esbranquiçado nos cortes histológicos transversais. O objetivo desse estudo será analisar essas características dermatoscópicas utilizando a comparação direta com os achados observados na MC e nos cortes histológicos transversais.

Em outro estudo pretendemos descreveros substratos das estrias radiadas e pseudópodes dos melanomas cutâneos na MC, e correlacioná-los com os cortes histológicos transversais e perpendiculares. Avaliaremos também pela MC e cortes histológicos perpendiculares, as lesões melanocíticas benignas que apresentarem estrias radiadas e pseudópodes na dermatoscopia, incluindo casos nevos melanocíticos em crescimento, atípicos e de Reed, na tentativa de elucidar a natureza biológica e morfológica dessas estruturas.

Projetamos também um estudo com o objetivo de avaliar o significado diagnóstico das “papilas em mitocôndria” na identificação do melanoma cutâneo. Serão incluídas 60 lesões melanocíticas que apresentam rede pigmentar atípica na dermatoscopia: 20 melanomas, 20 nevos melanocíticos atípicos e 20 nevos melanocíticos comuns. Todas as lesões serão removidas, por motivo estético ou por suspeita diagnóstica. O exame anatomopatológico de todos os casos incluídos será revisado por 2



dermatopatologistas experientes. Três observadores independentes, 2 *experts* e 1 dermatologista treinado em MC, receberão instruções para identificação das “papilas em mitocôndria” em apresentação oral de 30 minutos. Duas imagens em mosaico, no nível da junção dermo-epidérmica, de cada uma das 60 lesões melanocíticas serão mostradas na tela do computador para cada um dos observadores e avaliadas como pertencendo aos nevos melanocíticos ou melanoma. Aos observadores também será perguntado (através de um questionário) se as “papilas em mitocôndria” estão presentes ou ausentes. Os dermatologistas participantes do estudo serão cegos para os diagnósticos clínico, dermatoscópico e histopatológico. A análise estatística será realizada para o cálculo da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN). A concordância interobservador em identificar essa estrutura também será calculada.

## 5 CONCLUSÕES

Uma forma fácil, segura e confiável para a realização dos cortes histológicos transversais foi apresentada como uma nova abordagem no estudo e interpretação das características observadas na MC nos melanomas cutâneos.

Os aspectos celulares e arquiteturais dos melanomas cutâneos no exame de MC *in vivo* foram determinados e comparados às características dermatoscópicas e aos achados histopatológicos nos cortes transversais e perpendiculares. Uma nova estrutura chamada de “papila em mitocôndria” foi identificada na MC e confirmada nos cortes histológicos transversais, podendo representar um critério adicional para o diagnóstico do melanoma *in situ*.

Os achados identificados na MC e sua correlação com os cortes histológicos transversais podem auxiliar na avaliação das lesões melanocíticas tanto pelo dermatologista quanto pelo patologista, considerando-se a divergência entre os patologistas no diagnóstico de alguns casos de melanoma *in situ* e nevos melanocíticos atípicos.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alarcon I, Carrera C, Palou J, Alos L, Malvehy J, Puig S. Impact of in vivo reflectance confocal microscopy on the number needed to treat melanoma in doubtful lesions. **Br J Dermatol** 2013 Oct 11. [Epub ahead of print].

Argenziano G, Soyer HP, Chimenti S, et al. Dermoscopy of pigmented skin lesions: results of a consensus meeting via the Internet. **J Am Acad Dermatol** 2003; 48:679-93.

Argenziano G, Mordente I, Ferrara G, Sgambato A, Annese P, Zalaudek I. Dermoscopic monitoring of melanocytic skin lesions: clinical outcome and patient compliance vary according to follow-up protocol. **Br J Dermatol** 2008; 159:331-6.

Bahmer FA, Fritsch P, Kreusch J, et al. Terminology in surface microscopy. Consensus meeting of the Committee on Analytical Morphology of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung, Hamburg, Federal Republic of Germany, Nov. 17, 1989. **J Am Acad Dermatol** 1990; 23:1159-62.

Berwick M, Erdei E, Hay J. Melanoma epidemiology and public health. **Dermatol Clin** 2009; 27:205-14.

Braga JC, Scope A, Klaz I, et al. The significance of reflectance confocal microscopy in the assessment of solitary pink skin lesions. **J Am Acad Dermatol** 2009; 61:230-41.

Busam KJ, Charles C, Lee G, Halpern AC. Morphologic features of melanocytes, pigmented keratinocytes, and melanophages by in vivo confocal scanning laser microscopy. **Mod Pathol** 2001; 14:862-8.

Calzavara-Pinton P, Longo C, Venturini M, Sala R, Pellacani G. Reflectance confocal microscopy for in vivo skin imaging. **Photochem Photobiol** 2008; 84:1421-30.

Dal Pozzo V, Benelli C, Roscetti E. The seven features for melanoma: a new dermoscopic algorithm for the diagnosis of malignant melanoma. **Eur J Dermatol** 1999; 9:303-8.

Gerger A, Koller S, Kern T, et al. Diagnostic applicability of *in vivo* confocal scanning laser microscopy in melanocytic skin tumors. **J Invest Dermatol** 2005; 124:493-8.

Gerger A, Hofmann-Wellenhof R, Langsenlehner U, et al. *In vivo* confocal laser scanning microscopy of melanocytic skin tumors: diagnostic applicability using unselected tumour images. **Br J Dermatol** 2008; 158:329-33.

Gill M, Longo C, Farnetani F, Cesinaro AM, González S, Pellacani G. Non-invasive in vivo dermatopathology: identification of reflectance confocal microscopic correlates to specific histological features seen in melanocytic neoplasms. **J Eur Acad Dermatol Venereol** 2013 Oct 23. [Epub ahead of print].

Goldsmith LA, Askin FB, Chang AE, et al. Diagnosis and treatment of early melanoma: NHI consensus development panel on early melanoma. **JAMA** 1992; 268:1314-19.

Guitera P, Pellacani G, Longo C, Seidenari S, Avramidis M, Menzies SW. *In vivo* reflectance confocal microscopy enhances secondary evaluation of melanocytic lesions. **J Invest Dermatol** 2009; 129:131-8.

Guitera P, Pellacani G, Crotty KA, et al. The impact of in vivo reflectance confocal microscopy on the diagnostic accuracy of lentigo maligna and equivocal pigmented and nonpigmented macules of the face. **J Invest Dermatol** 2010; 130:2080-91.

Guitera P, Menzies SW, Longo C, Cesinaro AM, Scolyer RA, Pellacani G. In vivo confocal microscopy for diagnosis of melanoma and basal cell carcinoma using a two-step method: analysis of 710 consecutive clinically equivocal cases. **J Invest Dermatol** 2012; 132:2386-94.

Headington JT. Transverse microscopic anatomy of the human scalp a basis for a morphometric approach to disorders of the hair follicle. **Arch Dermatol** 1984; 120:449-56.

Kittler H, Pehamberger H, Wolff K, Binder M. Diagnostic accuracy of dermoscopy. **Lancet Oncol** 2002; 3:159-65.

Langley RG, Rajadhyaksha M, Dwyer PJ, Sober AJ, Flotte TJ, Anderson RR. Confocal scanning laser microscopy of benign and malignant melanocytic skin lesions in vivo. **J Am Acad Dermatol** 2001; 45:365-76.

Lorentzen H, Weismann K, Petersen CS, Larsen FG, Secher L, Skødt V. Clinical and dermatoscopic diagnosis of malignant melanoma: assessed by expert and non-expert groups. **Acta Derm Venereol** 1999; 79:301-4.

Mackie RM, Hauschild A, Eggermont AM. Epidemiology of invasive cutaneous melanoma. **Ann Oncol** 2009; Suppl 6 1-7.

Malvehy J, Puig S, Argenziano G, Marghoob AA, Soyer HP; International Dermoscopy Society Board members. Dermoscopy report: proposal for standardization. Results of a consensus meeting of the International Dermoscopy Society. **J Am Acad Dermatol** 2007; 57:84-95.

Malvehy J, Hanke-Martinez M, Costa J, Salerni G, Carrera C, Puig S. Semiology and pattern analysis in nonmelanocytic lesions In: Hofmann-Wellenhof R, Pellacani G, Malvehy J, Soyer HP, editors. **Reflectance confocal microscopy for skin diseases**. Berlin: Springer; 2012. p.239-52.

Marghoob AA, Swindle LD, Moricz CZ, et al. Instruments and new technologies for the in vivo diagnosis of melanoma. **J Am Acad Dermatol** 2003; 49:777-97.

Marks R. The changing incidence and mortality of melanoma in Austrália. **Recent Results Cancer Res** 2002; 160:113-21.

Massi D, De Giorgi V, Carli P, Santucci M. Diagnostic significance of the blue hue in dermoscopy of melanocytic lesions: a dermoscopic-pathologic study. **Am J Dermatopathol** 2001; 23:463-9.

Menzies SW, Crotty KA, McCarthy WH. The morphologic criteria of the pseudopod in surface microscopy. **Arch Dermatol** 1995; 131:436-40.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **INCA e Ministério da Saúde apresentam estimativas de câncer para 2014**. Disponível em: <URL:[http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2013/inca\\_ministerio\\_saude\\_apresentam\\_estimativas\\_cancer\\_2014](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2013/inca_ministerio_saude_apresentam_estimativas_cancer_2014)> [2014 jan 12]

Nehal KS, Gareau D, Rajadhyaksha M. Skin imaging with reflectance confocal microscopy. **Semin Cutan Med Surg** 2008; 27:37-43.

Pellacani G, Cesinaro AM, Longo C, Grana C, Seidenari S. Microscopic *in vivo* description of cellular architecture of dermoscopic pigment network in nevi and melanomas. **Arch Dermatol** 2005a; 141:147-154.

Pellacani G, Cesinaro AM, Seidenari S. *In vivo* confocal reflectance microscopy for the characterization of melanocytic nests and correlation with dermoscopy and histology. **Br J Dermatol** 2005b; 152:384-6.

Pellacani G, Cesinaro AM, Seidenari S. Reflectance-mode confocal microscopy of pigmented skin lesions - improvement in melanoma diagnostic specificity. **J Am Acad Dermatol** 2005c; 53:979-85.

Pellacani G, Bassoli S, Longo C, Cesinaro AM, Seidenari S. Diving into the blue: *in vivo* microscopic characterization of the dermoscopic blue hue. **J Am Acad Dermatol** 2007a; 57:96-104.

Pellacani G, Guitera P, Longo C, Avramidis M, Seidenari S, Menzies S. The impact of *in vivo* reflectance confocal microscopy for the diagnostic accuracy of melanoma and equivocal melanocytic lesions. **J Invest Dermatol** 2007b; 127:2759-65.

Pellacani G, Longo C, Malveyh J, et al. *In vivo* confocal microscopic and histopathologic correlations of dermoscopic features in 202 melanocytic lesions. **Arch Dermatol** 2008; 144:1597-608.

Pellacani G, Vinceti M, Bassoli S, et al. Reflectance confocal microscopy and features of melanocytic lesions: an internet-based study of the reproducibility of terminology. **Arch Dermatol** 2009; 145:1137-43.

Rajadhyaksha M, Grossman M, Esterowitz D, Webb RH, Anderson RR. *In vivo* confocal scanning laser microscopy of human skin: melanin provides strong contrast. **J Invest Dermatol** 1995; 104:946-52.

Rajadhyaksha M, Gonzalez S, Zavislan JM, Anderson RR, Webb RH. *In vivo* confocal laser microscopy of human skin II: advances in instrumentation and comparison with histology. **J Invest Dermatol** 1999; 113:293-303.

Rajadhyaksha M. Confocal microscopy of skin cancers: translational advances toward clinical utility. **Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc** 2009; 2009:3231-3.

Rezze GG, Scramim AP, Neves RI, Landman G. Structural correlations between dermoscopic features of cutaneous melanoma and histopathology using transverse sections. **Am J Dermatopathol** 2006a; 28:13-20.

Rezze GG, Sá BCS, Neves RI. Dermatoscopia: o método de análise de padrões. **An Bras Dermatol** 2006b; 81:261-8.

Rezze GG, Sá BCS. Os critérios dermatoscópicos. In: Rezze GG, Sá BCS, Neves RI, editores. **Atlas de dermatoscopia aplicada**. São Paulo: Lemar; 2008. p. 23-32.

Rigel DS, Russak J, Friedman R. The evolution of melanoma diagnosis: 25 years beyond the ABCDs. **CA Cancer J Clin** 2010; 60:301-16.

Segura S, Puig S, Carrera C, Palou J, Malvehy J. Development of a two-step method for the diagnosis of melanoma by reflectance confocal microscopy. **J Am Acad Dermatol** 2009; 61:216-29.

Scope A, Benvenuto-Andrade C, Agero AL, Halpern AC, Gonzalez S, Marghoob AA. Correlation of dermoscopic structures of melanocytic lesions to reflectance confocal microscopy. **Arch Dermatol** 2007a; 143:176-85.

Scope A, Gill M, Benvenuto-Andrade C, Halpern AC, Gonzalez S, Marghoob AA. Correlation of dermoscopy with in vivo reflectance confocal microscopy of streaks in melanocytic lesions. **Arch Dermatol** 2007b; 143:727-34.

Soyer HP, Argenziano G, Ruocco V, Chimenti S. Dermoscopy of pigmented skin lesions (Part II). **Eur J Dermatol** 2001; 11:483-98.



Stevenson AD, Mickan S, Mallett S, Ayya M. Systematic review of diagnostic accuracy of reflectance confocal microscopy for melanoma diagnosis in patients with clinically equivocal skin lesions. **Dermatol Pract Concept** 2013; 3:19-27.

Vestergaard ME, Macaskill P, Holt PE, Menzies SW. Dermoscopy compared with naked eye examination for the diagnosis of primary melanoma: a meta-analysis of studies performed in a clinical setting. **Br J Dermatol** 2008; 159:669-76.

Yadav S, Vossaert KA, Kopf AW, Silverman M, Grin-Jorgensen C. Histopathologic correlates of structures seen on dermoscopy (epiluminescence microscopy). **Am J Dermatopathol** 1993; 15:297-305.

**Anexo 1** - Definição dos critérios dermatoscópicos e suas características em cortes histológicos perpendiculares e transversais e características na microscopia confocal *in vivo*.

<b>Critério Dermatoscópico</b>	<b>Definição</b>	<b>Histopatologia Cortes Perpendiculares</b>	<b>Histopatologia Cortes Transversais</b>	<b>Características Microscopia Confocal <i>In Vivo</i></b>	<b>Significado Diagnóstico</b>
Rede pigmentar típica (ou rede em favo de mel)	Trama (traçado) de tonalidade acastanhada homogênea sobre uma área castanha clara (buracos).	Aumento do número de melanócitos pigmentados na junção dermo-epidérmica e pigmentação nos ceratinócitos basais.	Sem dados na literatura mundial.	Papila demarcada: anéis de células brilhantes ao redor de uma área redonda ou oval escura (papila dérmica) na junção dermo-epidérmica.	Lesões melanocíticas benignas
Rede pigmentar atípica (alargada e/ou hiperpigmentada)	Alargamento da rede pigmentar e/ou acentuação irregular da pigmentação.	Células e ninhos celulares (geralmente melanócitos atípicos) contendo melanina, na junção dermo-epidérmica e distribuídos irregularmente.	Melanócitos atípicos isolados, em contigüidade e em ninhos na junção dermo-epidérmica, pigmentação dos ceratinócitos basais e suprabasais e melanócitos atípicos sem pigmento.	Papila não demarcada: ausência de células brilhantes formando anel ao redor da papila dérmica caracterizada por área escura com formato e tamanho irregular. Presença de espaços interpapilares mais largos constituídos de células brilhantes.	Melanoma ou nevo atípico
Pontos e glóbulos marrons regulares	Estruturas circulares de formato regular e tamanhos variados, acastanhados.	Ninhos isolados de células névicas na epiderme ou derme papilar.	Sem dados na literatura mundial.	Ninhos de melanócitos: agregados celulares, bem delimitados, homogêneos e densos constituídos por grandes células monomórficas e poligonais.	Lesões melanocíticas benignas
Pontos e glóbulos marrons irregulares	Estruturas circulares de formato irregular e tamanhos variados.	Ninhos de melanócitos atípicos de formato irregular na epiderme ou derme papilar.	Ninhos de melanócitos atípicos na junção dermo-epidérmica e suprabasais e estruturas semelhantes às estruturas ponto-marrom símiles.	Agregados de células brilhantes, não homogêneos e de formato irregular.	Melanoma ou nevo atípico
Estrias radiadas	Estruturas lineares paralelas na periferia da lesão.	Ninhos de melanócitos confinados à junção dermo-epidérmica e epiderme em direção à periferia da lesão.	Ninhos que progridem centrifugamente lembrando o padrão de ramificação em árvore descrito por Kenet et al. (1993)*	Linhas paralelas de células basais projetadas em direção à periferia da lesão e separadas por uma área escurecida estreita (derme).	Distribuição regular: nevo de Reed. Distribuição irregular: melanoma

Cont/ Anexo 1

Critério Dermatoscópico	Definição	Histopatologia Cortes Perpendiculares	Histopatologia Cortes Transversais	Características Microscopia Confocal <i>In Vivo</i>	Significado Diagnóstico
Pseudópodes	Estruturas lineares paralelas na periferia da lesão, com um bulbo periférico.	Ninhos de melanócitos confinados à junção dermo-epidérmica e epiderme em direção à periferia da lesão.	Ninhos que progridem centrifugamente lembrando o padrão de ramificação em árvore descrito por Kenet et al. (1993)*	Ninhos de células brilhantes conectado ao corpo do tumor por células frouxamente agregadas conferindo aspecto "em cometa".	Melanoma
Véu azul-esbranquiçado	Área azulada ou esbranquiçada irregular.	Agregação compacta de células pigmentadas em todas as camadas da epiderme e ortoceratose.	Sem dados na literatura mundial.	Padrão de desarranjo epidérmico e infiltração pajetóide de células redondas, papilas não demarcadas e atipia citológica na camada basal.	Melanoma
Estruturas de regressão	Área branca irregular ou área clara irregular com pontos azul-acinzentados ( <i>peppering</i> )	Ausência de pigmentação epidérmica. Fibrose importante e melanófagos na derme papilar.	Ausência de pigmentação epidérmica e fibras colágenas espessas na derme piliar. Presença de melanócitos em manguito ao redor dos vasos na derme papilar.	Padrão <i>honeycomb</i> epidérmico, transição dermo-epidérmica imperceptível sem a visualização da junção dermo-epidérmica. A derme bandas colágenas formando um rede grosseira por vezes com células redondas ou fusiformes ( <i>spindle</i> ) brilhantes.	Melanoma
Hipopigmentação irregular	Área de coloração clara (marrom) irregular, com ausência de estruturas.	Arquitetura epidérmica normal com pouca pigmentação.	Sem dados na literatura mundial.	Sem dados na literatura mundial.	Melanoma ou nevo atípico
Hiperpigmentação irregular ou borões ( <i>blotches</i> )	Área de coloração escura (marrom, preta) irregular, com ausência de estruturas.	Pigmentação melânica importante em todas as camadas epidérmicas, associada à ortoceratose.	Sem dados na literatura mundial.	A epiderme apresenta padrão <i>cobblestone</i> entremeada por células grandes e redondas com citoplasma brilhante e núcleo escuro.	Melanoma ou nevo atípico

\*Kenet RO, Kang S, Kenet BJ, et al. Clinical diagnosis of pigmented lesions using digital epiluminescence microscopy: grading protocol and atlas. **Arch Dermatol** 1993; 129:157-74.

## **Anexo 2 - Termo de informação e consentimento livre e esclarecido**

### **DETERMINAÇÃO DOS PADRÕES DA MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO* NOS MELANOMAS CUTÂNEOS E NEVOS MELANOCÍTICOS COMUNS: COMPARAÇÃO COM A DERMATOSCOPIA E HISTOPATOLOGIA EM CORTES PERPENDICULARES E TRANSVERSAIS**

#### **TERMO DE INFORMAÇÃO E CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Para obter um maior conhecimento clínico e científico do câncer, o Corpo Clínico deste Hospital (médicos e pesquisadores) desenvolve pesquisa clínica científica. Através da pesquisa é possível conhecer melhor os mecanismos da doença e, portanto, oferecer novas possibilidades de diagnóstico e tratamento.

Você está sendo admitido(a) neste Hospital para estabelecimento de diagnóstico e/ou tratamento de alguma forma de tumor. Para fins de diagnóstico e/ou como parte de seu tratamento, há necessidade da remoção do tumor e/ou material biológico relacionado à enfermidade. É prática rotineira deste hospital usar parte do tumor e/ou outro material biológico retirado, para exames clínicos laboratoriais, necessários para um diagnóstico definitivo. O restante do tumor que é retirado, ou do material biológico, não é utilizado, sendo então armazenado para novos exames se necessário. Caso contrário, são descartados, conforme Legislação Sanitária regulamentar sobre o assunto.

Estamos realizando pesquisa com melanomas cutâneos, para comparar os achados dermatoscópicos (exame da lesão com lupa), achados no exame de microscopia confocal *in vivo* e aqueles realizados ao microscópio óptico utilizados para a confecção do diagnóstico definitivo da lesão. Parte da lesão será examinada separadamente com a finalidade de isolar parâmetros observados à dermatoscopia e microscopia confocal *in vivo* e observar as alterações ao microscópio. O material será examinado na sua totalidade, não havendo prejuízo para o diagnóstico e/ou tratamento a ser estabelecido.

O fragmento será identificado no laboratório por um código de números e letras, e, portanto, sua privacidade e identidade serão sempre preservadas. A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a manter o anonimato do paciente.

Concordando com o uso do material para os fins acima descritos, é necessário esclarece-lo (a) que não existem quaisquer benefícios ou direitos financeiros a receber sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Se você não concordar em doar o material para pesquisa, sua decisão não influenciará, de nenhum modo, no seu tratamento.

Caso você ainda tenha questões a fazer sobre este Termo de Consentimento ou alguma dúvida que não tenha sido esclarecida pelo seu médico, por gentileza, entre em contato com a pesquisadora principal, Dra. Gisele Gargantini Rezze pelo telefone 2189-5136 ou se o pesquisador responsável não fornecer as informações / esclarecimentos suficientes, por favor entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antônio Prudente – Hospital do Câncer – A.C. Camargo/SP pelo telefone (11) 2189-5000, ramais 2069 ou 5020, de segunda-feira à quinta-feira das 7 horas às 18 horas e sexta-feira das 7 horas às 16 horas.

Você receberá uma via deste documento. Somente assine este termo, se consentir.

## **DECLARAÇÃO**

**Declaro estar ciente das informações ora prestadas, tendo lido atentamente e concordado com todo o teor.**

São Paulo, ..... de ..... de .....

**Responsável ou Paciente:**

RG:

RGH:

Assinatura:

**Nome do pesquisador responsável:**

Assinatura:

### Anexo 3 - Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP



Centro de Tratamento, Ensino e Pesquisa em Câncer

Comitê de Ética em  
Pesquisa - CEP

São Paulo, 28 de Fevereiro de 2011.

À  
Dra. Gisele Gargantini Rezza

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1524/11  
“Determinação dos padrões da microscopia confocal in vivo nas lesões pigmentadas da pele e comparação com a dermatoscopia e histopatologia em cortes transversais”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 22/02/2011, **aprovaram** a realização do estudo em referência (versão 1), o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com as Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Declaração sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração sobre Uso e destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre o Plano de Recrutamento dos Sujeitos de Pesquisa, Circunstâncias e Responsáveis pela Obtenção do TCLE;
- Orçamento Financeiro Detalhado;
- Divulgação de Resultado de Despacho processo FAPESP 2010/06455-1;
- Declaração de Infra-Estrutura e Instalações do Departamento de Oncologia Cutânea;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Oncologia Cutânea.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 6 meses.

Atenciosamente,

**Dr. Alexandre Sá de Andrade**  
2º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

**Anexo 4** – Quadro geral descritivo de todos os casos incluídos nesse estudo, contendo: localização da lesão, diagnósticos clínico, dermatoscópico, confocal e anatomopatológico, e características dermatoscópicas avaliadas.

Caso	Localização	Diagnóstico Clínico	Diagnóstico Dermatoscópico	Diagnóstico Confocal	Diagnóstico Anatomopatológico	Critério Dermatoscópico (área do <i>punch</i> )
1	dorso	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, Breslow 1,1 mm	pseudópodes
2A	antebraço	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, <i>in situ</i>	glóbulos irregulares
2B	antebraço	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, <i>in situ</i>	rede pigmentar
3	coxa	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, Breslow 1,0 mm	glóbulos irregulares
4	braço	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, <i>in situ</i>	rede pigmentar
5	dorso	Melanoma? CBC?	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, Breslow 2,55 mm	véu azul-esbranquiçado
6	tórax	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Nevo melanocítico juncional atípico	rede pigmentar
7A	braço	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, Breslow 10,0 mm	rede pigmentar
7B	braço	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, Breslow 10,0 mm	<i>peppering</i>
8	cervical	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, Breslow 0,5 mm	estrias radiadas
9	dorso	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Nevo melanocítico composto atípico	rede pigmentar
10A	coxa	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, Breslow 1,55 mm	rede pigmentar
10B	coxa	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, Breslow 1,55 mm	<i>peppering</i>
10C	coxa	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, Breslow 1,55 mm	área de despigmentação
11	dorso	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, Breslow 0,37 mm	rede pigmentar
12	coxa	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, Breslow 0,27 mm	rede pigmentar
13	dorso	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, Breslow 0,79 mm	pseudópodes
14	dorso	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma <i>in situ</i> , tipo lentigo maligno	rede pigmentar
15	tórax	Melanoma	Melanoma? Nevo atípico?	Melanoma	Nevo melanocítico juncional atípico	rede pigmentar
16	perna	Melanoma	Melanoma	Melanoma? Cicatriz?	Fibrose cicatricial	área de despigmentação
17	tórax	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, <i>in situ</i>	rede pigmentar e <i>peppering</i>
18	cervical	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, Breslow 0,52 mm	<i>peppering</i>
19	braço	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, Breslow 0,54	<i>blotch</i> (borrão)
20	coxa	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Nevo melanocítico atípico	rede pigmentar
21	cervical	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, <i>in situ</i>	rede pigmentar

<b>Caso</b>	<b>Localização</b>	<b>Diagnóstico Clínico</b>	<b>Diagnóstico Dermatoscópico</b>	<b>Diagnóstico Confocal</b>	<b>Diagnóstico Anatomopatológico</b>	<b>Critério Dermatoscópico (área do <i>punch</i>)</b>
22	dorso mão	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, Breslow 0,71 mm	pseudópodes
23	braço	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, Breslow 0,7 mm	glóbulos irregulares e pseudópodes
24	dorso	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, <i>in situ</i>	rede pigmentar
25	dorso	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, <i>in situ</i>	glóbulos irregulares
26	braço	Melanoma? Ceratose seborréica?	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, Breslow 0,8 mm	glóbulos irregulares
27	coxa	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma nodular, Breslow 9,0 mm	véu azul-esbranquiçado
28A	perna	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, <i>in situ</i>	<i>peppering</i>
28B	perna	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, <i>n situ</i>	hipopigmentação irregular
29	tórax	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, <i>in situ</i>	rede pigmentar
30A	tórax	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, Breslow 1,8 mm	rede pigmentar
30B	perna	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, <i>in situ</i>	<i>peppering</i> e área de despigmentação
30C	perna	CBC	Melanoma	Melanoma	Melanoma nodular, Breslow 2,4 mm	véu azul-esbranquiçado
31	abdome	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, <i>in situ</i>	pseudópodes
32	braço	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, <i>in situ</i>	rede pigmentar e glóbulos irregulares
33	dorso do pé	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, Breslow 1,5 mm	glóbulos irregulares e pseudópodes
34	perna	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, Breslow 2,1 mm	véu azul-esbranquiçado
35	cervical	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial <i>in situ</i>	rede pigmentar
36	dorso	Melanoma? Nevo atípico?	Melanoma? Nevo atípico?	Melanoma? Nevo atípico?	Melanoma extensivo superficial <i>in situ</i>	rede pigmentar
37	dorso	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial <i>in situ</i>	rede pigmentar
38	dorso	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, Breslow 1,0 mm	<i>blotch</i> (borrão) e pseudópode
39	dorso	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, <i>in situ</i>	estrias radiadas e véu azul-esbranquiçado
40	dorso	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, <i>in situ</i>	rede pigmentar
41	dorso	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma tipo lentiginoso, <i>in situ</i>	rede pigmentar



Caso	Localização	Diagnóstico Clínico	Diagnóstico Dermatoscópico	Diagnóstico Confocal	Diagnóstico Anatomopatológico	Critério Dermatoscópico (área do <i>punch</i> )
42	tórax	Melanoma	Melanoma? Nevo atípico?	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, <i>in situ</i>	rede pigmentar
43	dorso	Melanoma	Melanoma	Melanoma? Ceratose tipo líquen plano (LPLK)?	Ceratose seborréica com extenso derrame pigmentar	glóbulos irregulares
44	dorso	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, Breslow 0,9 mm	pseudópodes
45	tórax	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, <i>in situ</i>	rede pigmentar
46	dorso	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, <i>in situ</i>	estrias radiadas
47	cervical	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, Breslow 0,6 mm	rede pigmentar
48	perna	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, <i>in situ</i>	rede pigmentar
49	abdome	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, <i>in situ</i>	rede pigmentar
50A	perna	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, Breslow 6,0 mm	estrias radiadas
50B	perna	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, Breslow 6,0 mm	<i>blotch</i> (borrão)
51	perna	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, Breslow 5,3 mm	véu azul-esbranquiçado
52	tórax	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, Breslow 0,26 mm	rede pigmentar
53	dorso	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, <i>in situ</i>	rede pigmentar
54	dorso	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, Breslow 0,5 mm	<i>blotch</i> (borrão)
55A	abdome	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, Breslow 1,75 mm	<i>peppering</i>
55B	abdome	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, Breslow 1,75 mm	<i>blotch</i> (borrão)
55C	abdome	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, Breslow 1,75 mm	pseudópodes
56	dorso	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, Breslow 0,2 mm	<i>peppering</i>
57A	dorso	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, Breslow 1,9 mm	rede pigmentar
57B	dorso	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, Breslow 1,9 mm	<i>peppering</i>
58	antebraço	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, Breslow 0,7 mm	pseudópodes
59	tórax	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, Breslow 0,8 mm	glóbulos irregulares
60A	perna	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, Breslow 10,0 mm	pseudópodes
60B	perna	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, Breslow 10,0 mm	glóbulos irregulares
60C	perna	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, Breslow 10,0 mm	véu azul-esbranquiçado
61	braço	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma nodular, Breslow 3,0 mm	glóbulos irregulares
62	tórax	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, Breslow 0,62 mm	rede pigmentar
63	dorso	Melanoma	Melanoma	Melanoma	Melanoma extensivo superficial, <i>in situ</i>	rede pigmentar

**Anexo 5 – Cartas de aceitação das revistas**

Ref.: Ms. No. JAAD-D-13-00718R2  
EARLY DETECTION OF MELANOMA ARISING WITHIN NEVUS SPILUS  
Journal of the American Academy of Dermatology

Dear Dr. Rezze:

I am pleased to tell you that your work has been accepted for online publication in the Journal of the American Academy of Dermatology. Although space considerations prevent us from publishing all worthy material in the print edition of the journal, the online edition is the official indexed version of the journal, online publication is a bona fide method of publication for CV and citation purposes, and online papers are indexed in PubMed. Please be aware that certain submissions, eg. Case Letters, Images in Dermatology, Pearls, Dermoscopy Case of the Month, In Memorium, and Book Reviews, are published exclusively online, whereas others may appear either exclusively online or in the print as well as the online journal.

When your paper is published on ScienceDirect, you want to make sure it gets the attention it deserves. To help you get your message across, Elsevier has developed a new, free service called AudioSlides: brief, webcast-style presentations that are shown (publicly available) next to your published article. This format gives you the opportunity to explain your research in your own words and attract interest. You will receive an invitation email to create an AudioSlides presentation shortly. For more information and examples, please visit <http://www.elsevier.com/audioslides>.

Thank you for submitting your work to the JAAD.

Sincerely,

Bruce H. Thiers, MD  
Editor  
Journal of the American Academy of Dermatology

PONE-D-13-35167R1  
LEARNING REFLECTANCE CONFOCAL MICROSCOPY OF  
MELANOCYTIC SKIN LESIONS THROUGH HISTOPATHOLOGIC  
TRANSVERSAL SECTIONS  
PLOS ONE

Dear Dr. Rezze,

I am pleased to inform you that your manuscript has been deemed suitable for publication in PLOS ONE.

Your manuscript will now be passed on to our Production staff, who will check your files for correct formatting and completeness. After this review, they may return your manuscript to you so that you can make necessary alterations requested by the Production staff.

Before uploading, you should check the PDF of your manuscript very closely. THERE IS NO AUTHOR PROOFING. You should therefore consider the corrected files you upload now as equivalent to a production proof. The text you supply at this point will be faithfully represented in your published manuscript exactly as you supply it. This is your last opportunity to correct any errors that are present in your manuscript files.

In addition, now that your manuscript has been accepted, please log into EM at <http://www.editorialmanager.com/pone>, click the "Update My Information" link at the top of the page, and update your user information to ensure an efficient production and billing process. If you have any questions about billing, please contact [authorbilling@plos.org](mailto:authorbilling@plos.org).

If you or your institution will be preparing press materials for this manuscript, you must inform our press team in advance. We no longer routinely supply publication dates to authors; if you need to know your paper's publication date for media purposes, you must coordinate with our press team. Your manuscript will remain under a strict press embargo until the publication date and time. For more information please contact [onepress@plos.org](mailto:onepress@plos.org).

Please contact [one\\_production@plos.org](mailto:one_production@plos.org) if you have any other questions or concerns. Thank you for submitting your work to PLOS ONE.

With kind regards,  
H. Peter Soyer, MD, FACD  
Academic Editor  
PLOS ONE