

**ESTUDO RETROSPECTIVO E PROSPECTIVO PARA
CORRELAÇÃO ENTRE DERMATOSCOPIA,
MICROSCOPIA CONFOCAL E CORTES TRANSVERSAIS
PARA DIFERENCIAÇÃO DO LENTIGO MALIGNO E DA
QUERATOSE ACTÍNICA PIGMENTADA DA FACE**

MAURICIO MENDONÇA DO NASCIMENTO

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

Área de Concentração: Oncologia

Orientadora: Dra Gisele Gargantini Rezze

**Co-orientadores: Dra Maria Dirlei Ferreira de
Souza Begnami; Dr. Clóvis Antônio Lopes
Pinto**

São Paulo

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Nascimento, Mauricio Mendonça do

Estudo retrospectivo e prospectivo para correlação entre dermatoscopia, microscopia confocal e histopatologia em cortes transversais para diferenciação do lentigo maligno e da queratose actínica pigmentada da face / Mauricio Mendonça do Nascimento – São Paulo, 2017.

60p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Gisele Gargantini Rezze

Descritores: 1. Sarda Melanótica de Hutchinson/Hutchinson's Melanotic Freckle. 2. Ceratose Actínica/diagnóstico/Keratosis, Actinic/ diagnosis. 3. Estudos Retrospectivos/Retrospective Studies. 4. Face/Face. 5. Microscopia Confocal/Microscopy, Confocal. 6. Dermoscopia/Dermoscopy

DEDICATÓRIA

**À minha esposa Danielle, princípio, meio e
motivo por quem cheguei até aqui na vida.
Que nossa jornada seja longa juntos.**

AGRADECIMENTOS

Aos pacientes, muitos deles ainda hoje acompanhados medicamente por nós, como prova de terem confiado em nosso trabalho. Seu esforço e altruísmo não terão sido em vão.

Aos colegas do Departamento de Oncologia cutânea do A.C.Camargo Cancer Center, que me acolheram com respeito e hospitalidade em sua rotina diária.

Aos colegas da Universidade Federal de São Paulo, com quem trabalho há vinte anos e que me ajudaram nesta jornada.

Ao corpo diretivo da pós-graduação do A.C.Camargo Cancer Center, cujo respeito pelo nosso trabalho, apoio na nossa frágil condição de alunos e suporte em todos os momentos ajudam a fazer desta casa um grande centro de pesquisa e ensino.

Aos professores da pós-graduação do A.C.Camargo Cancer Center, pela dedicação ao ensino mesmo tendo grandes tarefas diárias a cumprir para manter a excelente pesquisa que realizam.

Ao A.C.Camargo Cancer Center, pelo esforço em manter aceso o ideal de seus fundadores de proporcionar auxílio aos doentes com câncer, num ambiente adequado para o desenvolvimento de pesquisa e ensino.

À Dra Susana Puig, colega de Barcelona e pesquisadora excepcional com uma grande generosidade pedagógica e que acolheu minha família dermatológica duas vezes em seu serviço.

À Dra Mílvia Maria Simões e Silva Enokihara, colega patologista que preparou, enviou para processamento e analisou todas as lâminas coletadas deste trabalho, fora do escopo de seu trabalho original.

À Dra Gisele G Rezze, colega inteligente e empreendedora, pesquisadora inata que criou em torno de si um aglomerado de colegas interessados e que geraram muitos trabalhos, e amiga de longa data. Uma orientadora excepcional, que acolheu meu sonho de continuar minha idéia do mestrado e que me ensinou uma das coisas mais valiosas da vida, que ninguém faz nada sozinho.

À Tatiana Blumetti e ao Elimar Elias Gomes, meus colegas de pós-graduação que fizeram os cursos da pós, as reuniões científicas e as jornadas de preparação de conteúdo algo mais leve e fácil de ser enfrentado. Tentamos passar despercebidos mas estivemos sempre atuantes em tudo na pós. - Eu não teria feito isso tudo sem vocês!

Ao Dr Renato Shintani Hikawa, amigo de todas as horas e uma daquelas pessoas que gostaríamos de ter conhecido antes para ter mais tempo de agradável convívio e amizade.

À memória de minha mãe Odette Mendonça do Nascimento, que terminou sua jornada junto a mim neste mundo durante meus estudos nesta pós e nunca esmoreceu diante das peças que a vida lhe pregou. -Lembrarei sempre disso, mãe!

As minhas filhas Chloé e Sofia não agradeço! E sim, peço perdão por não ter realizado este trabalho logo para ficar mais tempo com vocês.

À minha esposa Danielle Ioshimoto Shitara do Nascimento, companheira de 15 anos delicada e gentil, mas ao mesmo tempo gigantesca e poderosa. Pessoa que amo pelas solidez de caráter, simplicidade, honestidade e

franqueza, e a quem admiro pela inteligência, capacidade de empreender, destreza e paciência comigo pelos meus inumeráveis defeitos. - Que o carro da vida se torne mais leve para conduzirmos juntos depois deste e mais outros tantos desafios vencidos nos últimos tempos.

RESUMO

Nascimento MM. **Estudo retrospectivo e prospectivo para correlação entre dermatoscopia, microscopia confocal e cortes transversais para diferenciação do lentigo maligno e da queratose actínica pigmentada da face.** São Paulo; 2017. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

A queratose actínica pigmentada (QAP) é uma alteração celular préneoplásica que pode ser confundida com o lentigo maligno (LM) - este um melanoma *in situ* - tanto do ponto de vista clínico como à dermatoscopia. Como o tratamento do LM requer sua excisão completa enquanto o da QAP pode ser mais conservador – destruição parcial ou medicamentos tópicos - o diagnóstico não invasivo pode evitar biópsias e excisões desnecessárias nos casos de QAP. Achados clínicos de várias lesões (sinal da vizinhança), superfície rugosa; e achados dermatoscópicos como a interrupção abrupta da pseudorede, distribuição homogênea do padrão anular-granular podem auxiliar no diagnóstico de QAP. Achado clínico de lesão isolada, crescimento indolente - infectivo ou lentiginoso; e achados dermatoscópicos de estruturas romboidais escuras (marrons ou pretas), pontos e glóbulos cinza-ardósia, aberturas foliculares assimetricamente pigmentadas, padrão anular-granular, estrias cinza-ardósia e borrões escuros podem auxiliar no diagnóstico de LM. O acometimento folicular no LM e na QAP parece se dar de modo diferente. A microscopia confocal *in vivo* (MC) - um novo método não invasivo de imagem - têm sido utilizada na demonstração das estruturas do folículo *in vivo*. Semelhante à dermatoscopia, a MC apresenta um imagem *en-face*, no plano paralelo à epiderme, mas adicionalmente revela detalhes morfológicos da arquitetura tecidual, com resolução celular. Além disso, o modo *Stack* permite a realização de exploração instantânea com alta magnificação e resolução celular da espessura epidérmica. Por ser a melanina um marcador das imagens à MC e por estar presente tanto nos queratinócitos pigmentados das QAP quanto nos melanócitos dos LM, esta

técnica complementa o estudo morfológico do acometimento folicular nestas duas entidades. Não existem relatos na literatura médica de abordagem folicular comparando as características dermatoscópicas, a MC e os achados histopatológicos em cortes transversais. O objetivo deste estudo foi descrever a técnica para realização da abordagem folicular à dermatoscopia, MC e histopatologia em cortes transversais das QAP, comparando estes achados aos do LM, no intuito de oferecer uma interpretação mais precisa dos achados celulares e arquiteturais. Métodos: Estudo prospectivo e retrospectivo, de correlação dermatoscópico-confocal-histológica de estruturas encontradas à dermatoscopia da queratose actínica pigmentada. Lesões pigmentadas na face de diagnóstico duvidoso foram avaliadas por dois dermatologistas experientes em dermatoscopia com relação à presença de IGH, e outros critérios dermatoscópicos previamente descritos para LM. Sensibilidade, especificidade e concordância interobservador foram avaliadas. As áreas de interesse foram demarcadas com um punch de 2mm ou com caneta cirúrgica e posteriormente submetidas ao exame microscópico confocal *in vivo* antes da análise histopatológica. Realizou-se estudo imunohistoquímico com AE1/AE3, HMB45, para auxílio na diferenciação de queratoses actínicas e lentigos malignos. Resultados: De um total de 79 lesões, 58 correspondiam a QAPs e 21 a LM. Halo interno cinza (HIC) foi a estrutura mais frequentemente observada (91,4%) nas QAPs, seguida por estruturas romboidais (58,6%) e pontos e glóbulos azul-acinzentados (56,9%), enquanto as estruturas mais frequentemente observadas em lentigos malignos foram estruturas romboidais (71,4%), pontos e glóbulos azul-acinzentados (66,7%) e aberturas foliculares assimetricamente pigmentadas (AFAP). AFAP e os black blotches foram os critérios significativamente associados a lentigo maligno (LM) ($p < 0,01$ e $0,004$ respectivamente). HIC apresentou sensibilidade de 91,4% (IC 95% 81,4-96,3%) e especificidade de 71,4% (IC 95% 50,0-86,2%) para QAP quando comparado a lentigo maligno ($p < 0,001$), valor preditivo positivo de 89,98% (IC95% 79,5-95,3%) e excelente concordância interobservador (κ 0,846). O equivalente à microscopia confocal do HIC é o anel de

células brilhantes que se estreita conforme se aprofunda, poupando a estrutura em padrão favo de mel regular do folículo e corresponde na histologia aos queratinócitos normais oriundos do folículo sobrepondo-se aos queratinócitos pigmentados atípicos da queratose actínica pigmentada circunjacente, que deslizam por sob a estrutura de funil sem contudo invadi-la. Conclusão: HIC parece ser um parâmetro sensível e reprodutível no auxílio diagnóstico de QAP. No entanto nenhum parâmetro isolado de dermatoscopia ou MC deve ser usado para diagnóstico e a histologia permanece o padrão ouro.

SUMMARY

Nascimento MM. **[Retrospective and Prospective study for dermoscopic, confocal microscopy and transversal sections correlation for differentiation of lentigo maligna and pigmented actinic keratosis of the face]**. São Paulo; 2017. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Pigmented actinic keratosis (PAK) is a pre-cancerous condition, which can be misdiagnosed as a lentigo maligna (LM), not only from a clinical, but also from a dermoscopic point of view. While a lentigo maligna requires surgical excision, the approach for a PAK can be more conservative. Thus non-invasive diagnostic methods can help avoid unnecessary excisions and biopsies when dealing with PAKs. Clinical finding as the presence of multiple lesions in proximity (neighborhood sign) and rough surface, and dermoscopic features, such as abrupt interruption of pigmented pseudonetwork, homogeneous distribution of the annular granular pattern, may help diagnose a PAK. On the contrary, the finding of isolated lesion, of slow and lentiginous growing, with dermoscopic findings of asymmetric pigmented follicular openings, dark (brown or black) rhomboidal structures, slate-gray globules and slate-gray dots, hyper pigmented rim of follicular openings, slate-gray streaks and dark streaks, annular-granular pattern, and black blotches. PAK and LM may affect the follicular structure in different patterns. Reflectance Confocal microscopy *in vivo* (RCM) - is a non-invasive imaging method, which is being rendered useful in demonstrating the follicular structures *in vivo*. Similar to dermoscopy, RCM presents an *en-face* image, parallel to the epidermis plane, additionally offering morphologic details of the histologic architecture of the lesion with cellular resolution. Moreover, the stack technique allows the real-time evaluation at cellular level of the skin structures. Since melanin is a natural marker in RCM, present in both pigmented keratinocytes in PAK and melanocytes in LM, RCM allows the evaluation of the way the follicle is affected in both entities. Up to our

knowledge there have been no previous studies comparing dermoscopic, transverse histopathologic sections and RCM of PAKs and LMs of the face, using the follicular approach. The objective of this study was to describe the technique of follicular approach in dermoscopy, RCM and histopathology in PAKs, comparing the findings with those observed in LM, in order to offer a more precise interpretation of architectural and cellular findings. Methods: Prospective and retrospective study for dermoscopic-histologic and confocal microscopy correlation of structures observed in PAKs. Doubtful facial pigmented lesions were evaluated for the presence of Inner gray halo (IGH) and other dermoscopic parameters previously described for LM by two experienced dermatologists. Sensitivity, specificity and interobserver agreement was evaluated. Areas presenting IGH were marked and imaged with reflectance confocal microscopy before sampling for histopathologic correlation. Immunohistochemistry with AE1/AE3, HMB45 antibodies was performed. Results: A total of 79 lesions, being 58 PAKs and 21 LM were evaluated. When considering PAK, IGH detection was the most frequently observed feature (91.4%), followed by Rhomboidal structures (58.6%) and Slate-gray globules and dots (56.9%), while for LM, the most frequent dermoscopic feature was Rhomboidal structures (71.4%), followed by Slate-gray globules and dots (66.7%) and Asymmetric Pigmented follicular openings (57.1%). Asymmetric Pigmented follicular openings and Black Blotches were statistically significant for LM diagnosis compared with PAK ($p < 0.01$ and 0.004 respectively). IGH presented a sensitivity of 91.4% (CI 95% [81.4%; 96.3%]), specificity of 71.4% (CI 95% [50.0%; 86.2%]) statistically significant compared with LM ($P < 0.001$), PPV of 89.8% (CI 95% [79.5%; 95.3%]), and excellent interobserver agreement ($\kappa = 0.846$). The RCM counterpart of IGH is a ring of bright keratinocytes sparing the normal honeycomb structure around the follicle, which becomes narrower with depth of imaging. In histology the normal keratinocytes from the follicle, spared (orthokeratotic non-anaplastic) epidermis, originate an umbrella-like structure, underneath which we can observe the spreading of the atypical pigmented keratinocytes, however without compromising the follicular

structure. Conclusion: IGH seems to be a sensitive and reproducible parameter for the diagnosis of PAKs. Nevertheless a single dermoscopic or confocal microscopy criterium should not be used to establish a differential diagnosis between PAK and LM and histology remains the gold standard in doubtful cases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Modelo de progressão dermatoscópica do lentigo maligno.....	5
Figura 2	Conceito morfológico das queratoses actínicas segundo Pinkus.....	8
Figura 3	Imagem do aparelho de microscopia confocal Vivascope®150	13
Figura 4	Preparo para realização do exame de microscopia confocal....	14
Figura 5	Lentigo maligno.....	38
Figura 6	Imagem à MC do Lentigo Maligno observado na figura 5; vivablock superficial.....	39
Figura 7	Imagem à MC do Lentigo Maligno observado na figura 5; Vivablock na junção dermo-epidérmica.....	40
Figura 8	Imagem à MC do Lentigo Maligno observado na figura 5; Vivablock na junção dermo-epidérmica-derme.....	41
Figura 9	Queratose actínica pigmentada.....	42
Figura 10	Imagem à MC do Queratose Actínica Pigmentada observada na figura 9; Vivablock superficial no extrato córneo e granuloso.....	42
Figura 11	Imagem à MC do Queratose Actínica Pigmentada observada na figura 9; Vivablock Junção dermo-epidérmica.....	43
Figura 12	Abordagem folicular.....	44

Figura 13	Correlação dermatoscópica-histopatológica do halo interno cinza.....	46
Figura 14	Queratose actínica pigmentada: Desenho esquemático do HIC.....	47
Figura 15	Desenho esquemático de Halo Interno Cinza e correlação com estruturas dermatoscópicas descritas no folículo.....	48
Figura 16	Melanomas apresentando gray circles.....	49
Figura 17	Gray Circles versus Double circle.....	50
Figura 18	Doença de Bowen Pigmentada.....	51

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

APFO	Asymmetric pigmented follicular openings
AFAP	Aberturas foliculares assimetricamente pigmentadas
RCM	Reflectance Confocal Microscopy
HIC	Halo Interno Cinza
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IGH	Inner Gray Halo
LM	Lentigo Maligno
MC	Microscopia Confocal
PAK	Pigmented Actinic Keratosis
QAP	Queratose actínica pigmentada

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Lentigo maligno	2
1.2	A Dermatoscopia	2
1.3	A Dermatoscopia das lesões da face	3
1.4	A Microscopia Confocal	10
1.4.1	Realização do exame e princípios físicos.....	12
1.4.2	Microscopia confocal do lentigo maligno da face	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivos Primários	17
2.2	Objetivos Secundários.....	17
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1	Desenho geral do Estudo	18
3.2	Seleção da população do estudo	18
3.2.1	Critérios de inclusão	18
3.2.2	Critérios de exclusão	19
3.3	Ética	19
3.3.1	Condução ética do estudo	19
3.3.2	Informação e consentimento do paciente	20
3.4	Seleção de pacientes	20
3.4.1	Capturas de imagens clínicas e dermatoscópicas.....	20
3.4.2	Exame microscópico confocal	21
3.4.3	Realização da biópsia	22
3.5	Avaliação laboratorial do material.....	22
3.6	Análise dos dados	22
4	RESULTADOS	23
4.1	Publicações	23

4.1.1	Descrição do método e diferenças entre QAP e LM.....	23
4.1.2	Aplicabilidade do método de abordagem folicular	31
5	DISCUSSÃO	36
6	CONCLUSÃO	52
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	54

ANEXOS

Anexo 1 Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

Anexo 2 Certificado 5 top papers do ano, apresentação na Reunião
da pós Graduação A.C.Camargo Cancer Center

APÊNDICE

Apêndice 1 Termo de Consentimento Livre e Informado

1 INTRODUÇÃO

A incidência global do melanoma cutâneo tem aumentado nos últimos 50 anos apesar do aumento da conscientização, educação e campanhas de saúde pública sobre o melanoma, de modo a corresponder a um dos cânceres com maior aumento da taxa de incidência (GELLER e ANNAS 2003; GELLER et al. 2007; GIBLIN e THOMAS 2007; FRANGOS et al. 2011). Nos EUA, a incidência subiu de 13/100.000 habitantes em 1990 para 21/100.000 habitantes em 2006 e atualmente corresponde ao sexto câncer mais diagnosticado em homens e sétimo em mulheres e um dos cânceres mais comuns em jovens nos EUA (GELLER e ANNAS 2003; PURDUE et al. 2008).

A incidência global do melanoma varia de 0,2/100.000 habitantes em regiões da Ásia a quase 50/100.000 habitantes na Austrália (GELLER e ANNAS 2003).

Estima-se que 69.000 novos casos de melanoma e 8700 mortes associadas ao melanoma ocorram anualmente nos EUA, com risco de desenvolver melanoma ao longo da vida de um indivíduo de 1:75 (GELLER et al. 2007; JEMAL et al. 2010).

Melanoma é o cancer cutâneo mais letal, com taxa de mortalidade de 2,9 mortes/100.000 habitantes, sendo maior entre homens e mulheres acima de 60 anos (GELLER e ANNAS 2003; WATSON et al. 2011). De maneira geral, a mortalidade do melanoma corresponde a 3 vezes o número de

mortes ocasionadas por todas as outras malignidades cutâneas (GELLER e ANNAS 2003).

1.1 LENTIGO MALIGNO

O lentigo maligno corresponde a 10% de todos os melanomas, com um risco de progressão para melanoma maligno de 5% (ELDER 2005).

COHEN et al. (1995) referiram uma incidência de lentigo maligno de 1,3:100.000/ano na Austrália. Segundo os autores, o lentigo maligno corresponde a 4%-15% de todos os melanomas e a 10%-26% dos melanomas na face. Sobre o local de predileção, foram citados a cabeça e o pescoço, podendo ocorrer nos membros superiores.

Em nosso meio, O Grupo Brasileiro para o Estudo do Melanoma apresentou dados de um levantamento de comunicação simplificada através da Internet, de 1998 a agosto de 2000. Melanomas da face foram 12% do total dos melanomas notificados. O lentigo maligno melanoma correspondeu a 12,64% do total de melanomas notificados, atrás de disseminativo superficial (35,76%), não classificados (18,79%) e nodular (17,07%) (Grupo Brasileiro de Melanoma-GBM 2000).

1.2 A DERMATOSCOPIA

A dermatoscopia (sinônimos: microscopia de superfície, dermoscopia, epiluminescência, microscopia de pele, microscopia de luz incidente) é um

método não invasivo, que avalia lesões cutâneas através do uso de magnificação óptica (10x) e o uso de óleo ou outros veículos na interface pele-dermatoscópio para minimizar o efeito da refração da luz. Permite a visualização de estruturas morfológicas não visíveis a olho nu, auxiliando a correlação entre clínica (macroscopia) e histopatologia (ARGENZIANO et al. 2003).

Este método não apenas aumentou o diagnóstico precoce de melanoma, como a capacidade de diferenciação de melanomas e seus simuladores clínicos comparado ao exame a olho nu (STEINER et al. 1987; PEHAMBERGER et al. 1993; PROVOST et al. 1997; KITTLER et al. 2002, CARLI et al. 2004). O exame dermatoscópico representou um incremento de 30% na acurácia do diagnóstico clínico, podendo reduzir o número de excisões desnecessárias, de lesões de aparência maligna a olho nu, porém benignas à dermatoscopia e ao exame histopatológico (KITTLER et al. 2002; CARLI et al. 2004).

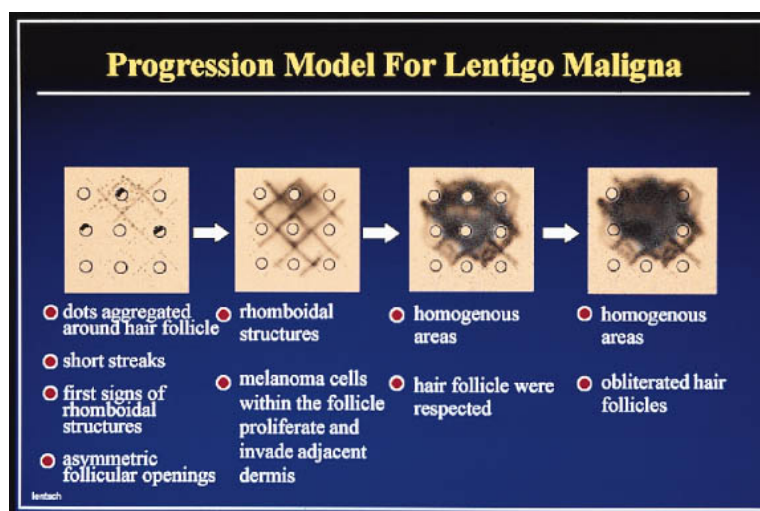
1.3 A DERMATOSCOPIA DAS LESÕES DA FACE

A despeito desta utilidade inicial, os padrões morfológicos das lesões pigmentadas vistos à dermatoscopia dependem da existência de cristas epidérmicas profundas na pele para que a rede pigmentar possa ser analisada. A dermatoscopia da face é peculiar por que esta não apresenta rede pigmentar (KREUSCH e RASSNER 1991). Por este motivo os primeiros estudos de microscopia de superfície não se aplicavam à face.

KREUSCH e RASSNER (1991) observaram que devido ao padrão especial da junção dermo-epidérmica na face, o padrão de rede pigmentar em favo de mel não seria encontrado. STOLZ (1994) descreveram que na face, o padrão encontrado seria devido aos buracos correspondentes aos folículos sebáceos livres de pigmento envolvidos pelo pigmento na pele ao redor. A esse padrão chamaram de rede pseudopigmentada. Em 1993 eles afirmam que a rede pseudopigmentar pode ser acentuada quando o pigmento ao redor do folículo se acentua com a invasão deste pelas células do melanoma.

SCHIFFNER et al. (2000) estudaram o uso de critérios dermatoscópicos específicos para diagnose de lentigo maligno na face. Foram analisados 27 critérios diferentes detectáveis, relacionados às diferentes estruturas e combinação de cores e estruturas. Quatro critérios associados resultaram em uma sensibilidade de 89% e uma especificidade de 96% para lentigo maligno. São eles: aberturas foliculares assimetricamente pigmentadas, estruturas romboidais escuras, pontos cinza-ardósia e glóbulos cinza-ardósia. Os autores correlacionaram seus achados à histologia dos lentigos malignos. Propuseram que as aberturas foliculares assimetricamente pigmentadas eram devidas à invasão do folículo pilo-sebáceo pelas células malignas do melanoma. As estrias corresponderiam à fusão de células do melanoma na epiderme e derme alta. Como as estrias proliferam-se ao redor do folículo, sua fusão conferiria o aspecto de estruturas romboidais. Pontos e glóbulos cinza-ardósia seriam decorrentes da presença de macrófagos carregados de melanina na derme.

Desenvolveram com base em seu estudo um modelo morfológico de crescimento dos lentigos na face (**Figura 1**). O achado mais precoce são os pontos cinza-ardósia ao redor do folículo. Estes pontos podem aumentar, tornando-se glóbulos ou podem se fundir, tornando-se estrias. Diversas estrias podem conferir o aspecto de estruturas romboidais. Células tumorais podem mergulhar no folículo, resultando em glóbulos e pontos na periferia do folículo, conferindo o aspecto de aberturas foliculares assimetricamente pigmentadas.



Fonte: SCHIFFNER et al. (2000)

Figura 1 - Modelo de progressão dermatoscópica do lentigo maligno.

Mais recentemente, PRALONG et al. (2012) incluíram 3 novos critérios para o diagnóstico dermatoscópico de lentigo maligno da face - padrão similar a alvo (target-like pattern), aumento da densidade vascular da lesão e estruturas romboidais vermelhas.

Os estudos dermatoscópicos na face até a presente data partiram da premissa de se diferenciar o lentigo maligno (LM) das outras lesões

benignas, sendo que queratoses actínicas pigmentadas (QAP) são uma armadilha diagnóstica, podendo simular por vezes o lentigo maligno. Esta diferenciação é realizada através do estudo anátomo-patológico da lesão em caso de dúvida diagnóstica.

AKAY et al. (2010) estudaram esta dificuldade de diferenciação entre os lentigos malignos e as queratoses actínicas pigmentadas. Em sua série de 89 lesões (67 queratoses actínicas pigmentadas, 20 lentigos malignos e 2 queratoses actínicas líquen plano-símiles), encontraram todos os critérios anteriormente descritos para lentigos malignos nas queratoses actínicas pigmentadas, exceto os borrões negros (black Blotches).

GONCHAROVA et al. (2013) pontuaram as similaridades entre lentigos malignos e queratoses actínicas pigmentadas e observaram que os lentigos malignos apresentam pseudorrede pigmentada sem um padrão em morango e que as queratoses actínicas pigmentadas apresentavam este padrão.

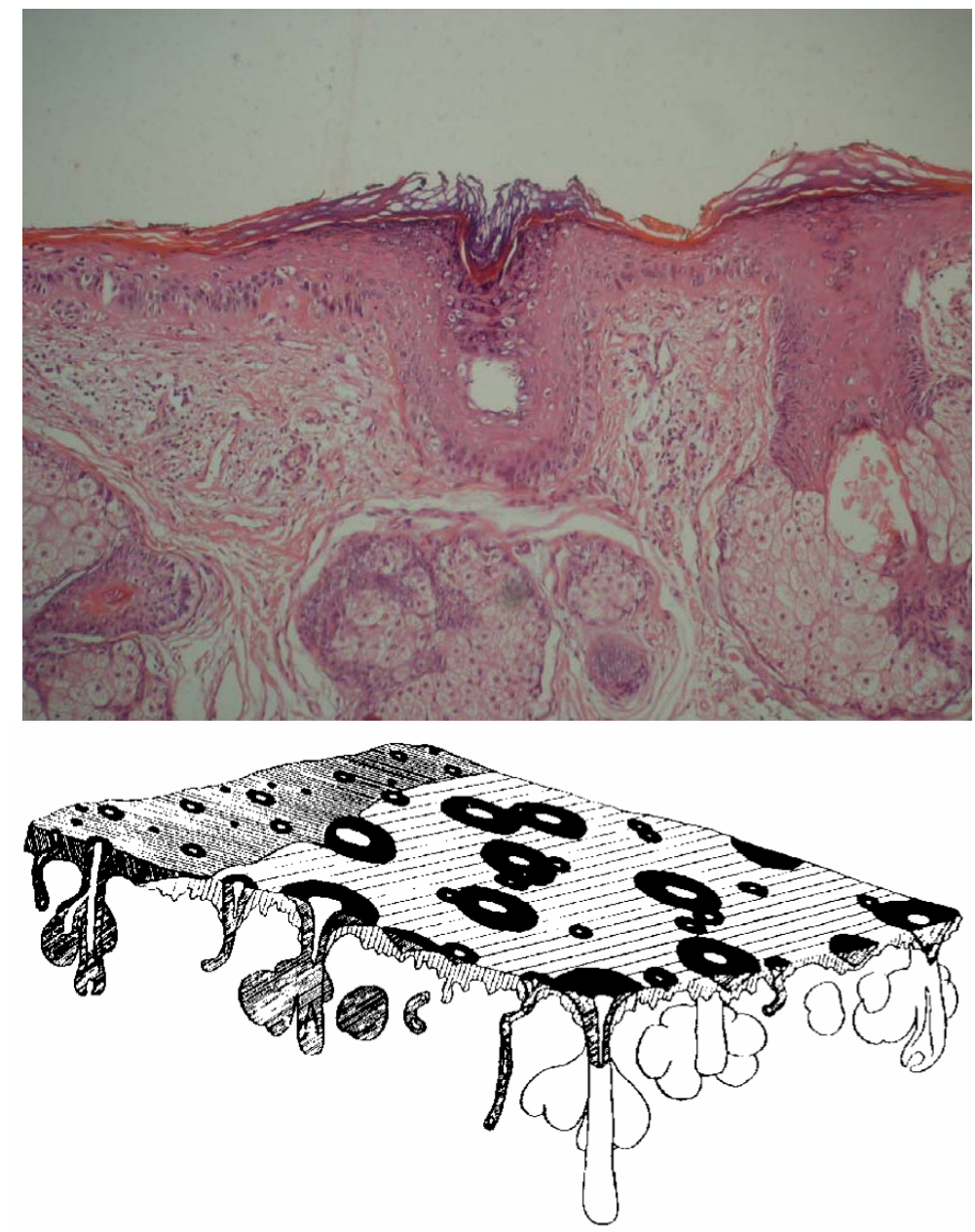
ROSENDAHL et al. (2012) descreveram um círculo branco centrado ao redor de um infundíbulo preenchido com um plugue de queratina visível como um plugue laranja amarelado, cujo substrato histológico seria a acantose e hipergranulose da epiderme infundibular. Originalmente, este critério pareceu útil no diagnóstico de carcinomas espinocelulares e queratoacantomas.

TSCHANDL et al. (2015) estudaram lesões planas da face com dermatoscopia na busca de critérios diagnósticos diferenciais, e criaram uma análise de padrões para as queratoses actínicas pigmentadas que incluía o

padrão em círculos brancos, definido anteriormente por Rosendahl, a queratose (scale) e rosetas (four dot clods).

Deste modo, até o presente momento, diferenciar algumas queratoses actínicas pigmentadas dos lentigos malignos continua um desafio. Alguns autores sugerem como pistas diagnóstica a observação de outras lesões de queratose actínica na face (o sinal da vizinhança) e a superfície da lesão rugosa ao exame clínico (SCHIFFNER et al. 2000; STOLZ et al. 2002; KATZ 2005). MENZIES et al. (1996) afirmaram também que as queratoses actínicas pigmentadas eram morfologicamente variáveis, e descreve os buracos hipodensos gerados pelos óstios foliculares na lesão destas queratoses actínicas. Estes buracos hipodensos poderiam corresponder ao funil de células normais descrito por PINKUS em 1958, e observado à dermatoscopia na tese de mestrado do autor deste protocolo (NASCIMENTO 2006).

PINKUS em 1958 elaborou um modelo morfológico, mostrando que nas queratoses actínicas, as células vindas dos anexos não se misturavam às células da epiderme modificada pelo dano actínico, explicando o funil de células normais e os anexos epidérmicos poupados nas queratoses actínicas (**Figura 2**).



Fonte: PINKUS (1958)

Figura 2 - Conceito morfológico das queratoses actínicas

Um dos objetivos deste protocolo é avaliar se existe a correlação da estrutura em funil vista à histopatologia por Pinkus, com os achados à dermatoscopia, obtidos da tese de mestrado do autor deste protocolo (NASCIMENTO 2006).

Sabe-se que as estruturas dermatoscópicas resultam de alterações específicas na epiderme, junção dermo-epidérmica e derme (SOYER et al. 1989; GUILLOD et al. 1997; KRISCHER et al. 1997; MASSI et al. 2001). Portanto, uma correta avaliação dermatoscópica inclui uma boa correlação clínico-histológica, de modo a se estabelecer qual alteração histológica é responsável pelo critério dermatoscópico (SOYER 1988), auxiliando não apenas na correta definição dos critérios dermatoscópicos, mas na sua aplicabilidade na clínica e na avaliação de prognóstico (FERRARA et al. 2002).

Métodos tradicionais de macroscopia – por exemplo, a regra das metades - geralmente visam a avaliação de margens de excisão tumoral e não levam em consideração os aspectos dermatoscópicos, podendo dificultar o diagnóstico de lesões pigmentadas se os cortes não incluírem as estruturas dermatoscópicas importantes para o diagnóstico da lesão (FERRARA et al. 2002). Alguns estudos, com metodologia diversa, foram publicados a fim de se correlacionar as principais estruturas dermatoscópicas com seus correspondentes histológicos (YADAV et al. 1993; SOYER et al. 2000; MASSI et al. 2001; FERRARA et al. 2002). Apesar dos diferentes métodos desenvolvidos para se minimizar o erro de macroscopia, a maioria dos autores foi unânime em afirmar que a correlação dermatoscópico-histológica é dificultada pelo fato de as estruturas dermatoscópicas serem vistas em um plano bidimensional horizontal e as estruturas histopatológicas serem orientadas verticalmente (YADAV et al. 1993; SOYER et al. 2000; MASSI et al. 2001; FERRARA et al. 2002). Esta

diferença de planos de avaliação poderia atrapalhar a análise de estruturas dermatoscópicas específicas, pela dificuldade de se obter cortes histológicos precisamente através destas estruturas (YADAV et al. 1993). A fim de minimizar este viés, REZZE et al. (2006) realizaram avaliação de estruturas dermatoscópicas através do uso de cortes histológicos transversais, paralelos ao plano da epiderme. Mais recentemente tem sido utilizada a Microscopia de reflectância confocal (MC), que é um método diagnóstico não invasivo, não doloroso que permite resolução ao nível celular *in vivo*, muito próxima a histopatologia convencional, além de correlação direta de estruturas vistas à dermatoscopia, já que ambos os métodos permitem a visualização das estruturas no plano horizontal (MOSCARELLA et al. 2010).

1.4 A MICROSCOPIA CONFOCAL

A MC tem a finalidade de fornecer imagens instantâneas, em tempo real, de alta resolução, *in vivo*, permitindo a visualização das estruturas anatômicas (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; SCOPE et al. 2007).

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). Atualmente, a avaliação de lesões pigmentadas à MC representa uma oportunidade única no exame não invasivo da pele, pois como a melanina é brilhante na imagem da MC não há necessidade de utilização dos marcadores fluorescentes ou corantes teciduais.

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 3 e 4**).



Figura 3 - Imagem do aparelho de microscopia confocal VivaScope® 1500.

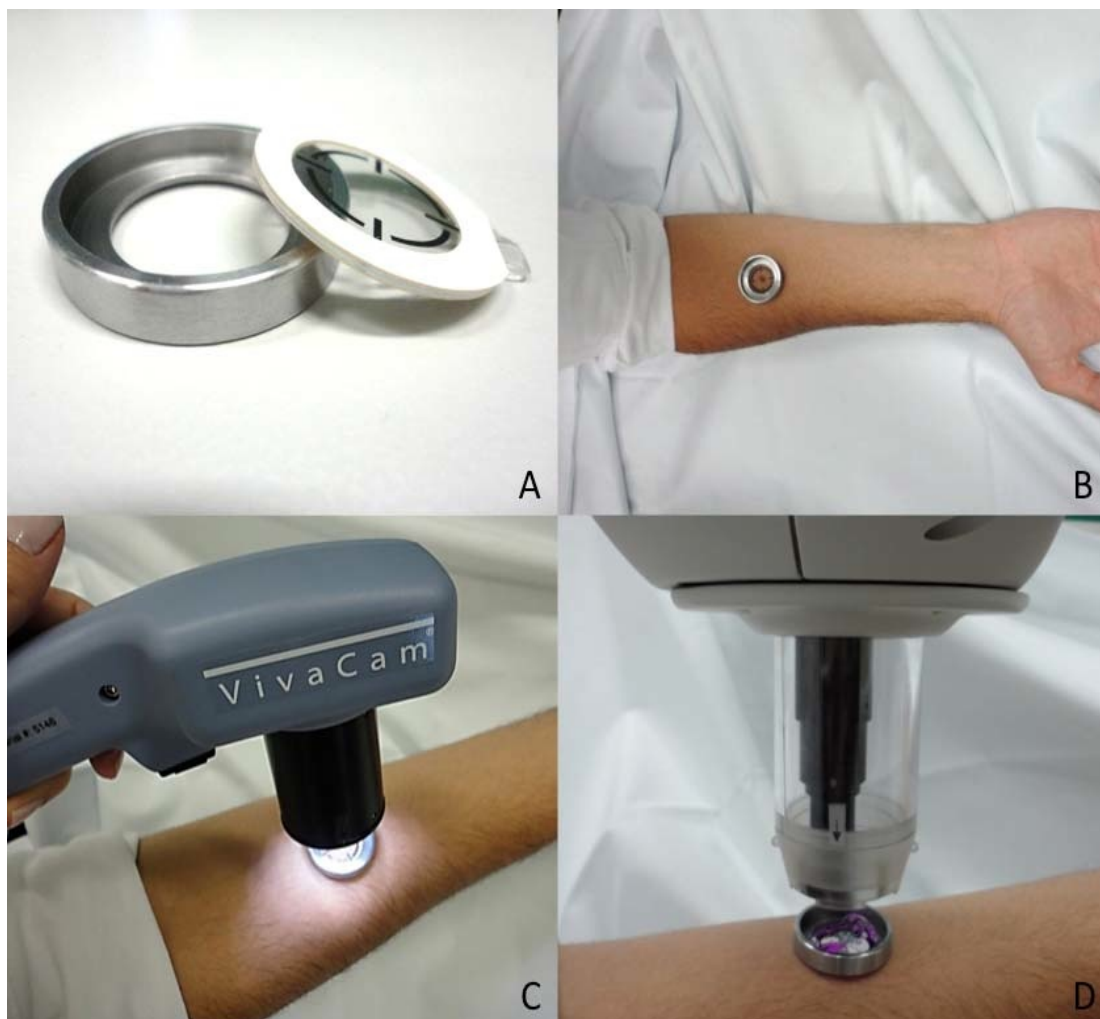


Figura 4 - Preparo para realização do exame de microscopia confocal. As imagens ilustram os passos mais importantes para a realização do exame com o aparelho: Vivascope® 1500. **A.** Colar o anel plástico adesivo ao anel metálico. **B.** Após a aplicação do meio de imersão (geralmente óleo), fixar o 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.

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 μm , resolução axial entre 1 e 5 μm (espessura da secção óptica) e uma profundidade máxima de 200 a 300 μm (derme papilar) (MARGHOOB et al. 2003)

1.4.2 Microscopia Confocal do Lentigo Maligno da Face

Já foram descritas à microscopia confocal critérios diagnósticos de lentigo maligno e queratose actínica não pigmentada e pigmentada (HORN et al. 2008; AHLGRIMM-SIESS et al. 2009; RISHPON et al. 2009; GUITERA et al. 2010).

AGHASSI et al. (2000) descreveram os primeiros achados das queratoses actínicas à microscopia confocal: hiperqueratose, pleomorfismo e alargamento nuclear, desarranjo arquitetural da epiderme.

GUIERA et al. (2010) estudaram os principais achados confocais do LM sendo de relevo os achados de células pagetóides redondas maiores que 20 μm e sua invasão folicular.

WURM et al. (2012) descreveram achados confocais de uma queratose actínica pigmentada pela primeira vez, junto com 3 outros tipos de lesões na face, dentre elas um lentigo maligno. Para a queratose actínica pigmentada os achados de confocal foram: padrão em favo de mel atípico, células nucleares arredondadas nas camadas espinhosas e granular, vasos sanguíneos arredondados.

MOSCARELLA et al. (2014) estudaram 17 queratoses actínicas pigmentadas à microscopia confocal e encontraram achados epidérmicos tais como queratinócitos atípicos, paraqueratose, descamação; espessura epidérmica aumentada; papilas dérmicas brilhantes com espaços interpapilares aumentados; células dendríticas epidérmicas compatíveis com células de Langerhans.

A correlação dermatoscópica-confocal-histopatológica pode permitir melhor validação destes métodos não invasivos, a fim de se evitar excisões desnecessárias (que representam tempo maior de procedimento, desconforto, custo e risco maior ao paciente) (MOSCARELLA et al. 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

Correlacionar as estruturas observadas na queratose actínica pigmentada à dermatoscopia, com a microscopia confocal de reflectância e à histopatologia utilizando cortes transversais.

2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIO

Avaliar a capacidade diagnóstica dos métodos não invasivos (dermatoscopia e microscopia confocal) na diferenciação de lentigo maligno e queratose actínica pigmentada.

Avaliar se a preservação de invasão por células tumorais do epitélio perifolicular na queratose actínica à histopatologia, descrita por Pinkus, é um modelo de correlação possível com a dermatoscopia e a microscopia confocal, podendo constituir um fator de auxílio no diagnóstico diferencial com o lentigo maligno.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DESENHO GERAL DO ESTUDO

Estudo prospectivo e retrospectivo, de correlação dermatoscópico-confocal-histológica de estruturas encontradas à dermatoscopia da queratose actínica pigmentada, para avaliar a capacidade diagnóstica de métodos não invasivos com relação ao padrão ouro (histopatológico). Serão utilizados como controle os achados dermatoscópicos e de microscopia confocal do lentigo maligno.

3.2 SELEÇÃO DA POPULAÇÃO DO ESTUDO

3.2.1 Critérios de Inclusão

Lesões pigmentadas na face sugestivas de lentigo maligno ou queratose actínica pigmentada ou lesões duvidosas ao exame dermatoscópico.

Critérios dermatoscópico de lentigo maligno (SCHIFFNER et al. 2000):

1. as aberturas foliculares assimetricamente pigmentadas.
2. as estruturas romboidais escuras.
3. os pontos cinza-ardósia.
4. os glóbulos cinza-ardósia.

Critérios dermatoscópicos e clínicos de queratose actínica pigmentada (NASCIMENTO 2006):

1. superfície rugosa
2. sinal da vizinhança
3. halo interno cinza
4. arquitetura dos pontos regular

3.2.2 Critérios de Exclusão

- Lesões não pigmentadas da face
- Lesões sem diagnóstico histopatológico de queratose actínica pigmentada ou lentigo maligno
- Lesões cuja microscopia confocal não permitiu a captação adequada de *stacks* ou *blocks*

3.3 ÉTICA

Este estudo foi submetido à aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital AC Camargo , sob o número **CEP nº: 1524/11** (Anexo 1).

3.3.1 Condução Ética do Estudo

Este estudo foi conduzido de acordo com os princípios éticos da Declaração de Helsinki e com as diretrizes da legislação vigente.

3.3.2 Informação e Consentimento do Paciente

O termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice 1) foi considerado adequado e aceito.

3.4 SELEÇÃO DE PACIENTES

Foram selecionados pacientes consecutivos com lesões pigmentadas na face para inclusão no plano de estudo. Os pacientes eram originados no ambulatório de dermatoscopia do Hospital A. C. Camargo e no ambulatório da dermatoscopia do Hospital São Paulo. Os registros foram realizados no Hospital A. C. Camargo. Os pacientes incluídos no estudo deveriam apresentar à dermatoscopia critérios diagnósticos de lentigo maligno ou de queratose actínica pigmentada ou lesão de diagnóstico duvidoso, de acordo com os critérios de inclusão e exclusão referidos anteriormente. Os registros de banco de dados de imagens confocais e dermatoscópicas cujos critérios de inclusão se encaixassem nos propostos poderiam também ser utilizados retrospectivamente, embora os cortes histológicos fossem os convencionais nos pacientes da rotina destes serviços, a fim de dar mais consistência estatística aos dados morfológicos das queratoses actínicas pigmentadas e sua correlação dermatoscópico-confocal.

3.4.1 Captura de Imagens Clínicas e Dermatoscópicas

As imagens clínicas foram captadas com Câmera Nikon, modelo Nikon 1 J1, 10 megapixels, com objetiva macro-zoom, ou equivalente. As

imagens dermatoscópicas foram captadas com o aparelho Heine Delta 20 (Heine) ou DermLite DL3 acoplado à câmera digital, ambos com aumentos de X10

3.4.2 Exame Microscópico Confocal

As estruturas hiperpigmentação perifolicular foram demarcadas com um punch de 2mm ou com caneta cirúrgica, posteriormente submetidas ao exame microscópico confocal in vivo para correlação dermatoscópica-confocal. O aparelho utilizado foi Vivascope 1500 (Lucid Inc. Henrietta, NY), como descrito anteriormente. Este aparelho utiliza um laser diodo de 830nm com potência <16mW em nível tecidual, permitindo resolução óptica de 2 micrometros horizontais e 5 micrometros na vertical. Cada imagem obtida corresponde a 500 x 500 micrometros no nível da pele selecionado (de epiderme a derme papilar).

Foram realizadas imagens nos diferentes níveis da epiderme e derme superficial. Além de imagens individuais em sequenciamento - *block images* - nos diversos níveis desejados da epiderme, buscando em especial o nível da camada espinhosa, granulosa e junção dermo-epidérmica, *stack images* a partir da queratina alta no eixo Z do aparelho com passo de 1,5µm de avanço até 150 µm.

3.4.3 Realização da Biópsia

A coleta do material para exame anátomo-patológico foi realizada sob as condições técnicas exigidas para o procedimento, sob anestesia local.

O restante da lesão foi submetido a biópsia incisional ou excisional. A decisão se a biópsia seria incisional ou excisional foi tomada levando-se em consideração a dúvida diagnóstica, o tamanho da lesão, diagnóstico prévio em material anteriormente analisado do mesmo caso ou probabilidade de malignidade.

3.5 AVALIAÇÃO LABORATORIAL DO MATERIAL

A área selecionada com punch 2mm, quando marcada, foi submetida a cortes histológicos transversais (Rezze, Scramim et al. 2006). Alternativamente a marcação foi feita *a posteriori* da captação para realização da biópsia.

As lâminas foram coradas com coloração hematoxilina-eosina e submetidas a imunohistoquímica AE1/AE3, HMB45, para auxílio na diferenciação de queratoses actínicas e lentigos malignos.

3.6 ANÁLISE DOS DADOS

As imagens dermatoscópicas, confocais e histopatológicas foram analisadas de maneira cega por 2 dermatologistas e 2 patologistas com experiência em histopatologia de pele.

4 RESULTADOS

4.1 PUBLICAÇÕES

4.1.1 Descrição do método e diferenças entre QAP e LM

Nascimento MM, Shitara D, Enokihara MM, Yamada S, Pellacani G, Rezza GG. Inner gray halo, a novel dermoscopic feature for the diagnosis of pigmented actinic keratosis: clues for the differential diagnosis with lentigo maligna. **J Am Acad Dermatol** 2014 Oct; 71(4):708-15. doi:10.1016/j.jaad.2014.05.025. PMID: 24947988.

ORIGINAL ARTICLE

Inner gray halo, a novel dermoscopic feature for the diagnosis of pigmented actinic keratosis: Clues for the differential diagnosis with lentigo maligna

Mauricio M. Nascimento, MD,^{a,b} Danielle Shitara, MD,^a Milvia M. S. S. Enokihara, MD, PhD,^a Sergio Yamada, MD,^a Giovanni Pellacani, MD, PhD,^c and Gisele G. Rezze, MD, PhD^b
São Paulo, Brazil, and Modena, Italy

Background: Pigmented actinic keratosis (PAK) is a frequent simulator of lentigo maligna (LM) on the face upon clinical and dermoscopic examination, leading to misdiagnosis and unnecessary excisions. LM and PAK share dermoscopic features, making it difficult to have a confident diagnosis of PAK only with current dermoscopic knowledge.

Objective: We sought to evaluate sensitivity, specificity, and interobserver reproducibility of a novel dermoscopic feature, inner gray halo (IGH), and establish its histopathological and confocal correlations.

Methods: Dermoscopists blinded to histopathological diagnosis evaluated 58 PAK and 21 LM for the presence of IGH and dermoscopy parameters. Areas exhibiting IGH were marked and imaged with reflectance confocal microscopy before sampling for histopathologic correlation. Reflectance confocal microscopy and transverse histologic sectioning were performed in 14 of 79 cases.

Results: IGH was present in 53 of 58 (94.1%) PAK and in 5 of 21 (23.8%) LM in our series (sensitivity 91.4%; specificity 71.4%; positive predictive value 89.8%). Interobserver agreement was excellent (Kappa 0.846). Through transverse and perpendicular histologic sections, a dermoscopic-histologic-confocal correlation of IGH was established.

Limitations: A larger test set is needed to further validate the use of IGH in the differential diagnosis of PAK and facial pigmented lesions.

Conclusion: IGH is a novel dermoscopic parameter useful for the differentiation of PAK from LM on the face. (J Am Acad Dermatol <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2014.05.025>.)

Key words: confocal; dermoscopy; face; histopathology; lentigo maligna; pigmented actinic keratosis.

Pigmented actinic keratosis (PAK) of the face represents a challenging lesion on clinical and dermoscopic examination, which is frequently misdiagnosed as lentigo maligna (LM).¹⁻⁴ Whereas LM should be excised, PAK can be treated with less invasive approaches and excellent aesthetic results.^{5,6} However, diagnosis is frequently obtained after biopsy, leading to unnecessary scars on a cosmetically sensitive area. Up until now, the

Abbreviations used:

CI: confidence interval
 IGH: inner gray halo
 LM: lentigo maligna
 PAK: pigmented actinic keratosis
 RCM: reflectance confocal microscopy

dermoscopic features described for differential diagnosis of LM with other pigmented freckles of

from the Department of Dermatology, Federal University of São Paulo^a; Cutaneous Oncology Department, A. C. Camargo Cancer Center, São Paulo^b; and Department of Dermatology, University of Modena and Reggio Emilia.^c

Funding sources: None.

Conflicts of interest: None declared.

Accepted for publication May 8, 2014.

Reprint requests: Mauricio M. Nascimento, MD, Cutaneous Oncology Department, AC Camargo Cancer Center, Rua

Professor Antônio Prudente, 211-Liberdade, São Paulo-SP, 01509-010. E-mail: maumennas@gmail.com.

Published online June 17, 2014.

0190-9622/\$36.00

© 2014 by the American Academy of Dermatology, Inc.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2014.05.025>

the face include several parameters, such as asymmetric pigmented follicular openings, dark (brown or black) rhomboidal structures, slate-gray globules and slate-gray dots, hyperpigmented rim of follicular openings, slate-gray streaks and dark streaks, annular-granular pattern, and black blotches.⁷⁻⁹ These features are frequently found on PAK. Only black blotches¹ were specific for LM, but this represents a late parameter rarely present in early lesions.⁹ On the other hand, dermoscopic features described for actinic keratosis, such as neighborhood sign, strawberry sign, and hair follicle openings filled with yellowish keratotic plug and surrounded by a white halo in a targetoid appearance, apply mostly for light PAK,^{2,3} whereas deeply pigmented lesions remain difficult to differentiate from LM.

In our experience, the presence of inner gray halo (IGH), a subtle homogeneous gray or beige halo that surrounds follicular openings (or follicular plugs), forming a sort of “internal ring” to the brown meshes of the pseudonetwork,¹⁰ is frequently seen in PAK.

In this article we sought to explore clinical usefulness of this new feature and to identify its histologic correlate through *in vivo* confocal microscopy and histologic transverse sectioning.¹¹

METHODS

This study was approved by the ethics committees of Federal University of São Paulo—Escola Paulista de Medicina (UNIFESP-EPM) and of A. C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil.

Study population

All lesions excised at the Pigmented Lesions Unit—Dermoscopy Group of the Federal University of São Paulo—Escola Paulista de Medicina (UNIFESP-EPM) during the period of 2003 through 2012, with a histopathologically confirmed diagnosis of LM or PAK and available dermoscopic images, were considered for the study.

Moreover, a series of PAK and LM between 2012 and 2013 were also documented by means of reflectance confocal microscopy (RCM) (A. C. Camargo Cancer Center) before excision and histopathology procedure for transverse sectioning was applied for exact correlate identification.¹¹

Instruments

Dermoscopic images were acquired using $\times 10$ magnification with Dermaphot (Heine Optotechnik, Herrsching, Germany) and a Nikon FM1 reflex camera (Nikon Corp, Tochigi, Japan) or Delta 20 (Heine Optotechnik) mounted on a Nikon Coolpix 4300 digital camera or Nikon J1 digital camera (Nikon Corp).

RCM images were acquired using the near-infrared reflectance confocal laser microscope (Vivascope 1500, Caliber I.D., Rochester, NY). The technique and the acquisition procedure are presented elsewhere. For this specific study, horizontal tissue images, ranging from 4×4 - to 8×8 -mm sections, depending on the size of the analyzed lesion, producing a mosaic image (Vivablock), were acquired for all lesions. The global pattern on dermoscopy was correlated with the

mosaic image at the level of the granular layer, spinous layer, and dermoepidermal junction of the epidermis. Sequentially deeper individual images centering the hair follicle were acquired from the corneal layer to the papillary dermis (Z-axis stack, $1.5\text{-}\mu\text{m}$ steps up to $150\text{ }\mu\text{m}$)¹² and were used for RCM correlation of the IGH parameter.

Routine histopathology and transverse sections

Hematoxylin-eosin slides from all cases were obtained. In selected cases, transverse sections of IGH area were performed to obtain exact correlation with RCM images. Guided by dermoscopy, the site of the IGH was marked with a 4-mm punch during surgery. The punch biopsy specimen was processed for vertical and transverse sections as previously described.¹¹ Fontana-Masson stain and immunohistochemical reactions, including antibodies for cytokeratins A1 and A3, and human melanoma black monoclonal antibody (HMB-45) were performed as necessary for routine dermopathological evaluation.

Parameter evaluation

Dermoscopy. Two dermatologists highly experienced in dermoscopy (S. Y. and G. R.), blinded to histopathological diagnoses, received a brief training on the new feature IGH and were asked to evaluate all the study lesions for the presence or absence of IGH. The observers were also asked to

CAPSULE SUMMARY

- Pigmented actinic keratosis is a common simulator of lentigo maligna, as the 2 lesions share several clinical and dermoscopic features.
- Inner gray halo is a novel dermoscopic feature of pigmented actinic keratosis, with strong histologic and reflectance confocal microscopy correlates.
- Inner gray halo may assist in the differentiation of pigmented actinic keratosis from lentigo maligna.

Table I. Frequencies of dermoscopic findings according to diagnosis of lentigo maligna or pigmented actinic keratosis

Parameter	PAK	LM	P
Asymmetric pigmented follicular openings	15/58 (25.9%)	12/21 (57.1%)	.010
Hyperpigmented rim of follicular openings	7/58 (12.1%)	6/21 (28.6%)	.096
Slate-gray globules and dots	33/58 (56.9%)	14/21 (66.7%)	.435
Annular-granular pattern	26/58 (44.8%)	10/21 (47.6%)	.826
Dark (brown or black) rhomboidal structures	34/58 (58.6%)	15/21 (71.4%)	.300
Black blotches	1/58 (1.7%)	5/21 (23.8%)	.004
Inner gray halo	53/58 (91.4%)	5/21 (23.8%)	<.001

Bold indicates statistical significance.

LM, Lentigo maligna; PAK, pigmented actinic keratosis.

evaluate the presence or absence of the following parameters: asymmetric pigmented follicular openings, dark (brown or black) rhomboidal structures, slate-gray globules and dots, hyperpigmented rim of follicular openings, annular-granular pattern, and black blotches.

Reflectance confocal microscopy. For the lesions imaged with RCM, previously proposed terminology, as summarized in a consensus terminology glossary,¹³ was used.

Histopathology. All lesions were reviewed for histopathologic diagnosis confirmation. Concerning transverse sections, the slides were then evaluated by an experienced dermatopathologist (M. M. S. E.).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using software (SPSS 16.0, IBM Corp, Armonk, NY). Descriptive statistics (absolute and relative frequencies) for all the dermoscopic parameters were tabulated and differences between PAK and LM were calculated by means of χ^2 test. A *P* value inferior to .05 was considered statistically significant. Sensitivity and specificity rates with 95% confidence interval (CI) for each parameter were calculated. Cohen Kappa statistic was used as a measurement of interobserver reproducibility. For IGH, the positive predictive value was calculated.

RESULTS

A total of 79 lesions, belonging to 58 PAK and 21 LM, in 40 men and 39 women, with age ranging from 49 to 96 years (mean age: 67) were collected. All lesions were located on the face, precisely on the upper part of the face (forehead and temples) in 14 cases, on the nose in 26, on the cheek and preauricular area in 31, and on the lower part of the face (mandibular and lips) in 5. Exact anatomic location was not available in 3 cases.

Diagnostic accuracy of IGH

IGH represented the most frequently observed feature (74.7%), detected in 53 of 58 (91.4%) PAK in our series and in 5 of 21 (28.6%) LM (*P* < .001), with a sensitivity of 91.4% (95% CI 81.4%–96.3%) and specificity of 71.4% (95% CI 50.0%–86.2%) statistically significant compared with LM (*P* < .001) and a positive predictive value of 89.8% (95% CI 79.5%–95.3%).

When considering PAK, IGH detection was followed by rhomboidal structures (58.6%) and slate-gray globules and dots (56.9%).

For LM, the most frequent dermoscopic feature was rhomboidal structures (71.4%), followed by slate-gray globules and dots (66.7%) and asymmetric pigmented follicular openings (57.1%) (Table I). Asymmetric pigmented follicular openings and black blotches were statistically significant for LM diagnosis compared with PAK (*P* < .01 and .004, respectively).

Of the 5 LM presenting IGH, all displayed asymmetric pigmented follicular openings, along with other LM characteristic features except blotches in the majority of cases.

The interobserver reproducibility for IGH was excellent (Cohen Kappa 0.846).

RCM and histopathologic correlate of IGH

RCM imaging was performed in a total of 14 cases: 5 LM and 9 PAK. In all PAK cases, in mosaic images, we observed areas of atypical honeycomb at the granular and spinous cell layer. In a detailed evaluation of the hair follicles we detected irregularly shaped keratinocytes mainly located outside the infundibulum, which was itself constituted of apparently regular and monomorphous cells. Numerous dendritic cells were observed in the epidermis in the area between hair follicles, but not infiltrating the infundibulum. Exploring the hair follicle infundibulum in depth (from the corneal layer to 80 μ m), in correspondence

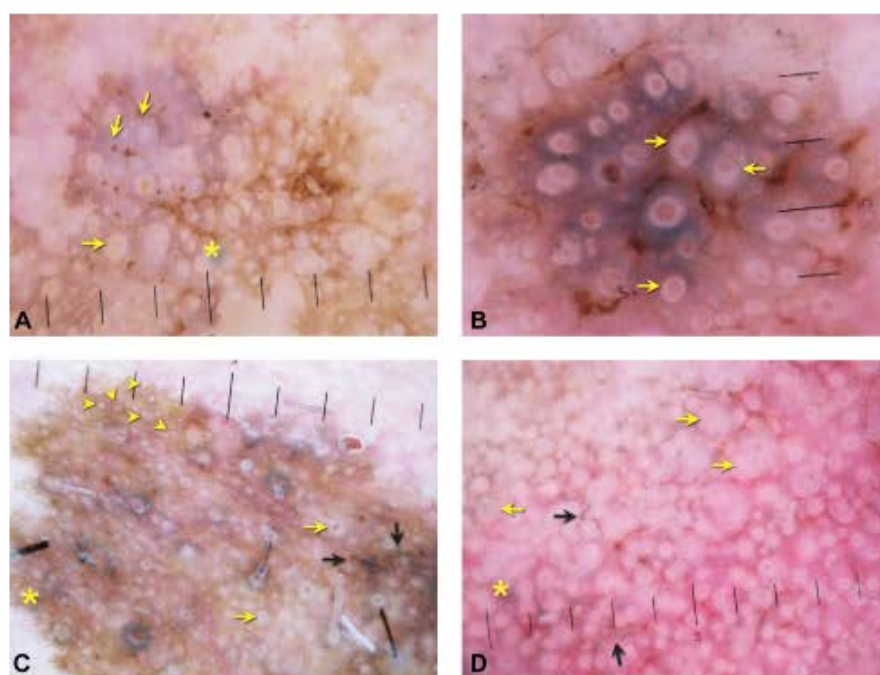


Fig 1. Pigmented actinic keratoses (PAK) and lentigo maligna (LM). Dermoscopic aspects. **A**, PAK showing rhomboidal structures (*asterisk*) and inner gray halo (IGH) (*yellow arrows*). **B**, PAK with IGH. **C**, LM depicting IGH, rhomboidal structures, asymmetric pigmented follicular openings (*arrowheads*), and annular-granular pattern (*black arrows*). **D**, PAK showing rhomboidal structures, IGH, and annular-granular pattern.

of the IGH, it was possible to constantly detect a ring of pigmented keratinocytes surrounding the hair follicles.

In LM atypical dendritic cells were observed both within the hair follicle epidermis and in the intervening space between hair follicle openings. In all 5 cases also roundish pagetoid and atypical cells were detected, along with nests constituted by pleomorphic melanocytes mainly protruding from the follicular structures.

We performed transverse sectioning of 6 cases of PAK to correlate the IGH with RCM. Whereas the brown pseudonetwork surrounding the IGH seen on dermoscopy showed numerous melanocytes, corresponding to the bright dendritic cells on RCM, the hair follicles showed pigmented keratinocytes in the basal layer and no or few large dendritic melanocytes. Thus, the pigmentation of the basilar keratinocytes surrounding the hair follicle seems to be responsible for the appearance of the IGH (Tyndall effect).

DISCUSSION

The proposed dermoscopic diagnostic features for LM improved diagnostic accuracy.^{9,14} However,

PAK remains one of the most difficult to diagnose entities for the dermatologist, because it shares several clinical and dermoscopic features with LM (Fig 1, A, B, and D).¹

In this article we described a new dermoscopic parameter, named “inner gray halo” and tested its diagnostic value in a subset of difficult lesions (PAK and LM) on the face. This feature corresponds to a homogeneous gray-bluish or beige circular structure surrounding hair follicles and forming the internal contour of the brown meshes of the pigment pseudonetwork, so that the “holes” of the PAK pseudonetwork seem broader than those of the LM pseudonetwork (Fig 1).¹⁰ It differs from the previously described features for PAK of keratotic plug or yellow plug,^{3,14} because these features refer to the keratotic filling inside the follicular openings, whereas the IGH is a grayish hue, which surrounds this follicular openings (Fig 2, A, B, and D). It is distinguishable from the annular-granular pattern because the latter is constituted by small gray blotches or dots irregularly distributed around the hair follicles (Fig 1, D), and from the rhomboidal structures, which constitute a full-thickness gray-blue pseudonetwork (Fig 1, A and D).

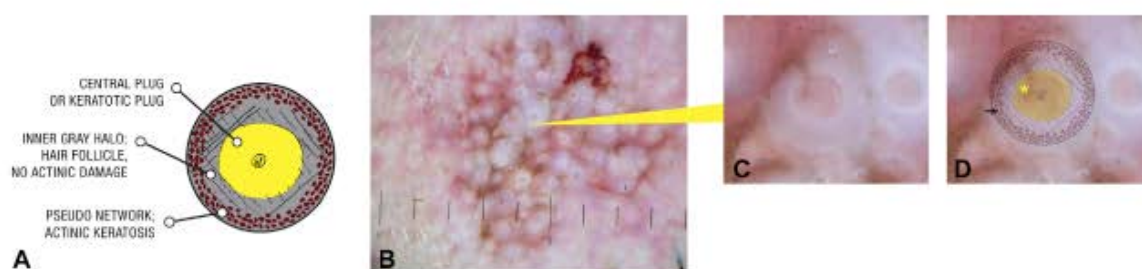


Fig 2. Pigmented actinic keratosis (PAK). Dermoscopic image and schematic drawing of inner gray halo (IGH). **A**, Transverse (en face) drawing section of IGH: keratotic plug seen on dermoscopy (yellow); pseudonetwork (brown) and IGH (batched gray). **B**, Dermoscopic image of PAK, showing multiple IGH. **C**, Magnified dermoscopic detail of IGH. **D**, Magnified image of IGH with superimposed matching IGH drawing, showing keratotic plug (yellow asterisk), IGH, and pseudonetwork (black arrow).

The IGH was seen in the large majority of PAK, shown to be a sensitive and reproducible (Kappa value 0.846) parameter for its diagnosis, although observed also in 5 of 21 LM. In our series, all LM showing IGH also presented LM characteristic features, such as rhomboidal structures, asymmetric pigmented follicular openings, and annular-granular pattern, thus leading to the correct diagnosis (Fig 1, C).

In our attempt to find the histopathologic correlate of this new feature, we studied some selected cases with RCM and performed transverse sections of selected areas. We found that the histologic equivalent of this new feature is the inverted cone of "spared" (orthokeratotic nonanaplastic) epidermis, which tends to spread around the follicular openings on the surface of the epidermis, in an umbrella-like pattern, seen in actinic keratosis (Fig 3, A), as originally described by Pinkus.¹⁵ According to that author, this pattern resembles the islands of re-epithelization starting around the follicles during the wound-healing process. The adnexal epithelium is spared from the anaplastic changes present in the surrounding epidermis of actinic keratosis, thus preventing the area surrounding the follicle from being hyperpigmented. The grayish hue seems to be justified by the Tyndall effect of hypermelanotic keratinocytes located in the basal layer of the anaplastic epidermis, which spreads underneath the "umbrella" of normal epidermis in the follicles, as demonstrated by the presence of a ring of pigmented/bright basilar keratinocytes visible in histopathology and RCM, respectively (Figs 3 and 4).

RCM parameters previously described for actinic keratosis¹⁶ have been recently integrated by the presence of bright nucleated cells in the epidermis

characteristic for PAK.¹⁷ In all our PAK, RCM images showed the atypical honeycomb pattern and the dendritic cells sparing the area surrounding the follicular openings, pursuant to the findings in histology (Fig 4, C). This different epidermal pattern resulted at deeper stage into a ring of pigmented keratinocytes surrounding the regular honeycombed epidermis funneling into the follicular opening. This deeper line of pigmented basal keratinocytes (appearing as a ring of small polygonal cells) that follow the follicle profile was the obvious correlate with the IGH (Fig 3, B and C, and Fig 4, C and D).

Concerning the 5 LM showing IGH (Fig 1, C), after reviewing their histopathology, we can speculate that in these cases there is a concomitance of thickened epidermis around hair follicles with a pattern similar to actinic keratosis because of the coexistent sun damage. This perifollicular epidermal thickening may be responsible for the Tyndall effect gray appearance of the pigmented malignant melanocytes proliferating within hair follicle epithelium.

In summary, we describe a novel dermoscopic parameter for PAK diagnosis, named "inner gray halo." Although this new parameter's sensitivity and specificity in this test set was good, a single dermoscopic criterion should not be used to establish a diagnosis.¹⁸ A larger test set is needed to validate the potential use of this feature for differential diagnosis and its relative value when in combination with other dermoscopic parameters, also including other pigmented lesions of the face as LM differential diagnoses. However, the strong histopathologic and confocal correlates of a PAK-specific characteristic corroborate the interest of this feature in the dermoscopic panorama.

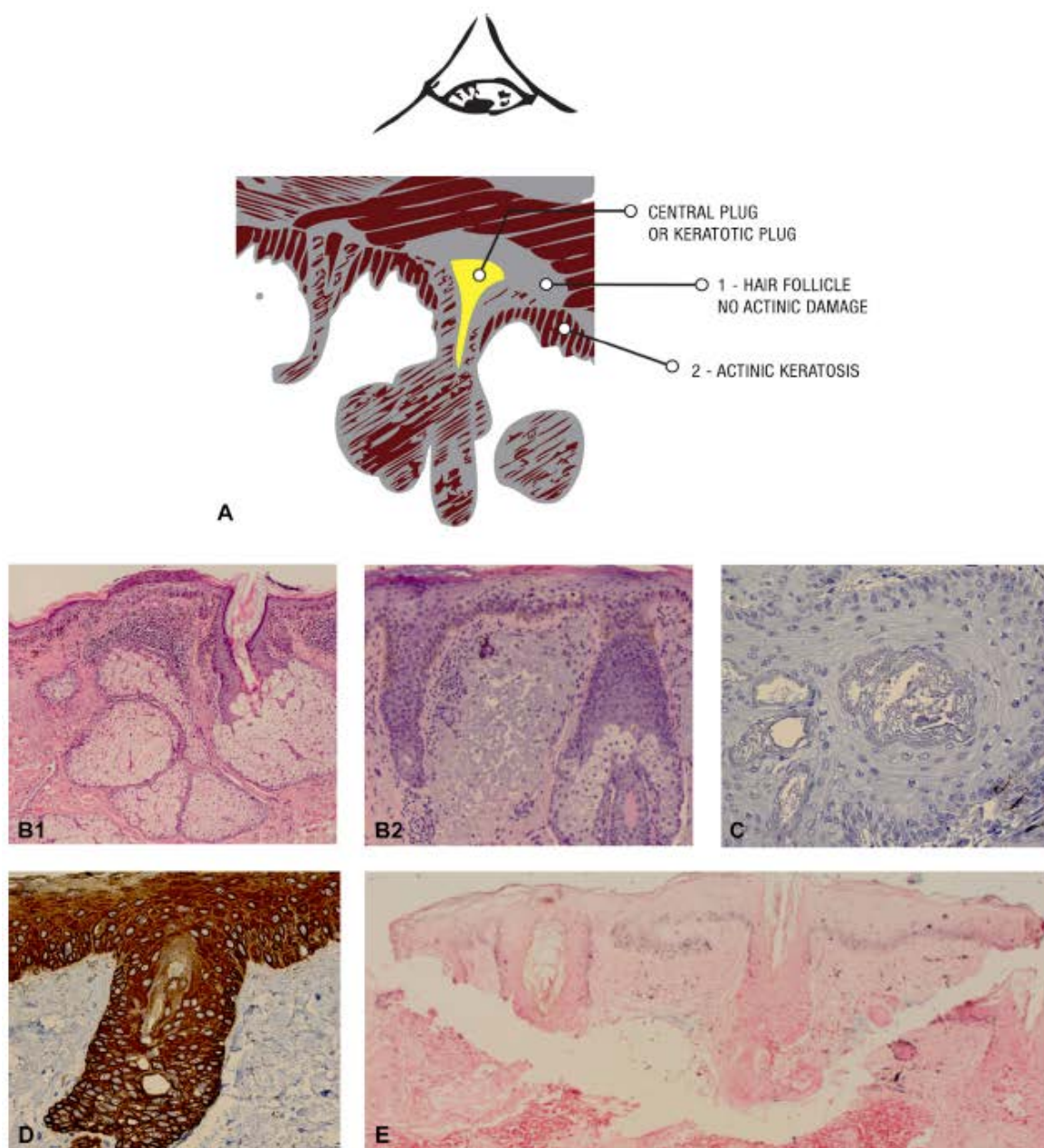


Fig 3. Pigmented actinic keratosis (PAK). Dermoscopic-histologic correlation of inner gray halo (IGH). **A**, Schematic drawing of PAK. Dermoscopic feature keratotic plug (yellow). Inverted cone of spared epidermis around the follicle (gray), which is the histologic counterpart of IGH; and pigmented anaplastic epidermis (actinic keratosis) (brown), which is the histologic correspondent of the pseudonetwork (adapted from Pinkus,¹⁵ © 1958 American Society of Clinical Pathologists). **B1** and **B2**, Histologic demonstration of actinic damage sparing the umbrella-shaped follicular area of the same follicle shown in Fig 4, A-D. **C**, Transverse section showing no immunoreactivity. **D**, Immunohistochemistry AE1/AE3. **E**, Perpendicular section showing melanin increase in basal keratinocytes spreading underneath the umbrella-shaped follicular area. (**B1** and **B2**, Hematoxylin-eosin stain; **C**, immunohistochemistry HMB-45; **D**, immunohistochemistry AE1/AE3; **E**, Fontana-Masson stain; **B-E**, original magnifications: **B-D**, $\times 100$; **E**, $\times 40$.)

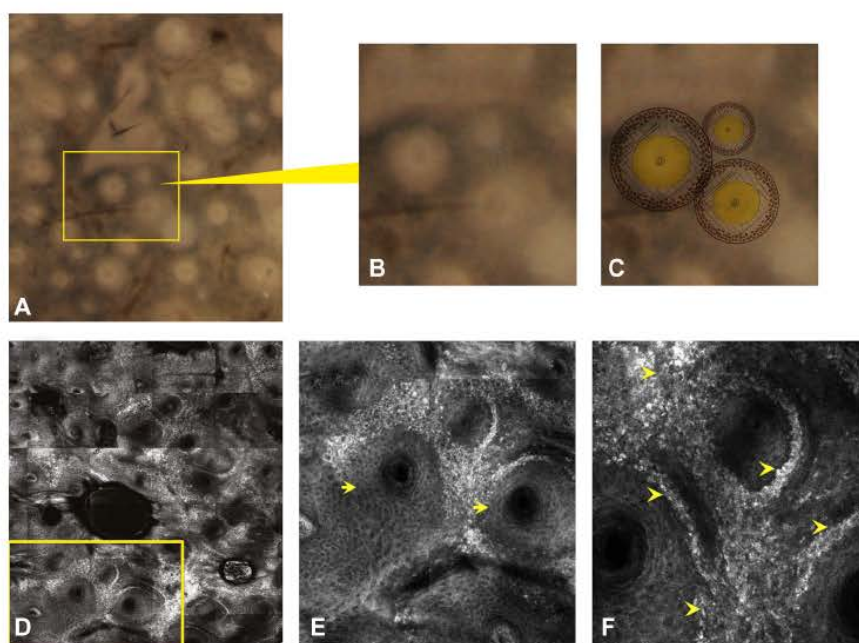


Fig 4. Pigmented actinic keratosis. Equivalent en face reflectance confocal microscopy (RCM) image of inner gray halo (IGH). **A**, Dermoscopic image of the lesion showing IGH (*yellow square*). **B**, Magnified dermoscopic detail of IGH. **C**, Magnified image of IGH with superimposed matching IGH drawing. **D**, RCM mosaic image, with selected area (*yellow square*) for step-sectioning images. **E**, Step image showing RCM counterpart of IGH: ring of normal honeycomb around the follicular area (*yellow arrows*) surrounded by disarranged bright keratinocytes. **F**, Deeper RCM step image of the same area at spinous-dermoepidermal junction layer level showing honeycomb disarrangement and ring of small polygonal bright cells surrounding the area of normal honeycomb around the follicles, following the follicular profile (*yellow arrowheads*), corresponding to the hyperpigmented basal keratinocytes seen on histology, which are responsible for the Tyndall effect seen on dermoscopy of IGH.

REFERENCES

1. Akay BN, Kocyigit P, Heper AO, Erdem C. Dermatoscopy of flat pigmented facial lesions: diagnostic challenge between pigmented actinic keratosis and lentigo maligna. *Br J Dermatol* 2010;163:1212-7.
2. Goncharova Y, Attia EA, Souid K, Vasilenko IV. Dermoscopic features of facial pigmented skin lesions. *ISRN Dermatol* 2013; 2013:546813.
3. Zalaudek I, Ferrara G, Leinweber B, Mercogliano A, D'Ambrosio A, Argenziano G. Pitfalls in the clinical and dermoscopic diagnosis of pigmented actinic keratosis. *J Am Acad Dermatol* 2005;53:1071-4.
4. Stolz W, Schiffner R, Burgdorf WH. Dermatoscopy for facial pigmented skin lesions. *Clin Dermatol* 2002;20:276-8.
5. Feldman SR, Fleischer AB Jr, Williford PM, Jorizzo JL. Destructive procedures are the standard of care for treatment of actinic keratoses. *J Am Acad Dermatol* 1999;40:43-7.
6. Dinehart SM. The treatment of actinic keratoses. *J Am Acad Dermatol* 2000;42:25-8.
7. Stante M, Giorgi V, Stanganelli I, Alfaioli B, Carli P. Dermoscopy for early detection of facial lentigo maligna. *Br J Dermatol* 2005;152:361-4.
8. Cognetta AB Jr, Stolz W, Katz B, Tullos J, Gossain S. Dermatoscopy of lentigo maligna. *Dermatol Clin* 2001;19: 307-18.
9. Schiffner R, Schiffner-Rohe J, Vogt T, Landthaler M, Wlotzke U, Cognetta AB, et al. Improvement of early recognition of lentigo maligna using dermoscopy. *J Am Acad Dermatol* 2000;42:25-32.
10. Nascimento MM, Yamada S, Almeida F. New dermoscopic features for the diagnosis of pigmented actinic keratosis. *Dermatology* 2006;212:290.
11. Rezza GG, Scramim AP, Neves RI, Landman G. Structural correlations between dermoscopic features of cutaneous melanomas and histopathology using transverse sections. *Am J Dermatopathol* 2006;28:13-20.
12. 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* 2007;143:176-85.
13. Scope A, Benvenuto-Andrade C, Agero AL, Malvehy J, Puig S, Rajadhyaksha M, et al. In vivo reflectance confocal microscopy imaging of melanocytic skin lesions: consensus terminology glossary and illustrative images. *J Am Acad Dermatol* 2007;57: 644-58.
14. Pralong P, Bathelier E, Dalle S, Poulalhon N, Debarbieux S, Thomas L. Dermoscopy of lentigo maligna melanoma: report of 125 cases. *Br J Dermatol* 2012;167:280-7.
15. Pinkus H. Keratosis senilis; a biologic concept of its pathogenesis and diagnosis based on the study of normal

4.1.2 Aplicabilidade do método de abordagem folicular

Blumetti TP, Scope A, de Macedo MP, Ferreira JB, Gomes EE, Enokihara MY, Pinto CA, Nascimento MM, Rezze GG, Braga JC. Dermoscopic and Reflectance Confocal Microscopy Findings in Extra-genital HPV16-associated Pigmented Squamous Cell Carcinoma in situ. **Acta Derm Venereol** 2016 Aug 23; 96(6):836-7. doi:10.2340/00015555-2399. PMID: 26976508.

SHORT COMMUNICATION

Dermoscopic and Reflectance Confocal Microscopy Findings in Extra-genital HPV16-associated Pigmented Squamous Cell Carcinoma *in situ*

Tatiana P. Blumetti¹, Alon Scope², Mariana P. de Macedo³, Juliana B. Ferreira¹, Elimar E. Gomes¹, Mauro Y. Enokihara⁴, Clovis A. Lopes Pinto³, Mauricio M. Nascimento^{1,4}, Gisele G. Rezze¹ and Juliana C. Braga¹

¹Cutaneous Oncology Department and ²Pathology Department, AC Camargo Cancer Center, Rua Professor Antonio Prudente, 211, São Paulo, Brazil,

³Department of Dermatology, Sheba Medical Center and Sackler School of Medicine, Tel Aviv University, Tel Aviv, Israel, and ⁴Dermatology Department, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil. E-mail: tatianadermato@gmail.com

Accepted Mar 7, 2016; Epub ahead of print Mar 15, 2016

Squamous cell carcinoma *in situ* (SCCIS) affecting the ano-genital area (also termed Bowenoid papulosis, BP) is mostly associated with high-risk strains of human papilloma virus (HPV) (1). Isolated HPV-associated SCCIS in the extra-genital area, without concomitant genital HPV infection, has been reported infrequently (2); such cases may present as pigmented papules or plaques, which may be difficult to differentiate from melanoma.

We describe here the clinical and dermoscopic features of isolated HPV-associated pigmented SCCIS (termed extra-genital BP) in a small case series. We also describe the findings of reflectance confocal microscopy (RCM), a bedside imaging technique that is useful for differentiating keratinocytic from melanocytic neoplasms. We use histopathology and immunohistochemistry (IHC) to elucidate the tissue correlates of the RCM findings. Finally, we compare the dermoscopic and RCM findings of the present series with those observed in 2 cases of classic genital BP.

CASE REPORTS

Five pigmented plaques and papules, from 5 patients, presented clinical features that raised suspicion for the diagnosis of melanoma (Table S1¹); one lesion was located in the inguinal area, while 4 lesions were distant from the ano-genital region. On dermoscopy, the lesions presented a mostly-structureless pattern with multiple colours, including brown, grey-blue and black, distributed in asymmetrical fashion; dermoscopic structures included irregularly distributed brown-to-grey dots, radial lines and, at times, scales (Fig. S1¹).

All 5 lesions underwent RCM imaging prior to excisional biopsy (Fig. S1¹). On RCM, all lesions showed surface scale, bright dendritic cells and an irregular and disarranged honeycomb pattern at the spinous-granular layers of the epidermis. Keratinocyte atypia was represented by significant irregularity in size and shape of the cells. In the dermo-epidermal junction (DEJ), a ringed pattern composed of small closely-set edged papillae was seen. In the superficial dermis, plump-bright cells and small bright dots were observed; increased blood flow was also notable on real-time video-mode imaging. The RCM findings were suggestive of pigmented SCCIS.

All lesions underwent excisional biopsy. Specimens were submitted for histopathological analysis and all were initially diagnosed as pigmented SCCIS. Haematoxylin and eosin

(H&E) stained specimens revealed an epithelial neoplasm characterized by loss of the normal epidermal maturation pattern with numerous atypical keratinocytes displaying large nuclei and perinuclear halos (i.e. features of koilocytes); these cytological findings raised the possibility of HPV-related SCCIS (Fig. S2A¹). Numerous atypical mitoses were observed in the upper epidermis, as well as frequent dyskeratotic cells. There was diffuse epidermal hyperpigmentation notable in basal keratinocytes and in dendritic extensions, with melanin spanning the extent of the epidermis up to the stratum corneum. Numerous melanophages could be seen in the papillary dermis. IHC staining for Melan-A and CD1a was performed. CD1a stain revealed increased number of Langerhans cells (Fig. S2D¹), while Melan-A immune-staining showed only normal-appearing basal melanocytes (Fig. S2C¹). Finally, linear array HPV-genotyping test was positive for HPV-16 (Fig. S2B¹) in all cases, establishing the final diagnosis of extra-genital BP. Notably, none of the patients harboured genital lesions, had history of sexually transmitted diseases, or presented with immunosuppressive disease.

In 2 separate cases of classic genital BP, we observed multiple verrucous brown papules and plaques without a surface scale, distributed in the genital area (dorsum of penis). On dermoscopy, the lesions showed a homogenous pattern, brown-to-grey in colour. On RCM, the structures observed were very similar to the ones found in the extra-genital cases; namely, dendritic cells at the suprabasal epidermis, small ringed papillae at the DEJ and plump-bright cells in the dermis.

DISCUSSION

SCCIS in extra-genital location is mostly related to chronic sun exposure (3). It usually presents as an erythematous, scaly patch. Pigmented SCCIS is found at a lower frequency; Cameron et al. (4) found the pigmented variant in only 5.5% of 951 histopathologically verified cases. Interestingly, the pigmented cases were located in anatomical areas known to be associated with HPV, such as the ano-genital and periungual regions. Outside these regions, finding mucosal high-risk strains of HPV in SCCIS is uncommon (5, 6). Zheng et al. (5) studied 41 patients with extra-genital Bowen's disease and found HPV 16 and 33 in only 7% of cases; the HPV positive cases were coincident with lesions near to the genital area (e.g. lower abdomen and buttock). In contrast to the cases described by the authors above, 4 of our 5 cases presented clinically as verrucous, pigmented, non-scaly lesions located far from the genital

¹<http://www.medicaljournals.se/acta/content/?doi=10.2340/00015555-2399>

area. These patients had dark skin phototype and no clinical signs of chronic photo-damage or significant risk factors for developing skin cancer.

Pigmented SCCIS is a known melanoma-mimic, both clinically and dermoscopically (7–10). RCM can be useful in establishing the specific bedside diagnosis of pigmented SCCIS and pigmented actinic keratosis in its various degrees of atypia (11). In the present case series, the RCM features of atypical and sometimes disarranged honeycomb pattern at the spinous-granular layers and small closely-set rings of bright basal cells around the dermal papillae were indeed commensurate with the diagnosis of pigmented SCCIS (12). Of note, RCM showed the presence of numerous bright dendritic cells in the supra-basal epidermis; using IHC staining for CD1A and Melan-A, these dendritic cells proved to be Langerhans cells and not melanocytes in Pagetoid spread (13). Similarly, Moscarella et al. (14) described intraepidermal proliferation of Langerhans cells in pigmented actinic keratosis, represented by dendritic cells seen on RCM.

In addition, the density and cyto-morphology of melanocytes in this series appeared normal. For this reason, we assume that the abundance of melanin within the epidermis is probably due to activation of melanocytes, which can be observed through RCM in pigmented actinic keratosis, resulting in small bright polygonal keratinocytes surrounding the follicular opening (15).

While the cases included in the present study presented very similar RCM features to those observed in 2 cases of classic genital BP, we could not visualize RCM structures suggestive of koilocytes in either the classic and extra-genital BP. Thus, the suspicion of HPV-associated neoplasms relied on the cytological findings of koilocytes on histopathology; indeed, this association was confirmed by the finding of HPV-16 on DNA linear array testing.

In summary, RCM may help to distinguish pigmented SCCIS from melanoma. However, clear visualization of the entire DEJ with its typical characteristics of epidermal hyperplasia (small closely-set rings of bright basal cells around at the dermal papillae) is mandatory in all cases in order to rule out a melanoma.

ACKNOWLEDGEMENT

The study was approved by the Institutional Review Board of the institution (CEP – Comitê de Ética em Pesquisa, AC Camargo Cancer Center) in February, 2011. Registration number: 1524/11.

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Sudenga SL, Ingles DJ, Pierce Campbell CM, Lin HY, Fulp WJ, Messina JL, et al. Genital human papillomavirus infection progression to external genital lesions: the HIM study. *Eur Urol* 2016; 69: 166–173.
2. Lee HJ, Shin DH, Choi JS, Kim KH. A Case of isolated bowenoid papulosis of the nipple. *Ann Dermatol* 2014; 26: 381–384.
3. Mitsuishi T, Nakatake M, Kaneko T, Ohara K, Kato T, Iida K, et al. Evaluation of telomerase activity in non-genital Bowen's disease. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2009; 23: 668–672.
4. Cameron A, Rosendahl C, Tschandl P, Riedl E, Kittler H. Dermatoscopy of pigmented Bowen's disease. *J Am Acad Dermatol* 2010; 62: 597–604.
5. Zheng S, Adachi A, Shimizu M, Shibata S-I, Yasue S, Sakakibara A, et al. Human papillomaviruses of the mucosal type are present in some cases of extragenital Bowen's disease. *Br J Dermatol* 2005; 152: 1243–1247.
6. Shim WH, Park HJ, Kim HS, Kim SH, Jung DS, Ko HC, et al. Bowenoid papulosis of the vulva and subsequent periungual Bowen's disease induced by the same mucosal HPVs. *Ann Dermatol* 2011; 23: 493–496.
7. Inoue T, Kobayashi K, Sawada M, Ishizaki S, Ito H, Fujibayashi M, Tanaka M. dermoscopic features of pigmented Bowen's disease in a Japanese female mimicking malignant melanoma. *Dermatol Res Pract* 2010; 2010. pii: 543091.
8. Gutiérrez-Mendoza D, Narro-Llorente R, Karam-Orantes M, Fonte-Avalos V, Martínez-Luna E, Toussaint-Caire S, Domínguez-Cherit J. Dermoscopy clues in pigmented Bowen's disease. *Dermatol Res Pract* 2010; 2010. pii: 464821.
9. Chung E, Marchetti MA, Pulitzer MP, Marghoob AA. Streaks in pigmented squamous cell carcinoma in situ. *J Am Acad Dermatol* 2015; 72: 64–65.
10. Marcucci C, Sabban EC, Friedman P, Peralta R, Calb I, Cabo H. Dermoscopic findings in bowenoid papulosis: report of two cases. *Dermatol Pract Concept* 2014; 31: 61–63.
11. Pellacani G, Ulrich M, Casari A, Prow TW, Cannillo F, Benati E, et al. Grading keratinocyte atypia in actinic keratosis: a correlation of reflectance confocal microscopy and histopathology. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2015; 29: 2216–2221.
12. González S, Sánchez V, González-Rodríguez A, Parrado C, Ullrich M. Confocal microscopy patterns in nonmelanoma skin cancer and clinical applications. *Actas Dermosifiliogr* 2014; 105: 446–458.
13. Hashemi P, Pulitzer MP, Scope A, Kovalyshyn I, Halpern AC, Marghoob AA. Langerhans cells and melanocytes share similar morphologic features under in vivo reflectance confocal microscopy: a challenge for melanoma diagnosis. *J Am Acad Dermatol* 2012; 66: 452–462.
14. Moscarella E, Rabinovitz H, Zalaudek I, Piana S, Stanganelli I, Oliviero MC, et al. Dermoscopy and reflectance confocal microscopy of pigmented actinic keratoses: a morphological study. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2015; 29: 307–314.
15. Nascimento MM, Shitara D, Enokihara MMSS, Yamada S, Pellacani G, Rezza GG. Inner gray halo, a novel dermoscopic feature for the diagnosis of pigmented actinic keratosis: clues for the differential diagnosis with lentigo maligna. *J Am Acad Dermatol* 2014; 71: 708–715.

Supplementary material to article by T. C. M. Pinto Blumetti et al. "Dermoscopic and Reflectance Confocal Microscopy Findings in Extra-genital HPV16-associated Pigmented Squamous Cell Carcinoma in situ"

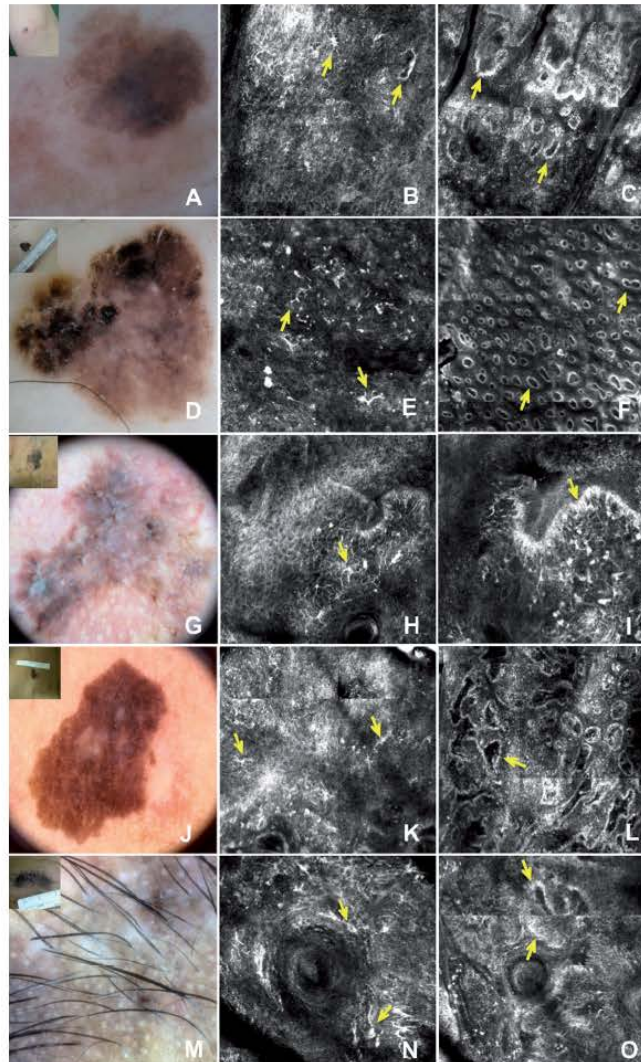


Fig. S1. Clinical (*insets*), dermoscopy and confocal images from 5 cases. (A–C) Case 1 – upper arm. (A) Dermoscopy: irregularly distributed brown dots/globules and grey-to-brown asymmetrical pigmentation. (B) Individual reflectance confocal microscopy (RCM) image (0.5×0.5 mm): dendritic cells at the level of spinous-granular layer (*arrows*). (C) RCM mosaic image (1.5×1.5 mm) in the dermo-epidermal junction (DEJ): bright atypical keratinocytes surrounding polycyclic papillae (*arrows*). (D–F) Case 2 – inguinal area. (D) Dermoscopy: irregularly distributed brown dots/globules, grey-to-brown asymmetrical pigmentation, peripheral irregular streaks and scale. (E) Individual RCM image (0.5×0.5 mm): numerous dendritic cells at the level of spinous-granular layer (*arrows*). (F) RCM mosaic image (1.5×1.5 mm) on DEJ: multiple small bright-edged papillae (*arrows*) and vessels within superficial dermis. (G–I) Case 3 – cheek. (G) Dermoscopy: annular-granular pattern, grey-to-brown asymmetrical pigmentation, peripheral irregular streaks and scale. (H) Individual RCM image (0.5×0.5 mm): dendritic cells at the level of spinous layer (*arrows*). (I) Individual RCM image (0.5×0.5 mm) on DEJ: bright atypical keratinocytes surrounding polycyclic papillae (*arrows*). (J, K and L) Case 4 – cervical area. (J) Dermoscopy: irregularly distributed brown globules and grey-to-brown asymmetrical pigmentation. (K) Individual RCM image (0.5×0.5 mm): dendritic cells at the level of spinous-granular layer (*arrows*). (L) RCM mosaic image (1.0×1.0 mm) at the DEJ: bright atypical keratinocytes surrounding polycyclic papillae (*arrows*). (M, N and O) Case 5 – eyebrow. (M) Dermoscopy: grey-to-brown asymmetrical pigmentation. (N) Individual RCM image (0.5×0.5 mm): dendritic cells around the follicle at the level of spinous layer (*arrows*). (O) RCM mosaic image (0.75×0.75 mm) at the DEJ: bright atypical keratinocytes surrounding polycyclic papillae (*arrows*).

Supplementary material to article by T. C. M. Pinto Blumetti et al. "Dermoscopic and Reflectance Confocal Microscopy Findings in Extra-genital HPV16-associated Pigmented Squamous Cell Carcinoma in situ"

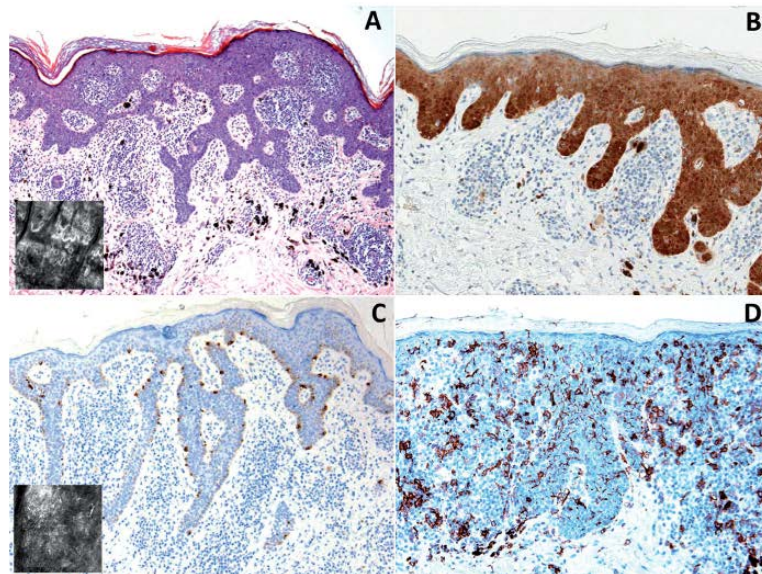


Fig. S2. Histopathology and immunohistochemistry sections from Case 1. (A) Haematoxylin and eosin (H&E). Papillomatous proliferation with atypical keratinocytes occupying the entire thickness of the epidermis. *Inset:* confocal image at the dermo-epidermal junction (DEJ) revealing bright atypical keratinocytes surrounding the papillae. (B) p16 showing strong and diffuse immunoeexpression. (C) Melan-A exhibiting normal population of melanocytes, in contrast to what is seen in confocal microscopy (*inset*), where the epidermis is showing a large population of dendritic cells. (D) CD1a revealing an increased number of Langerhans cells. (Original magnification $\times 100$).

5 DISCUSSÃO

A queratose actínica pigmentada da face constitui um desafio diagnóstico, tanto clínico como dermatoscópico, sendo com frequência diagnosticada erroneamente como lentigo maligno, levando a biópsias desnecessárias em uma área cosmeticamente sensível. A conduta terapêutica no LM é excisão cirúrgica, enquanto a QAP pode ser abordada com métodos menos invasivos e excelentes resultados estéticos. Os parâmetros classicamente descritos para o diagnóstico de LM da face, foram encontrados com frequência nas QAPs do presente estudo, corroborando dados de literatura (STOLZ et al. 2002; AKAY et al. 2010, GONCHAROVA et al. 2013).

AKAY et al. (2010) já havia mencionado que dos achados dermatoscópicos para lentigo maligno foram encontrados nas queratoses actínicas pigmentadas, com exceção do *black blotch*. Dos parâmetros estudados no presente estudo apenas aberturas foliculares assimetricamente pigmentadas (AFAP) e halo interno cinza (HIC) foram significativos para diferenciar respectivamente lentigos malignos e queratoses actínicas pigmentadas. Esse achado não invalida os algoritmos diagnósticos que incluem pontos e glóbulos cinza e estruturas romboidais para suspeição de lentigo maligno, mas corrobora os achados de AKAY et al. (2010) de que os outros parâmetros dermatoscópicos também seriam encontrados nas queratoses actínicas pigmentadas. O correspondente

histopatológico dos pontos e glóbulos cinza-ardósia vistos à dermatoscopia, são macrófagos carregados de melanina na derme, de maneira que não são achados específicos de LM, podendo ser encontrados nas QAPs. Idem ibidem as estrias e as estruturas romboidais, vistas à dermatoscopia, que correspondem a junções de pontos e junções de estrias, respectivamente.

Deste modo, AFAP e IGH traduziram o comportamento do pigmento no folículo à dermatoscopia, como já descritos por NASCIMENTO (2006). Não havia contudo um instrumento de análise de imagem que diferenciasses estes dois achados dermatoscópicos. O processamento histológico convencional nem sempre permite localizar o folículo estudado no plano dermatoscópico e os melanócitos atípicos e queratinócitos pigmentados vistos ao microscópio dependem do plano de corte do funil do folículo para avaliar o seu comportamento relacionado à dermatoscopia. A MC com cortes finos centrada no folículo no plano *en-face* (passo de 1,5 μm , 150 μm de profundidade) foi proposta para este estudo durante a execução dos primeiros casos e se mostrou uma boa forma de captação de imagem porque a estrutura em cálice do folículo tem ângulo agudo e se fossem utilizadas variações de profundidade convencionais no stack (passo de 5,2 μm , 150 μm de profundidade) haveria descontinuidade das células brilhantes, como se estivessem dando saltos em direção ao centro do folículo.

Nos LM, os melanócitos atípicos brilhantes eram observados tanto no epitélio interfolicular, como intrafolicular, invadindo o epitélio normal do folículo por dentro da estrutura de cálice (**Figuras 5,6,7 e 8**), corroborando

achados de GUITERA et al. (2010) de que a localização folicular das células juncionais atípicas corresponde às aberturas foliculares assimetricamente pigmentadas, sendo este um dos critérios definidos por estes autores para diagnóstico confocal de LM.

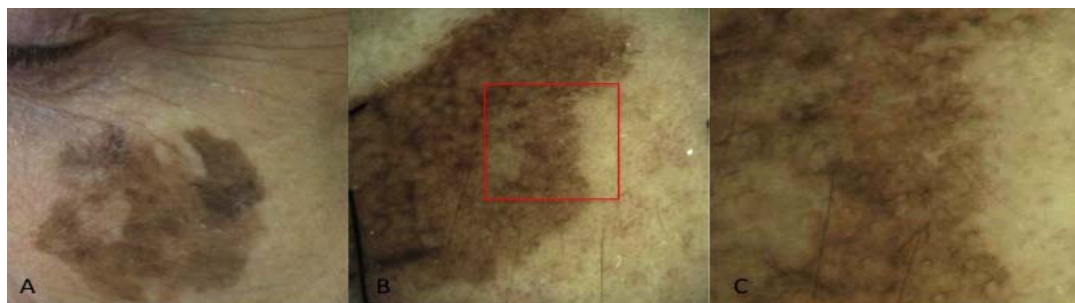


Figura 5 - Lentigo maligno. A foto clínica. B e C Imagem dermatoscópica. A imagem em vermelho corresponde à area selecionada para MC, na borda de progressão da doença. Presença de AFAP.

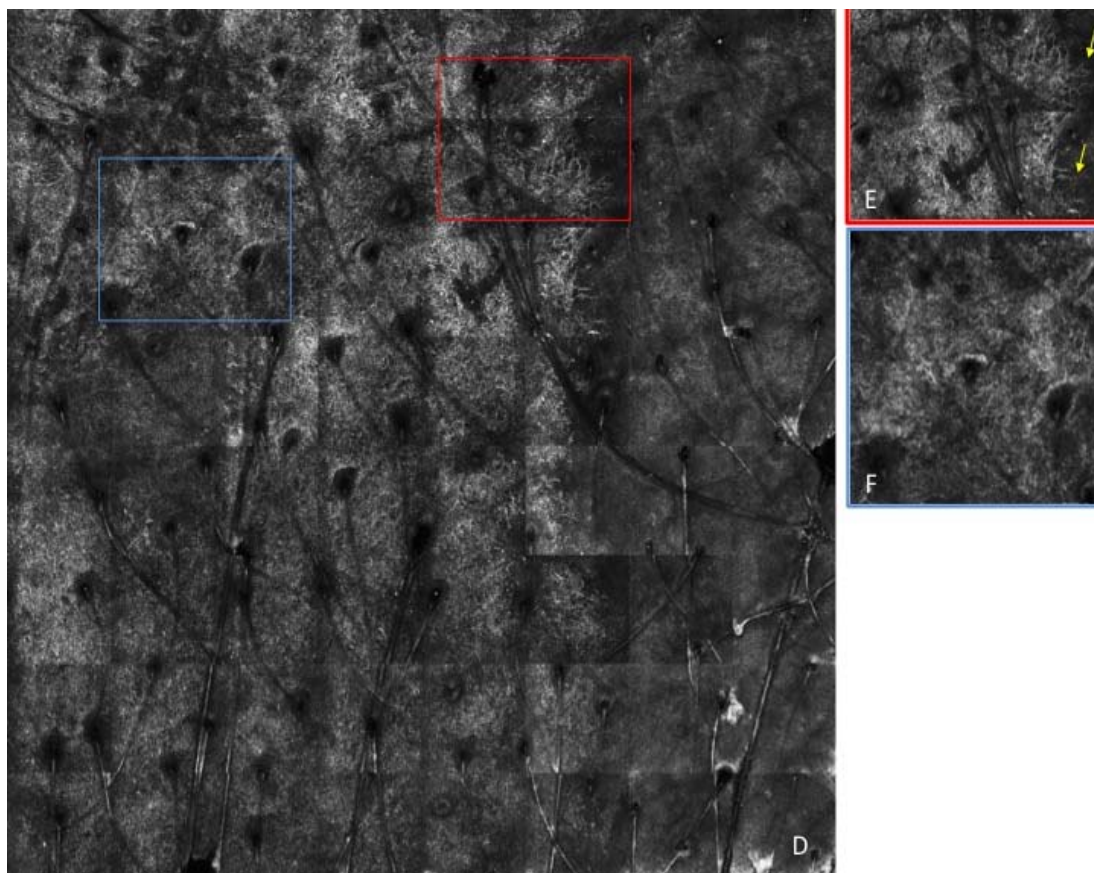


Figura 6 - Imagem à MC do Lentigo Maligno observado na figura 5; Vivablock superficial na epiderme. E e F correspondem à ampliações dos quadrados vermelho e azul respectivamente em D. Observam-se células dendríticas correspondentes à melanócitos. O terço direito da figura D mostra pele normal sendo invadida pelo LM.

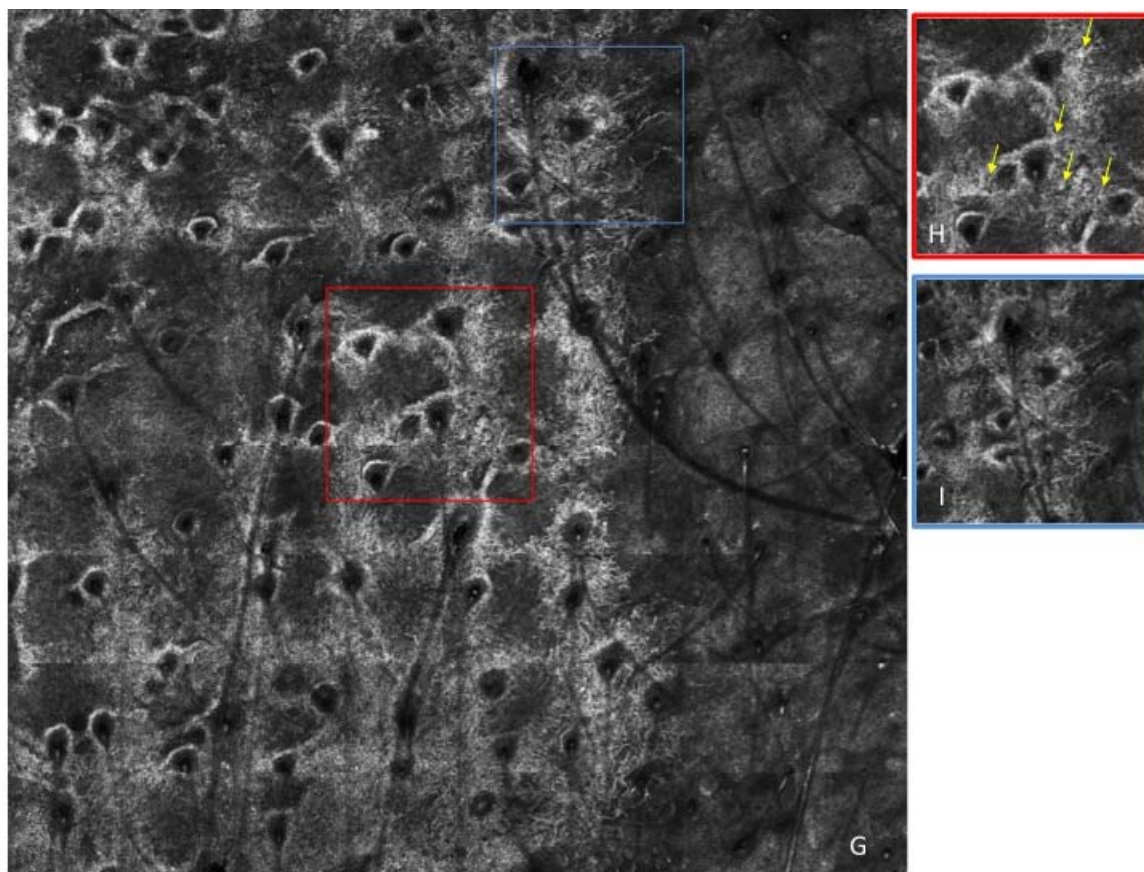


Figura 7 - Imagem à MC do Lentigo Maligno observado na figura 5; Vivablock na junção dermo-epidérmica. Os folículos encontram-se comprometidos pelas células atípicas dendríticas (área em vermelho). As células dendríticas são longas e numerosas progredindo para a área de pele normal (área em azul).

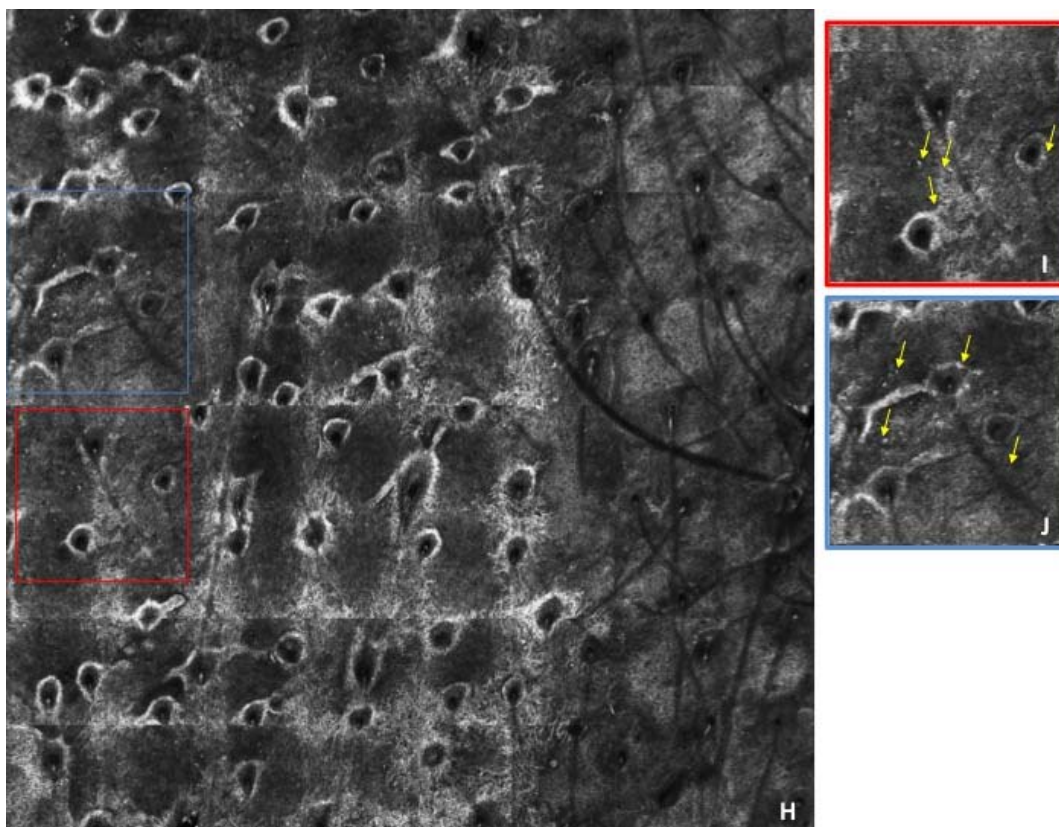


Figura 8 - Imagem à MC do Lentigo Maligno observado na figura 5; Vivablock na junção dermo-epidérmica-derme. Células atípicas foliculares e interfoliculares (área em vermelho, setas). Observam-se melanófagos e células atípicas na derme (área em azul, setas). Neste nível as células brilhantes se concentram dentro da estrutura em funil do folículo.

Em contrapartida, nos casos de QAP numerosos queratinócitos brilhantes atípicos eram observados entre os folículos, porém poupando uma área intrafolicular de queratinócitos monomórficos (**Figuras 9, 10 e 11**). Nos stacks foliculares um anel de queratinócitos brilhantes atípicos podia ser observado ao redor do epitélio folicular normal, sem que houvesse invasão folicular (**Figura 12**).



Figura 9 - Queratose actínica pigmentada. A Foto clínica. B Foto dermatoscópica.

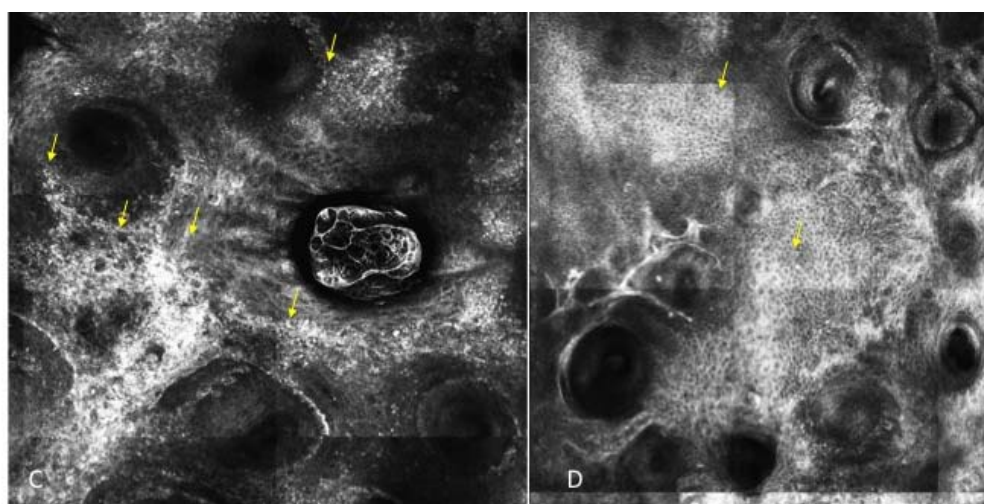


Figura 10 - Imagem à MC do Queratose Actínica Pigmentada observada na figura 9; Vivablock superficial no extrato córneo e granuloso. C. Células brilhantes poupando a área do folículo piloso (setas) D. Favo de mel atípico. As células são de tamanhos variados e com desestruturação do seu desenho regular (setas).

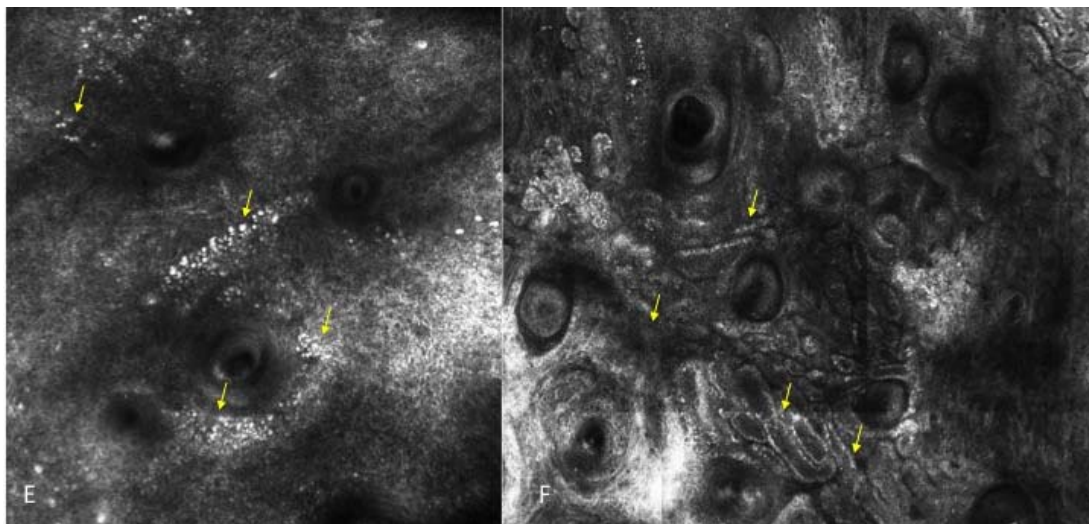


Figura 11 - Imagem à MC do Queratose Actínica Pigmentada observada na figura 9; Vivablock Junção dermo-epidérmica. Células brilhantes (queratinócitos) ainda poupando os folículos (setas). F. Derme. Células convolutas brilhantes em um arranjo cordonal rodeando os folículos (setas).

A técnica de execução destes cortes finos correlacionados ao folículo visto ao exame de dermatoscopia foi denominada abordagem folicular (follicular approach - **Figura 12**) e os dois achados mais significantes neste estudo (APFO e IGH) são mais facilmente estudados com esta abordagem.

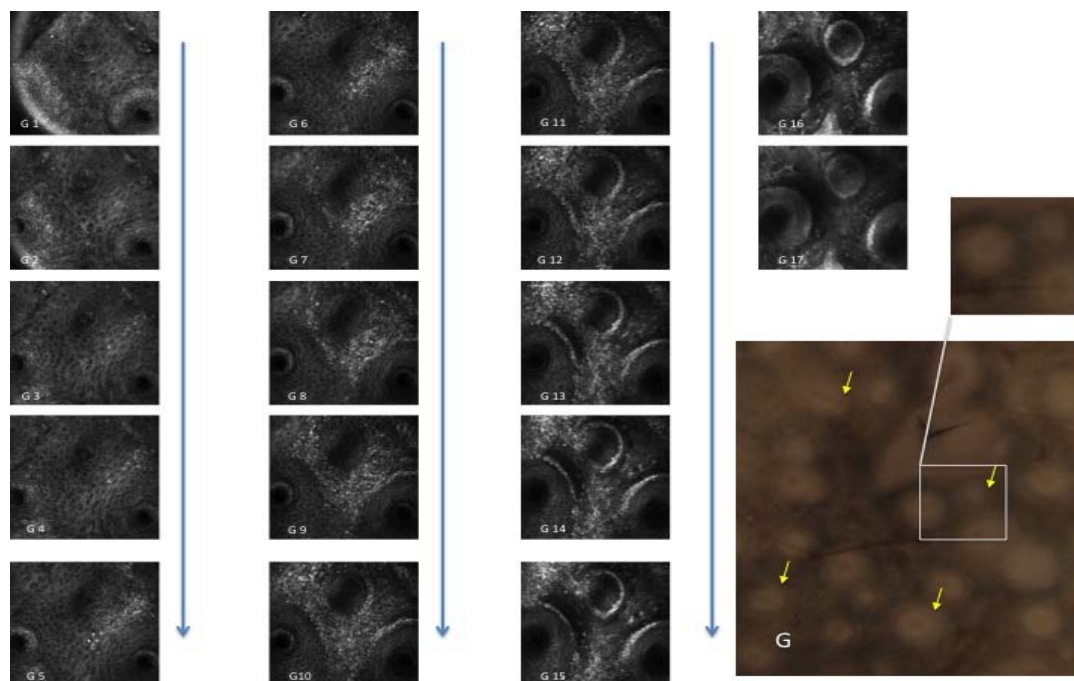


Figura 12 - Abordagem folicular. G.Dermatoscopia da lesão do paciente da figura 9 com destaque para o trecho onde foi executado o stack. Pode-se ver o halo interno cinza (setas amarelas). G1 a G17: Imagens sucessivas de um Stack de uma queratose actínica pigmentada em cortes finos: as células brilhantes que rodeiam o folículo piloso poupam um círculo de queratinócitos normais do folículo. Conforme as imagens do stack se aprofundam, o contorno de células brilhantes se estreita de forma regular.

O modelo comprovado com este estudo também valida o modelo de Pinkus (1958) para o comportamento dos queratinócitos atípicos pigmentados da QAP nos folículos pilosos (**Figura 13**). Segundo este modelo, com o aumento de proliferação displásica do epitélio que entremeia os folículos, como os folículos são poupados das alterações displásicas das queratoses actínicas, ocorre a formação de uma estrutura se abre em cálice ou guarda-chuva na superfície adquirindo ao corte histológico convencional um aspecto de tronco de cone invertido. Esta estrutura corresponde ao epitélio folicular poupado. Os queratinócitos atípicos pigmentados que tem origem distinta dos do folículo, escorregam por debaixo da estrutura em

guarda-chuva por falta de espaço (**Figura 13A**). Visto no plano *en face* à dermatoscopia temos o plugue córneo amarelado ao centro circundado por um círculo branco, por sua vez circundado pelo halo interno cinza e pelo padrão anular granular acinzentado (**Figura 14**); e à RCM, vemos um anel de queratinócitos brilhantes atípicos na periferia do folículo com um centro acinzentado que vai se estreitando conforme o stack se aprofunda (**Figuras 10, 11 e 12**).

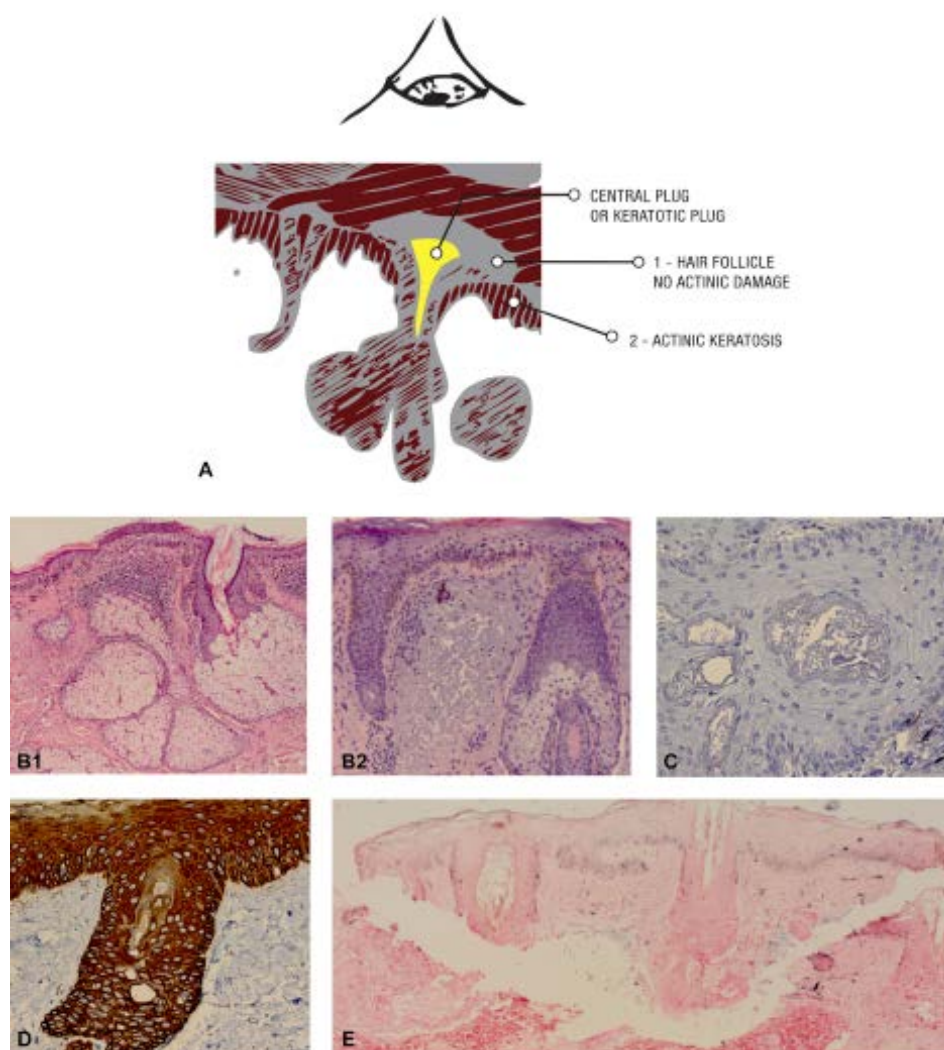


Figura 13 - Correlação dermatoscópica-histopatológica do halo interno cinza. A, Desenho esquemático do Halo interno cinza: em amarelo plug queratótico central; cone invertido de epiderme normal, poupada do dano actínico em cinza, que corresponde ao Halo interno cinza; epitélio anaplásico (queratose actínica) em marrom, que é o correspondente histológico da pseudorrede vista à dermatoscopia. B1 e B2, demonstração histológica do dano actínico, poupando uma area no folículo em forma de guarda-chuva invertido. C, corte transversal com imunoexpressão negativa para HMB-45. D, imunoexpressão positiva dos queratinócitos basais (AE1/AE3). E, corte perpendicular demonstrando aumento de melanina basal em queratinócitos basais, avançando por debaixo da área folicular poupada em forma de guarda-chuva.

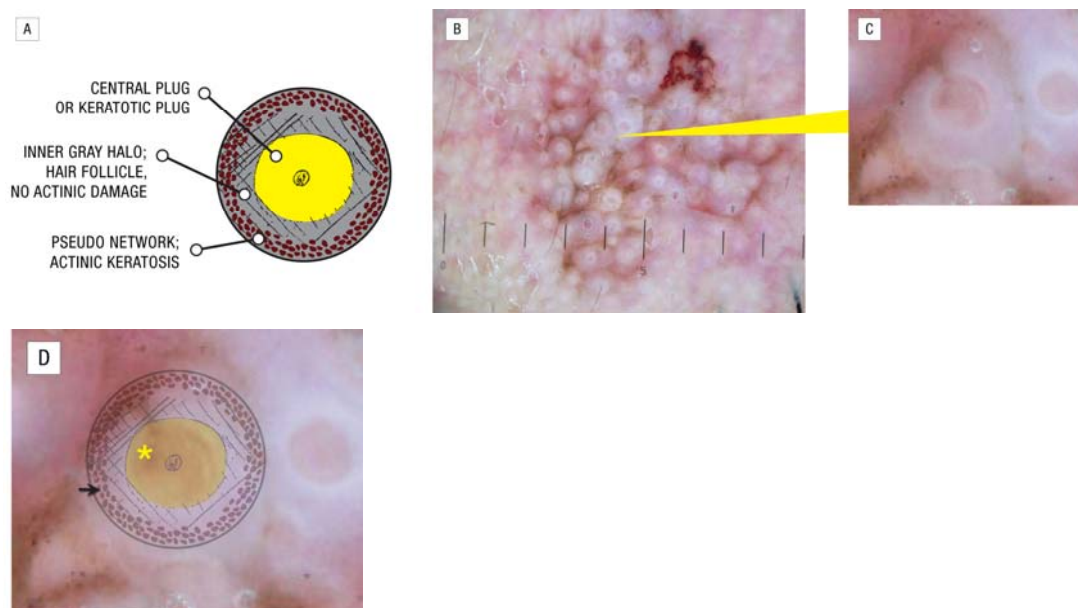


Figura 14 - Queratose actínica pigmentada. A, Desenho esquemático de Halo interno cinza em vista transversal: plug de queratina central (amarelo), pseudorrede pigmentada (marrom) e halo interno cinza (cinza). B, dermatoscopia de QAP, com presença de múltiplas halos internos cinzas. C, magnificação de halo interno cinza. D, magnificação de halo interno cinza demonstrada em C, com superposição de desenho esquemático de halo interno cinza.

Embora os círculos brancos (TSCHANDL 2015) sejam também estruturas dermatoscópicas sugestivas tumores de linhagem queratinocítica, estes parâmetros não foram usados no presente estudo por terem sido publicados *a posteriori*, e a literatura os relaciona tanto para excluir CEC e queratoacantoma, quanto para diagnosticar queratoses actínicas pigmentadas. Os círculos brancos correspondem ao funil de epitélio normal que se sobrepõem aos queratinócitos atípicos pigmentados da QAP (**Figura 15 A, B2, F, G**). A pseudorrede pigmentada corresponde aos queratinócitos atípicos pigmentados que se proliferam, poupando os folículos (**Figura 15 A, B1, E e G**). E finalmente o Halo interno Cinza corresponde a uma junção dos

efeitos ópticos do círculo branco e da pseudorrede pigmentada, ou seja ao efeito Tyndall dos queratinócitos atípicos pigmentados vistos por debaixo do guarda-chuva de queratinócitos foliculares poupados resultando na nuance acinzentada do HIC (**Figura 15 A, C,G**).

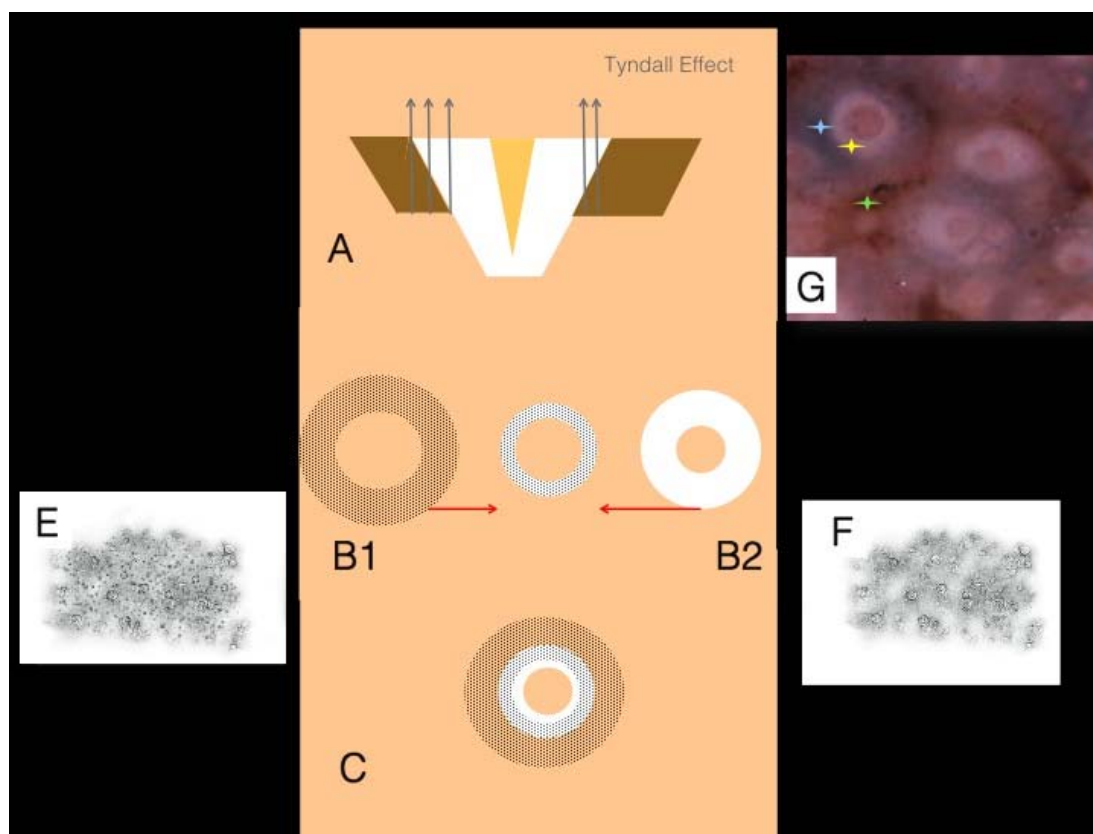
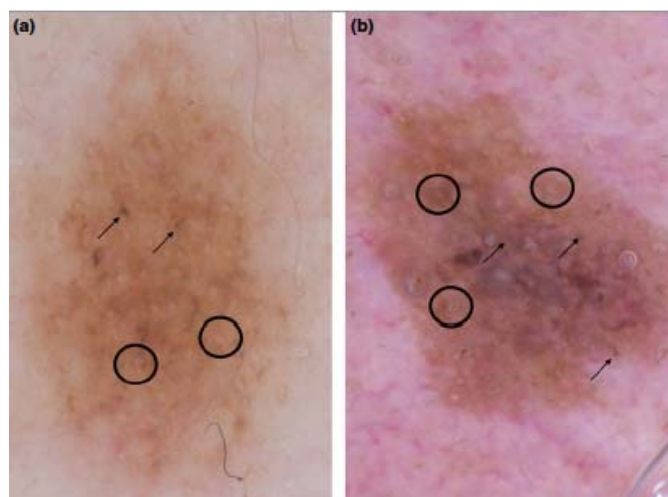


Figura 15 - Desenho esquemático de Halo Interno Cinza e correlação com estruturas dermatoscópicas descritas no folículo. A. Corte esquemático longitudinal do folículo, no qual observa-se a representação do efeito Tyndall do pigmento presente nos queratinócitos pigmentados da QAP. B1 e E representam a pseudorrede pigmentada. B2 e F Círculos brancos descritos por Rosendahl. C. A junção dos efeitos ópticos do círculo branco e da pseudorrede pigmentada resulta no efeito acinzentado observado no HIC, por efeito Tyndall. G. Imagem dermatoscópica, na qual observa-se nitidamente o halo branco interno (estrela amarela), halo cinza no meio (estrela azul) e pseudorrede pigmentada externa (estrela vermelha).

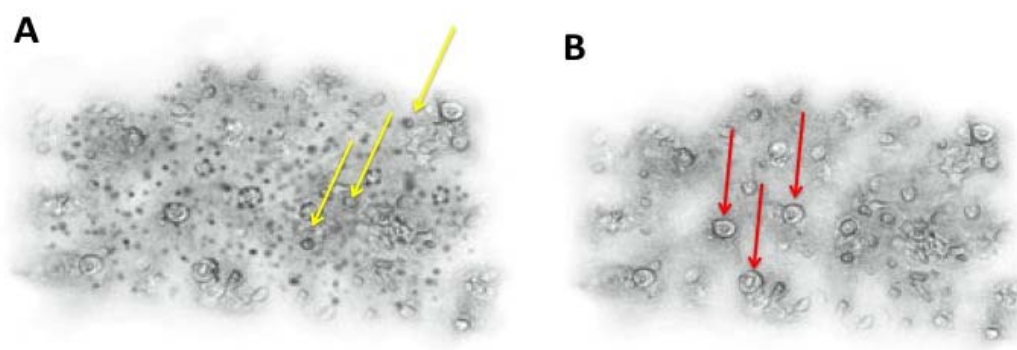
LALLAS et al. (2016) avaliaram a acurácia diagnóstica de critérios

dermatoscópicos para LM e QAP, entre os quais não constava a definição de HIC. Os autores encontraram associação dos chamados gray circles com LM, sendo um fator preditor de LM na análise univariada. **Figura 16**). Apesar da semelhança em termos de coloração e nomenclatura, os gray circles referem-se ao acometimento folicular pelo LM, enquanto o HIC corresponderia aos double circles descritos por Tschandl em 2015, um ano após a publicação do primeiro estudo deste doutorado (**Figura 17B**) (TSCHANDL et al. 2015).



Fonte: Adaptado de LALLAS et al. (2016)

Figura 16 - Melanomas apresentando gray circles.



Fonte: Adaptado de TSCHANDL et al. (2015)

Figure 17 - Gray Circles versus Double circle. A Representação dos gray circles (setas amarelas). B Representação dos double circles.(setas vermelhas).

Tendo como premissa que o Halo interno cinza apresentou forte correlação histológica e confocal, aventou-se a aplicabilidade deste parâmetro no auxílio diagnóstico diferencial de outras lesões pigmentadas da face.

A Doença de Bowen pigmentada, ou carcinoma espinocelular *in situ* pigmentado, assim como a queratose actínica pigmentada, constitui um simulador de melanoma da face, tanto clínica como dermatoscopicamente. Ambos são neoplasias cutâneas de origem no epitélio escamoso, sendo portanto esperado que possuam características histopatológicas e à microscopia confocal em comum, embora o quadro clínico e dermatoscópico possa ser distinto. À microscopia confocal observa-se desarranjo do padrão honeycomb nas camadas granulosa e espinhosa, além de anéis de células brilhantes ao redor das papilas dérmicas e presença de numerosas células dendríticas nas camadas supra-basais da epiderme (**Figura 18**). Dos cinco casos descritos na série de casos no segundo artigo, o caso localizado na face, apresentava células dendríticas brilhantes, que poupavam o folículo

piloso, ou seja apresentavam o correspondente à microscopia confocal do Halo interno cinza, possibilitando um diagnóstico diferencial de lesão de linhagem queratinocítica com lentigo maligno, antes mesmo da realização de biópsia e imunohistoquímica com CD1-a e melan-A (**Figura 18**).

A abordagem folicular combinando o achado de HIC com estreitamento regular do anel brilhante à RCM permitiu na prática a exclusão de melanomas em lesões de linhagens queratinocíticas faciais. E apesar do HIC apresentar sensibilidade de 91,4% e especificidade de 71,4% ($p < 0,001$), com valor preditivo positivo de 89,9% (IC 95% 79,5-95,3%;), e excelente concordância interobservador (Cohen kappa 0,846), o diagnóstico padrão permanece o histopatológico, sendo necessária a validação dos achados do presente estudo com uma casuística mais ampla, e em diferentes centros.

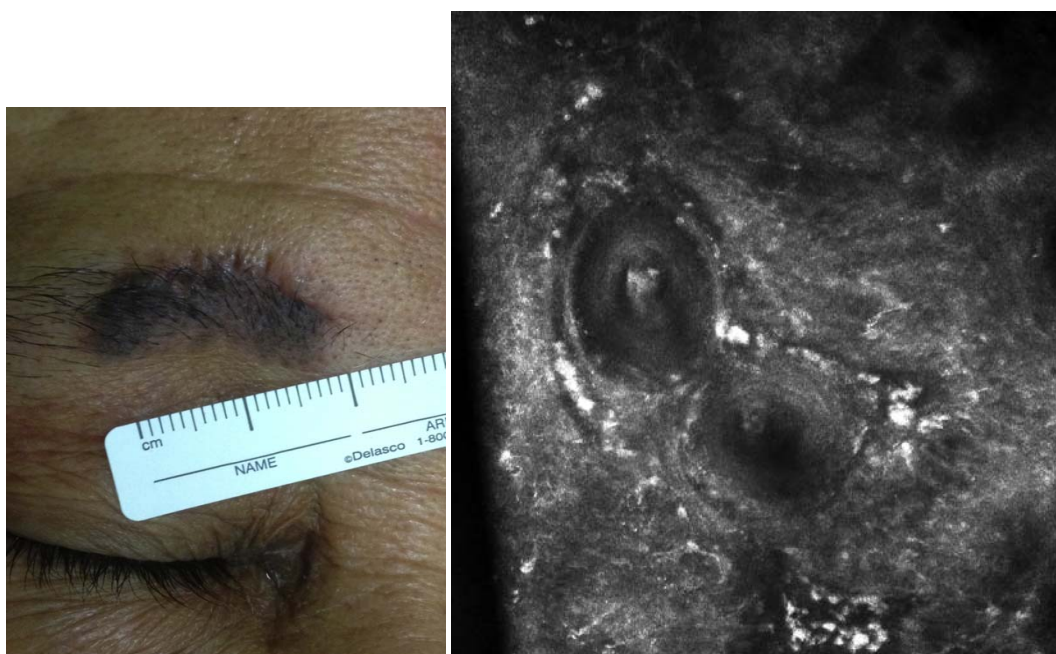


Figura 18 - Doença de Bowen pigmentada. Imagem clínica e microscopia confocal de lesão pigmentada no supercílio. Presença de anel de células brilhantes poupando epitélio perifolicular normal.

6 CONCLUSÃO

O Halo Interno Cinza representou o achado mais frequente nas queratoses actínicas pigmentadas, seguido por estruturas romboidais e glóbulos e pontos acinzentados.

Halo Interno Cinza corresponde na histologia aos queratinócitos normais oriundos do folículo sobrepondo-se aos queratinócitos pigmentados atípicos da queratose actínica pigmentada circunjacente, que deslizam por sob a estrutura de funil sem contudo invadí-la. As estruturas romboidais e os pontos e glóbulos correspondem aos melanófagos e queratinócitos pigmentados entremeando as estruturas em guarda-chuva de folículos normais regularmente distribuídas na face.

O correspondente à microscopia confocal do HIC é o anel de células brilhantes que se estreita conforme se aprofunda, poupando a estrutura em padrão favo de mel regular do folículo; o das estruturas romboidais e glóbulos e pontos corresponde às células brilhantes de queratinócitos na epiderme e melanófagos na derme .

HIC apresentou sensibilidade de 91,4% e especificidade de 71,4% e VPP de 89,8% para QAP. No entanto nenhum parâmetro isolado de dermatoscopia ou MC deve ser usado para diagnóstico e a histologia permanece o padrão ouro.

A preservação de invasão por células tumorais do epitélio perifolicular na queratose actínica à histopatologia, descrita por Pinkus, é um modelo de

correlação possível com a dermatoscopia e a microscopia confocal, podendo constituir um fator de auxílio no diagnóstico diferencial com o lentigo maligno.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aghassi D, Anderson RR, Gonzalez S. Confocal laser microscopic imaging of actinic keratoses in vivo:a preliminary report. **J Am Acad Dermatol** 2000; 43:42-48.

Ahlgrim-Siess V, Massone C, Scope A, et al. Reflectance confocal microscopy of facial lentigo maligna and lentigo maligna melanoma:a preliminary study. **Br J Dermatol** 2009; 161:1307-16.

Akay BN, Kocyigit P, Heper AO, Erdem C. Dermatoscopy of flat pigmented facial lesions:diagnostic challenge between pigmented actinic keratosis and lentigo maligna. **Br J Dermatol** 2010; 163:1212-7.

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.

Busam KJ, Charles C, Lee G, Halpem AC. Morphologic features of melanocytespigmented keratinocytesand melanophages by in vivo confocal scanning laser microscopy. **Mod Pathol** 2001; 14:862-8.

Carli P, de Giorgi V, Chiarugi A, et al. Addition of dermoscopy to conventional naked-eye examination in melanoma screening:a randomized study. **J Am Acad Dermatol** 2004; 50:683-9.

Carli P, De Giorgi V, Crocetti E, et al. Improvement of malignant/benign ratio in excised melanocytic lesions in the 'dermoscopy era':a retrospective study 1997-2001. **Br J Dermatol** 2004; 150:687-92.

Cohen LM. Lentigo maligna and lentigo maligna melanoma. **J Am Acad Dermatol** 1995; 33:923-36; quiz 937-40.

Elder DE, Elenitsas R, Murphy GF, Xiaowei X. Benign pigmented lesions and malignant melanoma. In: Elder DE, editor. **Lever's histopathology of the skin**. Philadelphia: Lippincott Williams & Williams; 2005. p.715-803.

Ferrara G, Argenziano G, Soyer HP, Staibano S, Ruocco E, De Rosa G. Dermoscopic-pathologic correlation:an atlas of 15 cases. **Clin Dermatol** 2002; 20:228-35.

Frangos JE, Duncan LM, Piris A, et al. Increased diagnosis of thin superficial spreading melanomas: a 20-year study. **J Am Acad Dermatol** 2011; 67:387-94.

Geller AC, Annas GD. Epidemiology of melanoma and nonmelanoma skin cancer. **Semin Oncol Nurs** 2003; 19:2-11.

Geller AC, Swetter SM, Brooks K, Demierre MF, Yaroch AL. Screeningearly detectionand trends for melanoma:current status (2000-2006) and future directions. **J Am Acad Dermatol** 2007; 57:555-72; quiz 573-56.

Giblin AV, Thomas JM. Incidencemortality and survival in cutaneous melanoma. **J Plast Reconstr Aesthet Surg** 2007; 60:32-40.

Goncharova Y, Attia EA, Soud K, Vasilenko IV. Dermoscopic features of facial pigmented skin lesions. **ISRN Dermatol** 2013; 2013:546813.

[GBM] Grupo Brasileiro de Melanoma. Dados estatísticos do GBM. **Bol Informativo do GBM** 2000; 10:4.

Guillod JF, Skaria AM, Salomon D, Saurat JH. Epiluminescence videomicroscopy: black dots and brown globules revisited by stripping the stratum corneum. **J Am Acad Dermatol** 1997; 36:371-7.

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.

Horn M, Gerger A, Ahlgrimm-Siess V. Ahlgrimm-Siess et al. Discrimination of actinic keratoses from normal skin with reflectance mode confocal microscopy. **Dermatol Surg** 2008; 34:620-5.

Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics 2010. **CA Cancer J Clin** 2010; 60:277-300.

Katz BR. **Atlas of dermoscopy**. London: Taylor & Francis; 2005. Pigmented actinic keratosis; p.86-90.

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

Kreusch J, Rassner G. [Standardized epiluminescent microscopy for differentiating melanocytic and non-melanocytic pigment nevi]. *Hautarzt* 1991; 42:77-83.

Krischer J, Skaria A, Guillod J, et al. Epiluminescent light microscopy of melanocytic lesions after dermoepidermal split. **Dermatology** 1997; 195:108-11.

Lallas AP, Tschandl P, Kyrgidis A, et al. Dermoscopic clues to differentiate facial lentigo maligna from pigmented actinic keratosis. **Br J Dermatol** 2016; 174:1079-85.

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; quiz 798-79.

Massi D, De Giorgi V, Soyer HP. Histopathologic correlates of dermoscopic criteria. **Dermatol Clin** 2001; 19:259-68vii.

Menzies SW, Crotty KA, Ingvar C, McCarthy WH. **An atlas of surface microscopy of pigmented skin lesions**. New York: McGraw-Hill; 1996. Benign Pigmented tumors; 45-53.

MoscarellaEG. Ferraral. Zalaudeket al. Life made easier:confocal microscopy in two difficult partially pigmented melanocytic lesions. **Dermatol Surg** 2010; 36(3):409-414.

Moscarella E, Ferrara G, Zalaudek I, et al. Dermoscopy and reflectance confocal microscopy of pigmented actinic keratoses:a morphological study. **J Eur Acad Dermatol Venereol** 2014; 36:409-14.

Nascimento M, Yamada M, Almeida SF. New dermoscopic features for the diagnosis of pigmented actinic keratosis. **Dermatology** 2006; 212:290.

Pehamberger H, Binder M, Steiner A, et al. In vivo epiluminescence microscopy:improvement of early diagnosis of melanoma. **J Invest Dermatol** 1993; 100:356S-62S.

Pinkus H. Keratosis senilis; a biologic concept of its pathogenesis and diagnosis based on the study of normal epidermis and 1730 seborrheic and senile keratoses. **Am J Clin Pathol** 1958; 29:193-207.

Pralong P, Bathelier E, Dalle S, et al. Dermoscopy of lentigo maligna melanoma:report of 125 cases. **Br J Dermatol** 2012; 167:280-7.

Provost N, Kopf AW, Rabinovitz HS, et al. Globulelike dermoscopic structures in pigmented seborrheic keratosis. **Arch Dermatol** 1997; 133:540-1.

Purdue MP, Freeman LE, Anderson WF, Tucker MA. Recent trends in incidence of cutaneous melanoma among US Caucasian young adults. **J Invest Dermatol** 2008; 128:2905-8.

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

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

Rishpon A, Kim N, Scope A, et al. Reflectance confocal microscopy criteria for squamous cell carcinomas and actinic keratoses. **Arch Dermatol** 2009; 145:766-72.

Rosendahl C, Cameron A, Argenziano G, Zalaudek I, Tschandl P, Kittler H. Dermoscopy of squamous cell carcinoma and keratoacanthoma. **Arch Dermatol** 2012; 148:1386-92.

Schiffner R, Schiffner-Rohe J, Vogt T, et al. Improvement of early recognition of lentigo maligna using dermoscopy. **J Am Acad Dermatol** 2000; 42:25-32.

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** 2007; 143:176-85.

Soyer HP, Kenet RO, Wolf IH, Kenet BJ, Cerroni L. Clinicopathological correlation of pigmented skin lesions using dermoscopy. **Eur J Dermatol** 2000; 10:22-8.

Soyer H, Smolle J, Kresbach H, et al. Zur auflichtmikroskopie von pigmenttumoren der haut. **Hautarzt** 1988; 39:223-7.

Soyer HP, Smolle J, Hödl S, Pachernegg H, Kerl H. Surface microscopy. A new approach to the diagnosis of cutaneous pigmented tumors. **Am J Dermatopathol** 1989; 11:1-10.

Steiner A, Pehamberger H, Wolff K. In vivo epiluminescence microscopy of pigmented skin lesions. II. Diagnosis of small pigmented skin lesions and early detection of malignant melanoma. **J Am Acad Dermatol** 1987; 17:584-91.

Stolz W, Braun-Falco O, Landthaler M, Cagnetta AB. **Color atlas of dermoscopy**. Berlin: Blackwell Wissenschafts-Verlag; 1994. Typical patterns due to localization; p33-36

Stolz W, Schiffner R, Burgdorf WH. Dermatoscopy for facial pigmented skin lesions. **Clin Dermatol** 2002; 20:276-8.

Tschandl P, Rosendahl C, Kittler H. Dermatoscopy of flat pigmented facial lesions. **J Eur Acad Dermatol Venereol** 2015; 29:120-7.

Watson M, Johnson CJ, Chen VW, et al. Melanoma surveillance in the United States:overview of methods. **J Am Acad Dermatol** 2011; 65(5 Suppl 1):S6-16.

Wurm EM, Curchin CE, Lambie D, Longo C, Pellacani G, Soyer HP. Confocal features of equivocal facial lesions on severely sun-damaged skin: four case studies with dermatoscopicconfocaland histopathologic correlation. **J Am Acad Dermatol** 2012; 66:463-73.

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 - Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



**A.C. Camargo
Cancer Center**

**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 16 de junho de 2014.

A
Dra. Gisele Gargantini Rezze.

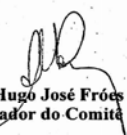
Aluno: Mauricio Mendonça do Nascimento (Doutorado).

**Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1524/11F
"Estudo Retrospectivo e Prospectivo para Correlação entre Dermatoscopia,
Microscopia Confocal e Cortes Transversais para Diferenciação do Lentigo Maligno e
da Queratose Actínica Pigmentada da Face".**

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 10/06/2014, tomaram conhecimento e aprovaram os seguintes documentos:

- Solicitação de dispensa da submissão da documentação obrigatória e análise ética do projeto acima mencionado por se tratar de um projeto afiliado ao temático intitulado "Determinação dos padrões da microscopia confocal in vivo nas lesões pigmentadas e comparação com a dermatoscopia e a histopatologia em cortes transversais", registrado neste CEP sob nº 1524/11. O projeto afiliado em referência será a tese de Doutorado do aluno *Mauricio Mendonça do Nascimento*.
- Projeto de Doutorado, datado de 06 de março de 2013.

Atenciosamente,


**Dr. Antônio Hugo José Fróes Marques Campos
2º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa**

1/1

9/14/14 4:47 PM



• **[acProjects] Projeto 1524/11F aprovado**

De: noreply@cipe.accamargo.org.br
Para: maumennas@uol.com.br
Cópia:
Cópia oculta:
Assunto: [acProjects] Projeto 1524/11F aprovado
Data: 27/06/2014 09:57

acProjects - Sistema de Gerência de Projetos

Caro(a) Sr.(a)

Informamos que o projeto citado abaixo foi aprovado pela comissão responsável:

Alias: JCTB835/c
Código de Ética: 1524/11F

Título: Estudo Retrospectivo e Prospectivo para Correlação entre Dermatoscopia, Microscopia Confocal e Cortes Transversais para Diferenciação do Lentigo Maligno e da Queratose Actínica Pigmentada da Face

Atenciosamente,

CIPE
Centro Internacional de Pesquisa e Ensino - A. C. Camargo Cancer Center

⚠ Lembre-se: sua senha de acesso no UOL Mail é secreta; não a informe a ninguém.
O UOL Mail jamais solicitará sua senha por e-mail ou por telefone. [Trocar senha](#).

Anexo 2 - Certificado 5 top papers do ano, apresentação na Reunião da pós Graduação A.C.Camargo Cancer Center

A.C.Camargo Cancer Center Centro Integrado de Diagnóstico, Tratamento, Ensino e Pesquisa Curso de Pós-Graduação em Ciências da Fundação Antônio Prudente Área de Oncologia CERTIFICADO Certificamos que <u>Maurício Mendonça do Nascimento</u> proferiu a palestra "Dermoscopic and Reflectance Confocal Microscopy Findings in Extra-genital HPV 16 – associated Pigmented Squamous Cell Carcinoma in situ", para os alunos do Curso de Pós-Graduação em Seminários Integrados em Ciências da Fundação Antônio Prudente – Área de Oncologia, em 22 de Março de 2017. São Paulo, 22 de Março de 2017.  Ana Maria Rodrigues Alves Kuninari Gerente Educacional
--

Apêndice 1 - Termo de Consentimento Livre e Informado

Anexo I - Termo de informação e consentimento livre e esclarecido

Estudo Retrospectivo e Prospectivo para Correlação entre Dermatoscopia, Microscopia Confocal e Cortes Transversais para Diferenciação do Lentigo Maligno e da Queratose Actínica Pigmentada da Face.

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 lesões na face, 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: