



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Amanda Nascimento Cavalleiro de Macedo Mota da Silva

**Avaliação dos critérios diagnósticos da ceratose actínica através da
microscopia confocal a laser**

Rio de Janeiro

2019

Amanda Nascimento Cavalleiro de Macedo Mota da Silva

Avaliação dos critérios diagnósticos da ceratose actínica através da microscopia confocal a laser

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Baptista Barcaui

Coorientador: Prof. Dr. Juan Manuel Piñeiro-Maceira

Rio de Janeiro

2019

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S586 Silva, Amanda Nascimento Cavalleiro de Macedo Mota da.
Avaliação dos critérios diagnósticos da ceratose actínica através da microscopia
confocal a laser / Amanda Nascimento Cavalleiro de Macedo Mota da Silva. – 2019.
102 f.

Orientador: Carlos Baptista Barcaui
Coorientador: Juan Manuel Piñeiro-Maceira

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de
Ciências Médicas. Pós-graduação em Ciências Médicas.

1. Ceratose actínica. 2. Microscopia confocal. 3. Neoplasias cutâneas. I. Barcaui,
Carlos Baptista. II. Piñeiro-Maceira, Juan Manuel. III. Universidade do Estado do Rio
de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.5-003.871

Bibliotecária: Angela da Silva Velho - CRB7/4780

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta
dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Amanda Nascimento Cavalleiro de Macedo Mota da Silva

Avaliação dos critérios diagnósticos da ceratose actínica através da microscopia confocal a laser

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 09 de dezembro de 2019.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Baptista Barcaui
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Coorientador: Prof. Dr. Juan Manuel Piñeiro-Maceira
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Banca Examinadora: _____

Prof.^a Dra. Luna Azulay-Abulafia
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Maria de Fátima Guimarães Scotelaro Alves
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Luciana Pantaleão
Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2019

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, por todos os ensinamentos de vida e pelo incentivo incondicional à minha constante formação acadêmica, e à minha filha Julia, que amorosamente dividiu sua gestação e seus primeiros meses de vida com artigos científicos, tabelas e inúmeras imagens de microscopia confocal a laser.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, base da minha vida, por sempre me incentivar nos estudos e permitir meu aprimoramento constante. Ao meu marido, pelo apoio, compreensão e paciência nos meus momentos de ausência.

Aos meus queridos orientadores Carlos Barcaui e Juan Maceira, que compartilharam comigo seus ensinamentos, sempre me estimulando a continuar e a melhorar diariamente.

Aos meus amigos, em especial Paula Faria, Daniel Fernandes e Nathalie de Carvalho, que me apoiaram e me ajudaram durante a aquisição e análise das imagens de Microscopia confocal a laser (MCL) e na avaliação dos pacientes.

Aos residentes de dermatologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE), que referenciaram os pacientes para inclusão no estudo, com muito carinho e presteza.

À equipe de estatísticos que me auxiliou na validação dos dados obtidos nesta dissertação e nos artigos submetidos, com destaque à professora Maria Elvira Piñeiro-Maceira e David Souza Pinto, que foram de extremo profissionalismo e importância.

Ao professor Giovanni Pellacani e toda equipe do setor de microscopia confocal a laser do Hospital da Universidade de Modena e Reggio Emilia, que me receberam de braços abertos durante meu período de aperfeiçoamento na Itália, além da atenção aos inúmeros e-mails trocados em prol do aprimoramento deste estudo.

Ao biólogo Hécio Frias, que, sempre disposto a ajudar, executou brilhantemente os cortes das amostras delicadas obtidas por *shaving* e a coloração das lâminas, facilitando imensamente a avaliação histopatológica dos casos.

Aos queridos Denise e Henrique, que receberam na secretaria os pacientes agendados para os exames e, com gentileza, sempre me auxiliaram em todas as intercorrências.

À equipe de Dermatologia do Hospital Central da Aeronáutica, que entendeu e permitiu minhas eventuais trocas de horário para viabilizar o cumprimento das disciplinas obrigatórias do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas - Universidade do Estado do Rio de Janeiro (PGCM-UERJ).

A todos os colegas da banca examinadora, que tiveram paciência em ler o trabalho e ouvir a apresentação, me presenteando com seu conhecimento.

Aos pacientes, que confiaram no meu trabalho e autorizaram sua inclusão no estudo.

E ao PGCM, que me permitiu realizar o mestrado nesta instituição que tanto admiro.

RESUMO

SILVA, Amanda Nascimento Cavalleiro de Macedo Mota da. *Avaliação dos critérios diagnósticos da ceratose actínica através da microscopia confocal a laser*. 2019.102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

O diagnóstico da ceratose actínica (CA) é baseado primordialmente no exame clínico e eventualmente confirmado pela análise histopatológica (AH), indicada nos casos duvidosos ou refratários ao tratamento. O desafio é estabelecer o diagnóstico correto através de uma avaliação minimamente invasiva, sendo a concordância clínico-patológica limitada, em especial no que tange ao grau de acometimento epidérmico e ao subdiagnóstico de formas iniciais de carcinomas espinocelulares (CEC). O objetivo deste estudo é validar a análise da CA pela microscopia confocal a laser (MCL), um método de imagem não invasivo, com resolução celular e que permite o acompanhamento longitudinal das lesões, o qual viabiliza uma avaliação mais detalhada da resposta terapêutica e uma comparação entre diferentes opções de tratamento. Para esta validação, visa-se determinar os parâmetros relevantes na análise à MCL, comparados à AH, calculando-se a sensibilidade (S), especificidade (E), valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN) de cada critério encontrado na CA. Através do exame clínico, 25 CAs foram selecionadas para dermatoscopia, RCM e excisão por *shaving* para AH. A análise estatística foi realizada por testes de hipóteses (McNemar para variáveis binárias e Wilcoxon para a variável contínua). Não houve diferença significativa entre MCL e AH para 5 dos 6 parâmetros estudados. Os critérios estatisticamente relevantes foram: paraceratose (p-valor 0,4449690; S 90%; VPP 78,26%), hiperkeratose (p-valor 0,24821313; S 87,5%; E 100%; VPP 100%; VPN 25%), disqueratose (p-valor 0,617075; S 85,71%; E 75%; VPP 94,74%; VPN 50%), atipia dos ceratinócitos da camada espinhosa classificada como leve, moderada ou acentuada (p-valor 0,145032) e inflamação na epiderme (p-valor 1,000000; S 75%; E 20%; VPP 78,95%; VPN 16,67%). A MCL não conseguiu aferir adequadamente a inflamação na derme (p-valor 0,013328), apesar da boa sensibilidade (68%) e VPP (100%) obtidos. A MCL mostrou-se um método eficaz para o diagnóstico da CA, com resolução celular equiparável à AH, com a vantagem da abordagem não invasiva e livre de artefatos histológicos. A validação da classificação da atipia ceratinocítica em 3 graus, aliada a presença ou ausência dos demais 4 critérios, configura uma ferramenta promissora para futuros estudos que comparem evolutivamente uma mesma lesão de CA, de forma numérica e objetiva.

Palavras-chave: Ceratose actínica. Microscopia confocal a laser. Câncer cutâneo.

ABSTRACT

SILVA, Amanda Nascimento Cavalleiro de Macedo Mota da. *Evaluation of the diagnostic criteria of actinic keratosis through reflectance confocal microscopy*. 2019.102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

The diagnosis of actinic keratosis (AK) is based primarily on clinical examination and eventually confirmed by histopathological analysis (HA), indicated in doubtful cases or refractory to treatment. The challenge is to establish the correct diagnosis through a minimally invasive evaluation, despite limited clinical-pathological agreement, especially regarding the degree of epidermal involvement and diagnosis of early squamous cell carcinoma (SCC). The objective of this study is to validate the analysis of AK by reflectance confocal microscopy (RCM), a non-invasive imaging method, with cellular resolution, that allows longitudinal follow-up of lesions, which enables a more detailed assessment of treatment response and a comparison between different therapeutic options. For this validation, the aim is to determine the relevant parameters for RCM evaluation, compared to HA, by calculating the sensitivity (S), specificity (E), positive (PPV) and negative (NPV) predictive values of each criterion found in AK. Through clinical examination, 25 AKs were selected for dermoscopy, RCM and shaving excision for HA. Statistical analysis was performed by hypothesis tests (McNemar for binary variables and Wilcoxon for continuous variable). There was no significant difference between RCM and HA for 5 of the 6 parameters analyzed. Statistically relevant criteria were: parakeratosis (p-value 0.4449690; S 90%; PPV 78.26%), hyperkeratosis (p-value 0.28821313; S 87.5%; E 100%; PPV 100%; NPV 25%), dyskeratosis (p-value 0.617075; S 85.71%; E 75%; PPV 94.74%; NPV 50%), atypia of spinous layer keratinocytes classified as mild, moderate or severe (p- 0.145032), and inflammation in epidermis (p-value 1.000000; S 75%; E 20%; PPV 78.95%; NPV 16.67%). RCM could not adequately measure inflammation in dermis (p-value 0.013328), despite good sensitivity (68%) and PPV (100%). RCM proved to be an effective method for AK diagnosis, with cellular resolution comparable to HA, with the advantage of a noninvasive approach, free of histological artifacts. The validation of keratinocyte atypia classification in 3 degrees, associated with the presence or absence of other 4 criteria, constitutes a potentially useful tool for further studies that address evolutionary comparisons of the same AK lesion over time, in a numerical and objective manner.

Keywords: Actinic keratosis. Reflectance confocal microscopy. Skin neoplasm.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Correspondência entre os aspectos clínicos e dermatoscópicos dos três graus da CA	19
Figura 2 –	Vias de evolução da ceratose actínica	23
Figura 3 –	Taxas de resposta clínica das CAs às diferentes opções de tratamento ...	25
Figura 4 –	Microscópio confocal a laser modelo Vivascope® 1500 e a sequência para aquisição das imagens	27
Figura 5 –	Mecanismo de funcionamento do Vivascope 1500	28
Figura 6 –	Índices de refletância das estruturas teciduais e celulares cutâneas (em ordem decrescente)	29
Figura 7 –	Comparativo entre MCL, dermatoscopia e histopatologia	30
Figura 8 –	Principais critérios para o diagnóstico da CA à MCL	36
Figura 9 –	Grau de atipia epidérmica na camada espinhosa	37
Figura 10 –	Infiltrado inflamatório linfocitário na epiderme e na derme, à MCL	37
Figura 11 –	Critérios avaliados através do mapeamento vertical à MCL	43
Figura 12 –	Tabela de contingência	46
Figura 13 –	Fotografias clínicas (à esquerda) e dermatoscópicas (à direita) das 25 lesões de ceratose actínica incluídas no estudo, identificadas de A a Z ..	49
Figura 14 –	Concordância entre os critérios diagnósticos à MCL e à AH	52
Figura 15 –	Gradação histopatológica das CAs (Cockerell et al. 2005)	60

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Número de casos com ausência e presença de hiperkeratose à MCL e à AH	53
Gráfico 2 –	Número de casos com ausência e presença de parakeratose à MCL e à AH	55
Gráfico 3 –	Número de casos com ausência e presença de disqueratose à MCL e à AH	56
Gráfico 4 –	Número de casos com ausência e presença de células inflamatórias na epiderme, à MCL e à AH	57
Gráfico 5 –	Número de casos com ausência e presença de células inflamatórias na derme, à MCL e à AH	58
Gráfico 6 –	Número de casos com atipia dos queratinócitos da camada espinhosa, com distribuição entre os graus 1, 3 e 5, à MCL e à AH	59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Correspondência das classificações dos três graus da CA através da clínica, dermatoscopia, MCL e histopatologia	22
Quadro 2 –	Critérios observados à MCL e à histopatologia na avaliação das CAs não pigmentadas	32
Quadro 3 –	Critérios diagnósticos da CA e do CEC à MCL	34
Quadro 4 –	Descrição dos critérios diagnósticos da CA e do CEC, à MCL	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Distribuição dos pacientes pela classificação de Fitzpatrick	47
Tabela 2 –	P-valor correspondente a cada critério diagnóstico obtido pelo Teste de McNemar, aplicado para as variáveis binárias	50
Tabela 3 –	P-valor obtido pelo Teste de Wilcoxon aplicado ao critério contínuo	51
Tabela 4 –	Contingência para hiperkeratose	54
Tabela 5 –	Contingência para parakeratose	55
Tabela 6 –	Contingência para disqueratose	56
Tabela 7 –	Contingência para células inflamatórias na epiderme	57
Tabela 8 –	Contingência para células inflamatórias na derme	58
Tabela 9 –	Comparação entre as classificações histopatológicas e clínico-dermatoscópicas das lesões de CA incluídas no estudo	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU	5-Fluoracil
AAL	Ácido aminolevulínico
AH	Análise histopatológica
AK	<i>Actinic keratosis</i>
CA	Ceratose actínica
CE	Camada espinhosa
CEC	Carcinoma espinocelular
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
CG	Camada granulosa
COX-2	Ciclo-oxigenase – 2
CV	Coeficiente de variação
DNA	Ácido desoxirribonucléico
E	Especificidade; <i>Specificity</i>
EUA	Estados Unidos da América
FCM/UERJ	Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FN	Falso Negativo
FP	Falso Positivo
FPS	Fator de proteção solar
H&E	Hematoxilina & Eosina
H0	Hipótese nula
H1	Hipótese alternativa
HA	<i>Histopathological analysis</i>
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
JED	Junção epidermo-dérmica
LASER	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>
MAL	Ácido metilaminolevulínico
MCL	Microscopia confocal a laser
MI	Mebutato de ingenol
NK	<i>Natural-killers</i>

NPV	<i>Negative predictive value</i>
NY	<i>New York</i>
PGCM	Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas
PPV	<i>Positive predictive value</i>
RCM	<i>Reflectance confocal microscopy</i>
RJ	Rio de Janeiro
RNA	Ácido ribonucleico
S	Sensibilidade; <i>Sensitivity</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TFD	Terapia fotodinâmica
TFD-LD	Terapia fotodinâmica associada a luz do dia
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
UV	Ultravioleta
UV-A	Ultravioleta-A
UV-B	Ultravioleta-B
UV-C	Ultravioleta-C
VD	Vasodilatação
VN	Verdadeiro Negativo
VP	Verdadeiro Positivo
VPP	Valor preditivo positivo
VPN	Valor preditivo negativo

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
cm	Centímetro
=	Igual a
®	Registrado
nm	Nanômetros
x	Multiplicação; vezes
mW	Miliwatt
mm	Milímetro
>	Maior que
~	Aproximadamente
°C	Graus Celsius
seg	Segundos
<	Menor que
cm ²	Centímetro quadrado
CO ₂	Dióxido de Carbono
-	Menos

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	REVISÃO DA LITERATURA	17
1.1	Ceratoses actínicas	17
1.1.1	<u>Epidemiologia e etiologia</u>	17
1.1.2	<u>Mutação do gene p53</u>	18
1.1.3	<u>Aspectos clínicos</u>	18
1.1.4	<u>Dermatoscopia</u>	19
1.1.5	<u>Histopatologia</u>	20
1.1.6	<u>Vias de evolução</u>	22
1.1.7	<u>Seguimento e prevenção</u>	24
1.1.8	<u>Tratamento</u>	24
1.1.8.1	Tratamento direcionado à CA isolada	25
1.1.8.2	Tratamento do campo de cancerização	25
1.1.8.3	Outras opções terapêuticas	26
1.2	Microscopia confocal a laser (MCL)	26
1.2.1	<u>Princípios básicos</u>	26
1.2.2	<u>Pele normal à microscopia confocal a laser</u>	30
1.2.3	<u>Microscopia confocal a laser na avaliação da ceratose actínica</u>	31
2	OBJETIVOS	39
2.1	Objetivo geral	39
2.2	Objetivos específicos	39
3	METODOLOGIA	40
3.1	Desenho do estudo	40
3.2	Casuística	40
3.2.1	<u>Pacientes</u>	40
3.2.2	<u>Critérios de inclusão</u>	40
3.2.3	<u>Critérios de exclusão</u>	41
3.3	Financiamento	41
3.4	Métodos	42
3.4.1	<u>Avaliação epidemiológica</u>	42

3.4.2	<u>Exame clínico</u>	42
3.4.3	<u>Exame de microscopia confocal a laser</u>	43
3.4.4	<u>Análise histopatológica (AH)</u>	44
3.4.5	<u>Análise estatística</u>	44
4	RESULTADOS	47
4.1	Pacientes	47
4.2	Aspectos demográficos	47
4.3	Aspectos clínicos	48
4.4	Aspectos à microscopia confocal a laser	50
4.4.1	<u>Hiperceratose</u>	53
4.4.2	<u>Paraceratose</u>	54
4.4.3	<u>Disceratose</u>	55
4.4.4	<u>Células inflamatórias na epiderme</u>	56
4.4.5	<u>Células inflamatórias na derme</u>	57
4.4.6	<u>Grau de atipia dos ceratinócitos da camada espinhosa</u>	59
4.5	Aspectos histopatológicos	59
5	DISCUSSÃO	61
	CONCLUSÃO	66
	REFERÊNCIAS	67
	APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	73
	APÊNDICE B – Formulário de avaliação médica	75
	APÊNDICE C – Formulário de avaliação à microscopia confocal a laser	76
	APÊNDICE D – Formulário de avaliação histopatológica	77
	ANEXO A – Parecer consubstanciado pelo Comitê de Ética em Pesquisa HUPE/UERJ – CAE: 61911116.5.0000.5259	78
	ANEXO B – Artigo científico submetido	81

INTRODUÇÃO

A ceratose actínica (CA) é uma doença de ampla relevância na saúde pública e apresenta incidência ascendente (Spencer et al. 2005). Caracteriza-se clinicamente por máculas ou placas eritematoescamosas ou hiperkeratóticas, com tendência a se tornarem progressivamente mais espessas. São tipicamente concentradas nas áreas de maior exposição solar, sendo 80% delas localizadas na cabeça, no pescoço e nas extremidades superiores de pessoas de pele clara.

O diagnóstico dermatológico é baseado primordialmente na inspeção visual da morfologia clínica e eventualmente confirmado pela análise histopatológica. Enquanto a inspeção visual pode ser falha na detecção das alterações subclínicas precoces, repetidas análises histológicas invasivas de áreas extensas com dano actínico não são viáveis. O desafio é estabelecer o diagnóstico correto com a mínima necessidade da análise invasiva. Desta forma, algumas técnicas não invasivas, como a dermatoscopia e a microscopia confocal a laser (MCL) estão sendo estudadas para aumentar a acurácia do diagnóstico *in vivo* (Farnetani et al. 2015).

A MCL é um método de imagem que permite a observação dos detalhes arquiteturais e celulares, sem necessidade da excisão e do processamento tecidual, permitindo avaliar um grande número de lesões com boa acurácia. A MCL permite a análise das células do tecido cutâneo, em seu estado fisiológico, sem a retração gerada pela fixação e pela clivagem aplicadas na técnica histopatológica. As alterações iniciais da morfologia epidérmica e a atipia celular podem ser avaliadas antes de se tornarem clinicamente aparentes. Esta tecnologia auxilia no diagnóstico e na monitorização terapêutica ao longo do tempo, diferente da histopatologia, que não permite esse acompanhamento longitudinal. A maioria dos estudos encontrados na literatura atual apenas classifica os critérios diagnósticos da CA em presentes ou ausentes, não possibilitando a determinação da gravidade ou a diferenciação da resposta terapêutica em parcial ou total.

Assim sendo, pretende-se neste estudo avaliar a validade da MCL para o diagnóstico da CA e identificar os principais parâmetros a serem analisados neste exame promissor, em comparação à histopatologia, tradicionalmente utilizada para o diagnóstico microscópico. Os critérios observados à MCL serão graduados numericamente para possibilitar uma comparação objetiva da mesma lesão após o tratamento, de forma dinâmica e não invasiva.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Ceratoses actínicas

1.1.1 Epidemiologia e etiologia

A ceratose actínica (CA) apresenta prevalência ascendente (Spencer et al. 2005) devido à crescente expectativa de vida e por acometer principalmente os idosos (Dirschka et al. 2017). No Brasil, segundo o consenso da Sociedade Brasileira de Dermatologia de 2006, é a quarta causa de visita ao dermatologista, representando 5,1% dos motivos das consultas (Segatto et al. 2013).

Os fatores de risco mais relacionados à formação da CA são exposição solar crônica (laboral ou recreacional), gênero masculino, pele clara (fototipos I, II e III segundo descrição por Fitzpatrick (1975), idade acima de 40 anos, imunossupressão crônica e exposição ao arsênico. Pacientes que foram submetidos à transplante de órgãos, especialmente renal, apresentam um risco 250 vezes maior de desenvolverem CA e 100 vezes maior de desenvolverem um carcinoma espinocelular (CEC) (Zalaudek et al. 2014).

A principal etiologia é a radiação não ionizante, principalmente a radiação ultravioleta (UV). A radiação UV pode ser dividida de acordo com o comprimento de onda em que se encontra, como UV-A (315-400 nanômetros), UV-B (280-315 nanômetros) e UV-C (100-280 nanômetros). O *stress* oxidativo provocado pela UV-A induz mutações do DNA, enquanto a UV-B provoca diretamente a formação de dímeros de pirimidina (mais comumente de timina), mutações dos ceratinócitos e a formação da CA. A maior parte da UV-C é absorvida pela atmosfera. Além da exposição solar crônica, outros fatores são envolvidos, como as exposições às fontes artificiais de UV, terapia com psoraleno oral associado à radiação ultravioleta, raios X e radioisótopos. Consequentemente, a prevalência da CA é maior nas regiões com maior índice de exposição à radiação UV, sendo a maior encontrada na Austrália, onde 40 a 60% dos adultos acima de 40 anos são acometidos pela doença.

A prevalência também é influenciada pelo gênero. São afetados 55% dos homens e 37% das mulheres com idade entre 30 e 70 anos. Esta diferença é atribuída à maior exposição solar laboral dos homens (Richtig et al. 2010).

Outros fatores menos comuns associados à maior incidência da CA são síndromes genéticas caracterizadas pela dificuldade de reparo do DNA e inflamação cutânea crônica. A infecção pelo papiloma vírus humano pode desempenhar um papel de co-carcinógeno, através da interação com as proteínas víricas E6 e E7 (Ferrándiz et al. 2014).

1.1.2 Mutação do gene p53

O gene supressor tumoral p53 é geralmente descrito como o guardião do genoma. Ele impede a replicação do DNA e a alteração do ciclo celular em resposta ao dano do DNA, através da indução da apoptose das células danificadas. Na presença de comprometimento do reparo produzido pelo gene p53, as células com danos acumulam mutações adicionais e ocorre proliferação tumoral. A frequência da mutação do gene p53 é de 14,3% no tecido normal, 38,5% na pele com fotodano, 52,5% na CA e 53,8% no CEC. A identificação das mutações genéticas na pele fotoexposta com aparência normal fornece a base genética para a CA ser classificada como uma doença crônica (Rigel et al. 2013).

1.1.3 Aspectos clínicos

O quadro clínico das CAs é caracterizado por múltiplas máculas ou placas eritematoescamosas ou hiperkeratóticas localizadas nas áreas de maior exposição solar. Encontram-se 80% delas na cabeça, no pescoço e nas extremidades superiores. A maioria é assintomática (Segatto et al. 2013).

A classificação clínica das CAs as divide em graus I, II e III (Olsen et al. 1991). O grau I descreve as lesões mais palpáveis do que visíveis. O grau II, aquelas que são facilmente visíveis, assim como palpáveis, enquanto o grau III descreve as lesões mais espessas e ceratóticas (Röwert-Huber et al. 2007). Porém, sabe-se que esta gradação clínica é compatível com a histopatologia em apenas 50% dos casos, não devendo ser usada como preditor (Dirschka et al. 2017).

1.1.4 Dermatoscopia

O exame dermatoscópico é um método semiológico não invasivo que auxilia na avaliação clínica. Permite o reconhecimento de estruturas morfológicas que não são observadas a olho nu. O treinamento na interpretação dos critérios dermatoscópicos e sua correlação com os aspectos clínicos e histopatológicos é fundamental para aumentar a efetividade do diagnóstico das lesões cutâneas (Ferreira et al. 2011).

O dermatoscópio é um dispositivo de microscopia de epiluminescência com luz polarizada, concebido para observar detalhes cutâneos, com ampliação variável entre 10 e 70 vezes, dependendo do aparelho utilizado. As imagens podem ser obtidas acoplando-se o dermatoscópio a uma câmera digital (o que permite uma ampliação maior), ou já adquiridas em associação, através de equipamentos digitais (Ferreira et al. 2011).

À dermatoscopia (Figura 1), a CA de grau I apresenta padrão em pseudorede vermelha, com discretas escamas brancas. As lesões de grau II são definidas por fundo eritematoso entremeado de aberturas foliculares alargadas, branco-amareladas, ceratóticas e parcialmente confluentes, com aparência que se assemelha a um morango (*strawberry pattern*). Já as CAs de grau III podem apresentar duas formas: aberturas foliculares alargadas preenchidas por tampões ceratóticos sobre fundo descamativo branco-amarelado ou uma aparência amorfa branco-amarelada intensamente ceratótica (Zalaudek et al. 2014).

Figura 1 - Correspondência entre os aspectos clínicos e dermatoscópicos dos três graus da CA



Legenda: Ceratose actínica (CA).
Fonte: A autora, 2019.

A sensibilidade e a especificidade do método para as CAs são de 98% e 95%, respectivamente. A dermatoscopia também pode ser útil na diferenciação das CAs de graus I, II, III e do CEC, que geralmente revela um padrão vascular característico, devido à angiogênese tumoral. Pode-se observar diferentes padrões vasculares, como vasos em pontos, glomerulares, em grampos ou lineares. Outros critérios fortemente associados ao CEC são as áreas brancas e amorfas, massa central de ceratina e ulceração. A mudança dos vasos em pontos ou glomerulares para vasos em grampos ou lineares sugere progressão para uma forma de CEC mais agressiva (Zalaudek et al. 2014).

Kac et al. (2012) observaram as alterações dermatoscópicas decorrentes do tratamento da CA com imiquimode, constituídas pela redução dos sinais de ceratinização, representados por descamação e tampões córneos. Foi sugerida, então, a dermatoscopia como ferramenta útil na avaliação da resposta terapêutica das CAs, de forma mais eficaz do que a avaliação clínica isolada.

1.1.5 Histopatologia

O diagnóstico da CA é basicamente clínico. Porém, a biopsia é indicada nos casos refratários ao tratamento convencional (Stockfleth et al. 2011) ou duvidosos: quando há induração, ulceração, sangramento, diâmetro superior a 2 cm ou rápido crescimento (Ulrich et al. 2010). É relatado valor preditivo positivo de 74% das lesões de CA à análise clínica, em comparação à AH (Venna et al. 2005). Neste estudo, 17 (74%) das 23 lesões com características clínicas clássicas de CA (que não seriam rotineiramente submetidas à biopsia) foram confirmadas à histopatologia. Das demais 6 lesões, 5 (83%) configuravam CEC à AH, concluindo-se provável subdiagnóstico destas neoplasias cutâneas através da avaliação clínica exclusiva (Venna et al. 2005).

As ceratose actínicas são classificadas em 5 subtipos histopatológicos. A hipertrófica é descrita como aquela com hiperkeratose e acantose proeminentes, que pode formar o corno cutâneo. A atrófica é caracterizada pela atrofia da epiderme. A acantolítica é definida pela acantólise focal. O subtipo liquenoide apresenta infiltrado inflamatório linfocitário em faixa na derme, representado clinicamente pelo eritema presente na lesão. Já a forma pigmentada, apresenta aumento de melanina na epiderme (Rappini. 2007).

Na histopatologia, a CA é caracterizada pela proliferação intraepidérmica de ceratinócitos atípicos (Malvey et al. 2015). Na camada córnea, observa-se paraceratose, hiperceratose e ortoceratose (inclusive no folículo piloso e no acrosiríngeo). Nas camadas granulosa e espinhosa há acantose irregular, perda da maturação e da polarização celular e pleomorfismo celular e nuclear. Na camada basal, observam-se ceratinócitos atípicos despolarizados, pleomorfismo celular e nuclear. Já na derme, há elastose solar, aumento da vascularização, vasodilatação e infiltrado inflamatório linfocitário superficial (Ulrich et al. 2008).

Como a análise histopatológica não é realizada de forma rotineira, algumas técnicas não invasivas estão sendo estudadas para aumentar a acurácia diagnóstica e permitir o acompanhamento da resposta terapêutica. Há relatos de adequada correlação entre a microscopia confocal a laser (MCL) e a histopatologia (Nguyen et al. 2016, Tan et al. 2016, Ulrich et al. 2008), com coeficiente de correlação de Pearson (grau de correlação entre duas variáveis de escala métrica) igual a 0,740 (Pellacani et al. 2015). As classificações através da dermatoscopia, MCL e histopatologia têm correspondência com a classificação clínica, como é exposto no Quadro 1.

Quadro 1 – Correspondência das classificações dos três graus da CA através da clínica, dermatoscopia, MCL e histopatologia

Graus	I	II	III
Clínica	Mais palpável e pouco visível	Tanto visível quanto palpável	Espessa e ceratótica
Dermatoscopia	Pseudorede vermelha	Fundo vermelho com aberturas foliculares ceratóticas (em “morango”)	Áreas amorfas branco-amareladas
Microscopia confocal a laser	Áreas com padrão em favo de mel atípico na camada espinhosa	Atipia dos ceratinócitos nas camadas espinhosa e granulosa	Favo de mel desarranjado em toda epiderme
Histopatologia	Atipia dos ceratinócitos basais no terço inferior da epiderme	Atipia dos ceratinócitos nos 2/3 inferiores da epiderme, hiperkeratose, ortokeratose alternada com parakeratose e acantose	Ceratinócitos atípicos em toda espessura da epiderme, parakeratose, acantose, papilomatose e envolvimento das estruturas anexiais

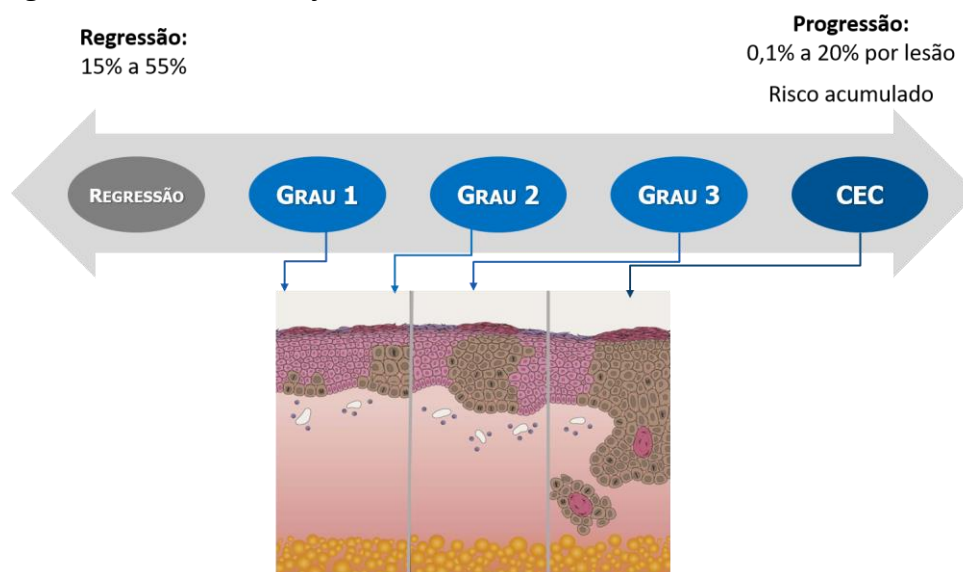
Legenda: Ceratose actínica (CA); Microscopia confocal a laser (MCL).

Fonte: Adaptado de Richtig et al. (2010) e Zalaudek et al. (2014).

1.1.6 Vias de evolução

Uma vez desenvolvida, a CA pode apresentar três caminhos diferentes de evolução: regressão espontânea, persistência ou transformação para carcinoma espinocelular (CEC), como ilustrado na Figura 2.

Figura 2 - Vias de evolução da ceratose actínica



Nota: A taxa de regressão espontânea varia de 15 a 55% em dois anos de acompanhamento (Harvey et al., 1996). É estimado que a taxa de transformação para carcinoma espinocelular (CEC) seja de 0,1 a 20% por lesão (Ishioka et al., 2015). Porém, o risco relativo é proporcional ao número de lesões: em torno de 1% para pacientes com até cinco lesões e aumenta para 20% nos pacientes com mais de 20 lesões (Zalaudek et al., 2014). A evolução da ceratose actínica (CA) para CEC pode ocorrer através da progressão dos três diferentes graus ou diretamente da CA com o envolvimento limitado ao terço inferior da epiderme (Fernandez, 2017). Porém, não há marcadores preditores desta evolução (Dirschka et al., 2017), assim como a espessura da CA não configura mais um fator de risco da progressão para CEC (Heerfordt et al., 2016).

Fonte: A autora, 2019.

As avaliações histológicas demonstram que 60 a 80% dos CECs surgem a partir de uma CA, corroborando a estratégia do tratamento precoce (Rigel e Steingold. 2013). As características das CAs que se associam com maior risco de progressão para CEC são induração, inflamação, diâmetro superior a 1 cm, crescimento rápido, sangramento e ulceração. Outros fatores são pigmentação, dor, prurido e hiperqueratose.

As lesões localizadas nos lábios e nas orelhas apresentam maior risco de progressão para CEC, surgimento de metástases e recorrência tumoral, proporcionais ao tamanho da lesão (> 2 cm) e à baixa diferenciação celular tumoral. A prevalência de metástase nos lábios é de 13 a 20,6% e nas orelhas é de 11%, comparados com 5,2 a 6,5% dos CECs cutâneos nas demais localizações. A recorrência é mais frequente nos CECs localizados na orelha (18,7%) e no lábio (10,5%), em comparação aos localizados nas outras regiões fotoexpostas (7,9%) (Rigel e Steingold. 2013).

Outra causa relacionada ao aumento do risco de transformação para CEC é a extensão folicular da CA, também associada à recorrência tumoral, mais comum na região da cabeça e

do pescoço. É possível que o envolvimento folicular abaixo do infundíbulo funcione como um facilitador à infiltração, devido à ativação das células-tronco adultas durante o ciclo folicular (Fernandez. 2017).

1.1.7 Seguimento e prevenção

A avaliação do paciente com CA deve incluir o exame de todo tegumento com regularidade. Pacientes com poucas CAs podem ser vistos duas vezes ao ano. Já aqueles com alto risco (história prévia de câncer de pele, imunossupressão, múltiplas CAs, principalmente as de grau III) devem ser vistos a cada três ou quatro meses (Zalaudek et al. 2014).

A prevenção da CA inclui medidas primárias e secundárias. Dentre as medidas de prevenção primária estão a informação e a educação quanto à proteção solar. Dentre as medidas de prevenção secundária estão o autoexame prévio à consulta médica, a detecção e o tratamento precoces, evitando-se a possível progressão para CEC. Destaca-se a relevância da prevenção na população transplantada (especialmente renal), com maior risco para o desenvolvimento de CA e CEC (Ferrándiz et al. 2014).

1.1.8 Tratamento

Diversas opções de terapias minimamente destrutivas e de agentes tópicos estão disponíveis, com taxas de resposta terapêutica que variam de 50 a 98%, como ilustrado na Figura 3. A escolha da melhor opção terapêutica depende do número, tamanho e localização das lesões de CA. Há também fatores relativos ao paciente, como compreensão, idade, condições gerais de saúde e a realização de tratamentos prévios no mesmo local anatômico. Além dos fatores relacionados ao método, como custo, segurança, tolerabilidade, eficácia e os objetivos estéticos finais (Ferrándiz et al. 2014, Zalaudek et al. 2014). Porém, ainda não há consenso na literatura sobre a melhor escolha de tratamento para a CA e o campo de cancerização, sendo muitas vezes indicada a associação dos métodos destrutivos aos tratamentos tópicos, com o objetivo de reduzir a recorrência tumoral.

Figura 3 - Taxas de resposta clínica das CAs às diferentes opções de tratamento

DIRECIONADO À LESÃO	Curetagem/ <i>shave</i> / excisão	Não documentada
	Crioterapia com nitrogênio líquido	75-98%
	Laser CO2	~90%
DIRECIONADO AO CAMPO	Terapia Fotodinâmica	70-90%
	Retinoide tópico	~80%
	Imiquimode 5%	55-80%
	Diclofenaco 3% gel	50-80%
	Peeling químico	~75%
	Mebutato de ingenol	56-75%
	5FU	50%

Legenda: Ceratose actínica (CA).

Nota: O tratamento pode ser dividido em direcionado à lesão isolada de CA ou ao campo de cancerização (lesões subclínicas adjacentes às lesões clínicas de CA, mais comuns em pacientes que apresentam mais de 6 lesões de CA por área anatômica).

Fonte: Modificado de Ulrich et al. 2010, Zalaudek et al. 2014.

1.1.8.1 Tratamento direcionado à CA isolada

Os tratamentos direcionados à lesão são particularmente úteis nas CAs isoladas. Dentre as opções terapêuticas estão a crioterapia, a eletrocirurgia, a biopsia por *shave* e a excisão (Zalaudek et al. 2014). Esses procedimentos requerem anestesia local (exceto na crioterapia) e podem evoluir com cicatrizes ou alterações pigmentares. Em geral são métodos de rápida execução e com boa eficácia (Ferrándiz et al. 2014).

1.1.8.2 Tratamento do campo de cancerização

O tratamento direcionado ao campo de cancerização pode promover períodos de remissão mais prolongados. É indicado para os pacientes que apresentam múltiplas lesões de CA na mesma área anatômica com sinais de fotodano acentuado (Torezan e Festa-Neto.

2013). Não há consenso entre os autores sobre a definição do campo de cancerização através da contagem das lesões clínicas. As opções mais utilizadas são: terapia fotodinâmica, 5-fluoracil, imiquimode, mebutato de ingenol e diclofenaco (Ferrándiz et al. 2014).

1.1.8.3 Outras opções terapêuticas

Os retinoides sistêmicos, a dermoabrasão, os peelings químicos e o laser de CO₂ são considerados tratamentos de segunda linha ou coadjuvantes e podem ser indicados em casos selecionados (Ferrándiz et al. 2014).

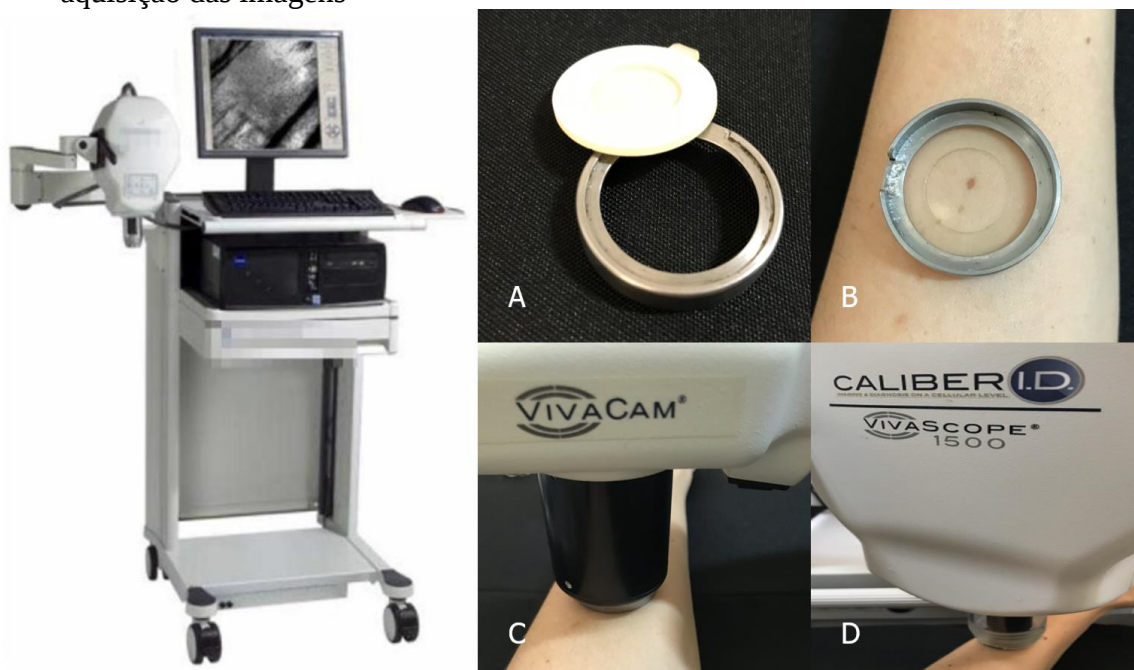
Outras opções não disponíveis no Brasil são o resiquimode (imunomodulador imidazólico com ação através do TLR-7 e TLR-8) e o 5-fluoracil combinado com o ácido salicílico na mesma formulação (Torezan e Festa-Neto. 2013).

1.2 Microscopia confocal a laser (MCL)

1.2.1 Princípios básicos

O microscópio confocal foi criado por Marvin Minsky em 1957. Entretanto, foi necessário o desenvolvimento de uma fonte de luz adequada e de tecnologia computadorizada, para possibilitar a sua utilização na pele humana. O primeiro uso do microscópio confocal a laser *in vivo*, na pele humana, ocorreu em 1995. Vários aparelhos foram produzidos, mas somente dois modelos foram comercializados: o Vivascope® 1500 e 3000. O modelo 3000 possui uma lente de menor diâmetro e uma ponteira manual, que torna mais fácil o uso nas áreas curvas da face e mais rápido o exame, porém com as desvantagens da menor resolução e da não associação com a dermatoscopia (Hofmann-Wellenhof et al. 2012; Rezze e Cazagrande. 2016). Nesse estudo, será utilizado o modelo Vivascope® 1500, como ilustrado na Figura 4.

Figura 4 - Microscópio confocal a laser modelo Vivascope® 1500 e a sequência para aquisição das imagens



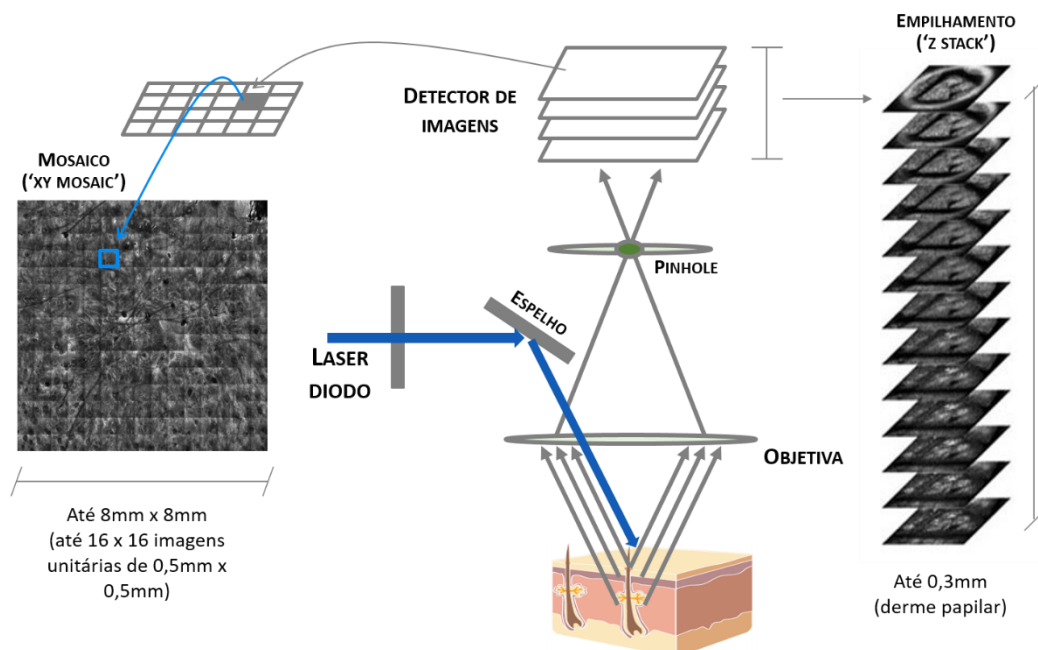
Legenda: Imagem do microscópio confocal a laser Vivascope® 1500 (à esquerda) e, à direita, os quatro passos mais importantes para a aquisição das imagens: A - Cola-se o anel plástico adesivo ao anel metálico; B - Após a aplicação do óleo de interface na pele do paciente, fixa-se o anel à pele; C - Dermatoscopia através da câmera digital (Viva Cam, Lucid Inc, Rochester, NY, USA), a qual guia a aquisição da imagem de Microscopia confocal a laser; D - Aplica-se gel de ultrassom (índice de refletância semelhante ao da camada córnea) e acopla-se a lente do microscópio ao anel metálico.

Fonte: A autora, 2019.

A palavra *LASER* é um acrônimo criado pelo físico Gordon Gould, que significa *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* (amplificação da luz pelo efeito da emissão estimulada da radiação). É constituído por radiação monocromática, coerente e colimada. O comprimento de onda é o que define a especificação do laser. Quando atinge a pele, a luz pode ser absorvida, refletida, transmitida ou dispersada (Raulin e Karsai. 2011).

O Vivascope® utiliza o laser de diodo, que possui comprimento de onda de 830 nanômetros (nm) e lentes objetivas de 30x de aumento. A profundidade alcançada é de até 0,3mm, equivalente à derme papilar. A potência do laser é baixa, menor que 30mW, de forma a não causar dano à pele ou aos olhos (Hofmann-Wellenhof et al. 2012). O mecanismo de funcionamento deste aparelho está ilustrado na Figura 5.

Figura 5 - Mecanismo de funcionamento do Vivascope 1500

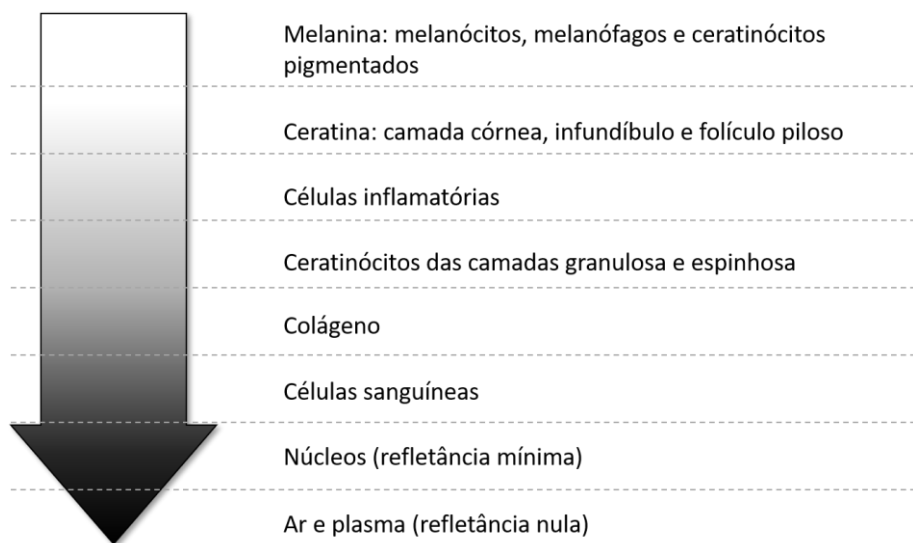


Nota: O aparelho emite o laser diodo de baixa potência que irá atingir o ponto da pele escolhido pelo examinador. Este será refletido por este ponto, amplificado pela objetiva em 30x e passará por uma pequena abertura (*pinhole*), que otimizará a nitidez da imagem que será formada no detector. O *pinhole* não permite que a luz refletida a partir de outro ponto do tecido alcance o detector e apenas a luz que está no foco (confocal) seja detectada. Uma única imagem permite a avaliação de uma área de 0,5x0,5 mm. Para a avaliação da lesão inteira, diversos pontos podem ser capturados e combinados, formando um mosaico com área de até 8x8mm. A avaliação também pode ser feita através do empilhamento vertical das imagens (*Z stacks*) com a captura sequencial desde a superfície até a profundidade de 0,3 mm.

Fonte: A autora, 2019.

O contraste das imagens ocorre pela diferença dos índices de refletância das organelas e das microestruturas da pele, sem a necessidade de corantes ou marcadores fluorescentes. As imagens produzidas são em preto, branco e em escalas intermediárias de cinza. A interpretação das mesmas baseia-se no reconhecimento dos padrões de refletância das estruturas celulares e teciduais (González et al. 2014), como representado na Figura 6.

Figura 6 - Índices de refletância das estruturas teciduais e celulares cutâneas (em ordem decrescente)

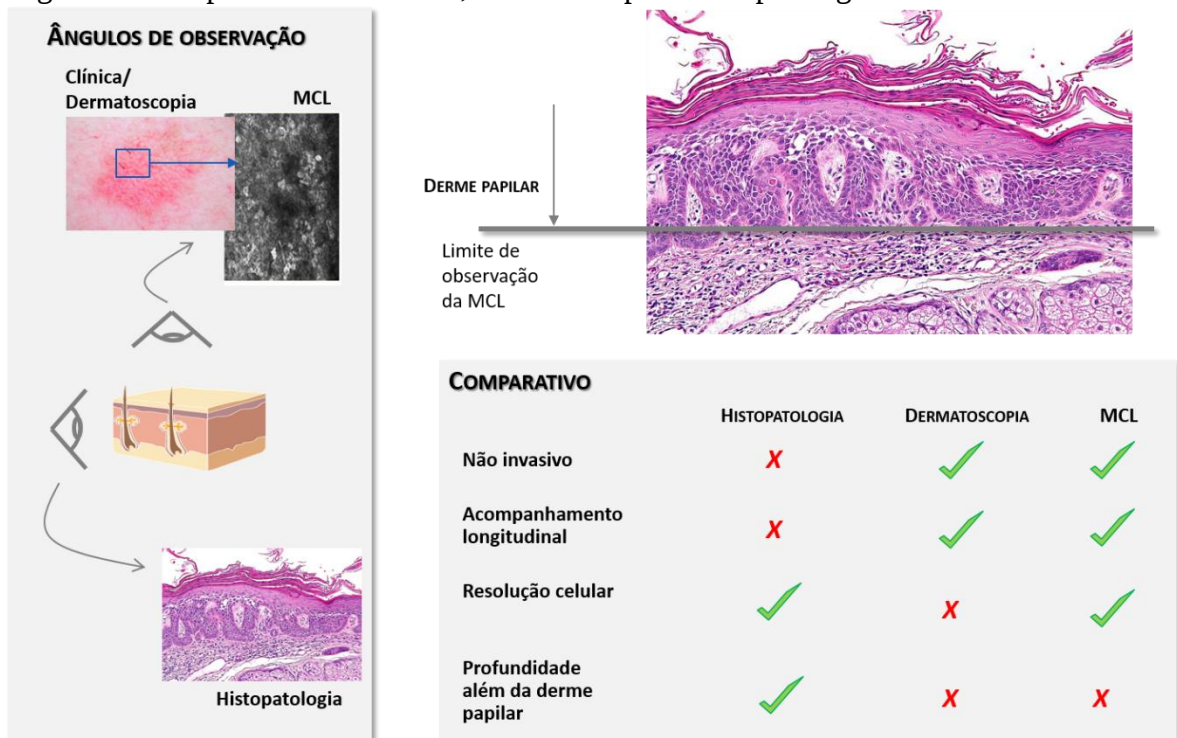


Nota: As estruturas com maior brilho (cor próxima ao branco) possuem um alto índice de refletância (n). Os componentes da pele com maiores índices são aqueles que contêm melanina (n=1,72) ou ceratina (n=1,51). Esses componentes aparecem brilhantes, circundados pela epiderme (n=1,34) e derme (n=1,41) mais escuras. Os menores índices de refletância são encontrados nos núcleos celulares, no ar e no plasma. Nestes dois últimos, a refletância é nula, sendo representados pela cor preta. As demais estruturas (células de Langerhans, colágeno e células sanguíneas) apresentam índices de refletância intermediários e são representadas por diferentes tons de cinza.

Fonte: A autora, 2019.

A MCL foi aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para uso na avaliação da pele humana, em outubro de 2008. Apresenta utilidade no diagnóstico e no monitoramento da resposta terapêutica das lesões cutâneas (Ahlgrimm-Siess et al. 2009). Diferente da histopatologia, a mesma lesão poder ser seguida ao longo do tempo, sem alteração tecidual e com resolução celular, evitando-se biopsias desnecessárias (Ulrich et al. 2015). As principais diferenças entre a MCL, a dermatoscopia e a histopatologia são representadas na Figura 7.

Figura 7 - Comparativo entre MCL, dermatoscopia e histopatologia



Legenda: Microscopia confocal a laser (MCL).

Nota: As imagens obtidas pela clínica, dermatoscopia e MCL são em planos paralelos à pele, diferente dos cortes histológicos convencionais, em planos perpendiculares à superfície cutânea. A vantagem da histopatologia é a possibilidade da avaliação em resolução celular e com profundidade além da derme papilar. Já a dermatoscopia é um método de imagem não invasivo que permite o acompanhamento longitudinal da lesão e, consequentemente, da sua resposta terapêutica. A MCL alia os benefícios de ser um método não invasivo que permite o acompanhamento longitudinal da lesão com a resolução celular. Porém, diferente da histopatologia, limita-se a uma profundidade de até 0,3mm (equivalente à derme papilar).

Fonte: A autora, 2019.

1.2.2 Pele normal à microscopia confocal a laser

Para a correta interpretação das imagens da pele anormal, faz-se necessário um breve resumo das características da pele normal vistas à MCL.

Na epiderme, os ceratinócitos se maturam e constituem quatro camadas distintas, que podem ser diferenciadas de acordo com as suas características arquiteturais e citológicas. A camada córnea, mais superficial, é composta por ceratinócitos grandes, brilhantes, achatados, anucleados e poligonais. Sua espessura varia conforme o sítio anatômico e a exposição solar recebida ao longo do tempo. A camada granulosa também possui ceratinócitos poligonais, contendo grânulos de cerato-hialina no citoplasma e núcleo grande e oval. À MCL, essas células apresentam-se com citoplasma granuloso e núcleo oval escuro, dispostos em um

padrão chamado de favo de mel. A camada espinhosa é composta por ceratinócitos menores que também apresentam padrão de núcleo escuro central, borda bem demarcada e citoplasma brilhante. A camada basal é composta de somente uma fileira de ceratinócitos colunares e melanócitos regularmente distribuídos (Hofmann-Wellenhof et al., 2012).

A MCL da junção epidermo-dérmica (JED) revela papilas bem demarcadas por anéis que circundam a derme papilar. A derme apresenta trama reticular de fibras acinzentadas com vasos centrais, sendo as porções superiores da derme fisiologicamente circundadas pelos anéis de células bem demarcadas e brilhantes (Hofmann-Wellenhof et al., 2012).

1.2.3 Microscopia confocal a laser na avaliação da ceratose actínica

A MCL constitui um método não invasivo de grande utilidade na avaliação celular da CA e no acompanhamento da sua resposta terapêutica, pois a CA é uma lesão que se limita à epiderme, não sendo necessária a análise além da derme papilar. As alterações iniciais da morfologia epidérmica e a atipia celular podem ser avaliadas através da MCL antes de se tornarem clinicamente aparentes. Desta forma, a MCL é útil também na avaliação do campo de cancerização (Pellacani et al. 2015, Peppelman et al. 2015, Ulrich et al. 2010). O método tem sensibilidade de 80 a 90,84%, especificidade de 77,50 a 98,6%, valor preditivo positivo de 80,65% e valor preditivo negativo de 89% para o diagnóstico da CA (Aghassi et al., 2000; Horn et al., 2008). Os critérios observados à MCL e à análise histopatológica (AH) estão listados no Quadro 2, a seguir.

Quadro 2 – Critérios observados à MCL e à histopatologia na avaliação das CAs não pigmentadas (continua)

Autor, ano	n MCL/ n biopsia - método (desenho)	Critérios observados à MCL e à AH (frequência em %)	S/E (%)	Vivascope [®] (tipo)
Aghassi et al. 2000	7/ 3 – <i>punch</i> 2mm (caso-controle)	Descritivos: hiperkeratose (71%), pleomorfismo nuclear na CE (100%), na CG (14%), desarranjo arquitetural na CE (57%); sem avaliação dos parâmetros dérmicos	-	1500
Horn et al. 2008	30/ 15 - curetagem (caso-controle)	Camada córnea irregular, padrão em favo de mel atípico, perda da estratificação epidérmica, disceratose e polimorfismo nuclear	91/ 78	1500
Rishpon et al. 2009	7/ 7 – N/E (série de casos)	Descamação (100%), parakeratose (14%), moderada atipia do padrão em favo de mel (100%), disceratose (14%) e VD (72%)	-	1500
Eichert et al. 2010	3/ 3 – N/E (revisão)	Hiperkeratose, ceratinócitos atípicos com contornos celulares irregulares e pouco definidos	-	1500
Richtig et al. 2010	10/ 10 – <i>shaving</i> (série de casos)	Perda da estratificação epidérmica (100%), polimorfismo celular e nuclear (100%), contornos celulares irregulares (100%) e disceratose (100%)	-	1500
Bassoli et al. 2012	6/ 6 – N/E (série de casos)	Descamação (50%), padrão em favo de mel atípico com espessamento intercelular (83,3%), inflamação dérmica (33,3%) e VD (66,7%)	-	1500
Incel et al. 2014	8/ 8 – N/E (série de casos)	Descamação, parakeratose, polimorfismo celular, atipia do padrão em favo de mel, VD, inflamação epidérmica e dérmica	93/ 97	3000

Quadro 2 – Critérios observados à MCL e à histopatologia na avaliação das CAs não pigmentadas (conclusão)

Autor, ano	n MCL/ n biopsia (desenho)	Critérios observados à MCL e à AH (frequência em %)	S/E (%)	Vivascope [®] (tipo)
Peppelman et al. 2014	24/ 24 – <i>punch</i> 3mm (série de casos)	Córnea: descamação, hiperqueratose, parakeratose e inflamação. CG e CE: padrão em favo de mel típico/ atípico, desarranjo arquitetural, inflamação, pleomorfismo nuclear e celular. Derme: VD, rolamento linfocitário, elastose solar e inflamação	-	1500
Farnetani et al. 2015	3/ 3 – N/E (série de casos)	Papilas dérmicas mal definidas (96,3%), JED inespecífica (59,3%), células inflamatórias isoladas (55,6%), bandas de colágeno (33,3%), atipia celular (29,6%) e arquitetura epidérmica irregular (11,1%)	84,8-91/ 77,9-80	1500

Legenda: Microscopia confocal a laser (MCL); ceratose actínica (CA); número de casos (n); sensibilidade (S); especificidade (E); camada granulosa (CG); camada espinhosa (CE); não especificado (N/E); vasodilatação (VD); junção epidermo-dérmica (JED).

Nota: No estudo de Aghassi et al. (2000), 3 das 4 lesões clinicamente compatíveis com ceratose actínica apresentaram confirmação histopatológica deste diagnóstico, enquanto 1 era compatível com carcinoma espinocelular. No trabalho de Horn et al. (2008), 15 das 30 lesões submetidas à microscopia confocal a laser foram tratadas com curetagem. Em todos os estudos citados, o material analisado à histopatologia foi utilizado exclusivamente para confirmação diagnóstica, sem avaliação da concordância com os respectivos critérios à microscopia confocal a laser. Estes critérios não tiveram sua avaliação padronizada. Locais anatômicos diferentes foram examinados em cada estudo.

Fonte: A autora, 2019.

No estudo publicado por Ulrich et al. (2008), o grau de concordância entre MCL e histopatologia (material obtido através de biopsia por *punch* 4mm) foi classificado em excelente, alto ou moderado. Excelente concordância (94,6-98,2%) entre os avaliadores foi relatada na identificação de pleomorfismo nas CG e CE. Reprodutibilidade alta foi observada nos critérios: células inflamatórias (89,2-94,6%), espongiose na CG (87,5%), na CE (89,3%) e parakeratose (87,5%). Concordância moderada foi encontrada para vasodilatação (82,1%), perda arquitetural nas CG (75%) e CE (85,7%), exocitose na CG (82,1%), elastose solar (82,1%) e rolamento linfocitário (87,5%). Estes dois últimos não apresentaram significância estatística ($p=0,569$ e $p=0,123$, respectivamente). Os critérios relatados com maiores índices de sensibilidade e especificidade (através da análise Rho de Spearman) foram o desarranjo arquitetural e o pleomorfismo celular observados nas CG e CE.

Os critérios mais relevantes na distinção entre CA e CEC são o desarranjo arquitetural epidérmico que se estende à camada granulosa e a presença de ninhos tumorais dérmicos encontrados exclusivamente no CEC (Peppelman et al. 2015). Neste mesmo estudo, é relatada também menor incidência de paraceratose, inflamação epidérmica e dérmica no CEC. Os demais critérios são apresentados no Quadro 3 e descritos no Quadro 4.

Quadro 3 - Critérios diagnósticos da CA e do CEC à MCL

Critérios à MCL	CA	CEC
Camada córnea		
Hiperceratose	X	X
Paraceratose	X	
Ortoceratose	X	
Células inflamatórias	X	X
Descamação	X	X
Camada granulosa		
Padrão em favo de mel típico	X	
Padrão em favo de mel atípico	X	
Desarranjo arquitetural		X
Pleomorfismo celular e nuclear	X	X
Camada espinhosa		
Padrão em favo de mel atípico	X	X
Disceratose	X	X
Desarranjo arquitetural	X	X
Pleomorfismo celular e nuclear	X	X
Espongiose	X	X
Exocitose	X	
Junção epidermo-dérmica		
Vasodilatação	X	
Aumento do número de vasos		X
Aumento do fluxo vascular		X
Derme		
Elastose solar	X	X
Células inflamatórias	X	
Pérolas córneas		X
Estruturas em ninho		X

Legenda: Ceratose actínica (CA); Carcinoma espinocelular (CEC); Microscopia confocal a laser (MCL). As denominações empregadas como na histopatologia se justificam pelo caráter descritivo associado às mesmas estruturas à microscopia confocal a laser.

Fonte: Adaptado de Peppelman et al. (2015).

Quadro 4 - Descrição dos critérios diagnósticos da CA e do CEC, à MCL

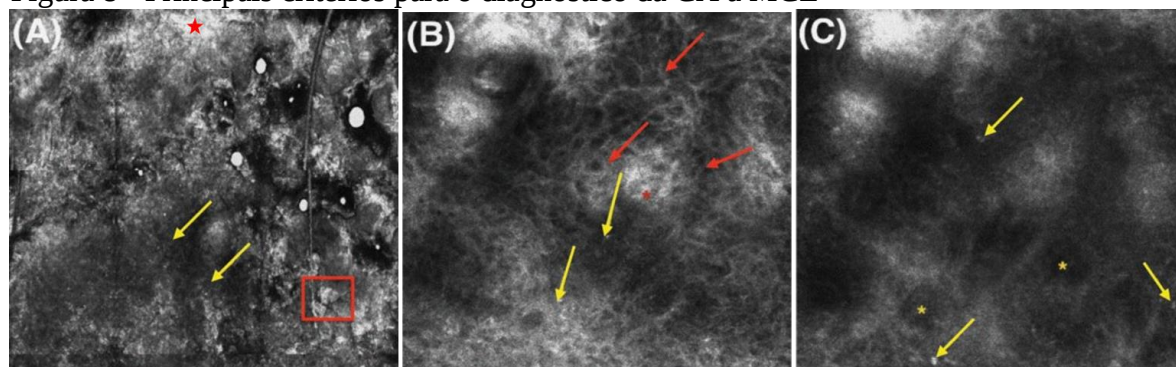
Hiperceratose	Camada córnea com espessura > 0,015mm
Paraceratose	Células nucleadas na camada córnea
Ortoceratose	Hiperceratose sem paraceratose
Descamação	Material amorfo acima da camada córnea
Células inflamatórias	Estruturas de alta refletância, com 0,008-0,01mm
Disceratose	Células redondas e nucleadas nas CG e CE
Padrão em favo de mel típico (padrão normal nas CG e CE)	Ceratinócitos regulares e uniformes com espaçamento que se assemelha a um favo de mel
Padrão em favo de mel atípico	Ceratinócitos com formatos irregulares
Desarranjo arquitetural	Desestruturação do padrão epidérmico, no qual não é mais possível observar o favo de mel
Pleomorfismo nuclear e celular	Variações dos tamanhos e formatos do núcleo e da célula
Espongiose	Aumento dos espaços intercelulares devido ao acúmulo de fluido entre os ceratinócitos
Exocitose	Células inflamatórias de alta refletância na epiderme
Vasodilatação	Diâmetro vascular > 0,005mm
Aumento do número de vasos	Mais de 5 vasos por imagem de 0,5x0,5mm
Elastose solar	Rede de colágeno de alta refletância e espessura em meio a fibras elásticas de refletância moderada
Pérola córnea	Acúmulo de ceratina de alta refletância na derme
Estruturas em ninho na derme	Estruturas arredondadas circundadas por fibrose na derme

Legenda: Ceratose actínica (CA); Carcinoma espinocelular (CEC); Microscopia confocal a laser (MCL); camada granulosa (CG); camada espinhosa (CE).

Fonte: Peppelman et al. (2015).

Assim sendo, estão representados na Figura 8 os principais critérios para o diagnóstico da CA à MCL. Na camada córnea: hiperqueratose, paraceratose e descamação. Na camada espinhosa: disqueratose, perda do padrão típico em favo de mel (gradação da atipia epidérmica proposta por Pellacani et al. (2015), representada na Figura 9) e infiltrado inflamatório linfocitário. E na derme: presença de infiltrado inflamatório linfocitário (representados em maior detalhe na Figura 10). O critério de alteração arquitetural epidérmica com pleomorfismo celular é o melhor preditor diagnóstico (Ulrich et al. 2010). Os critérios dérmicos de elastose solar e vasodilatação estão presentes em apenas 31% dos casos (Ishioka et al. 2015).

Figura 8 - Principais critérios para o diagnóstico da CA à MCL

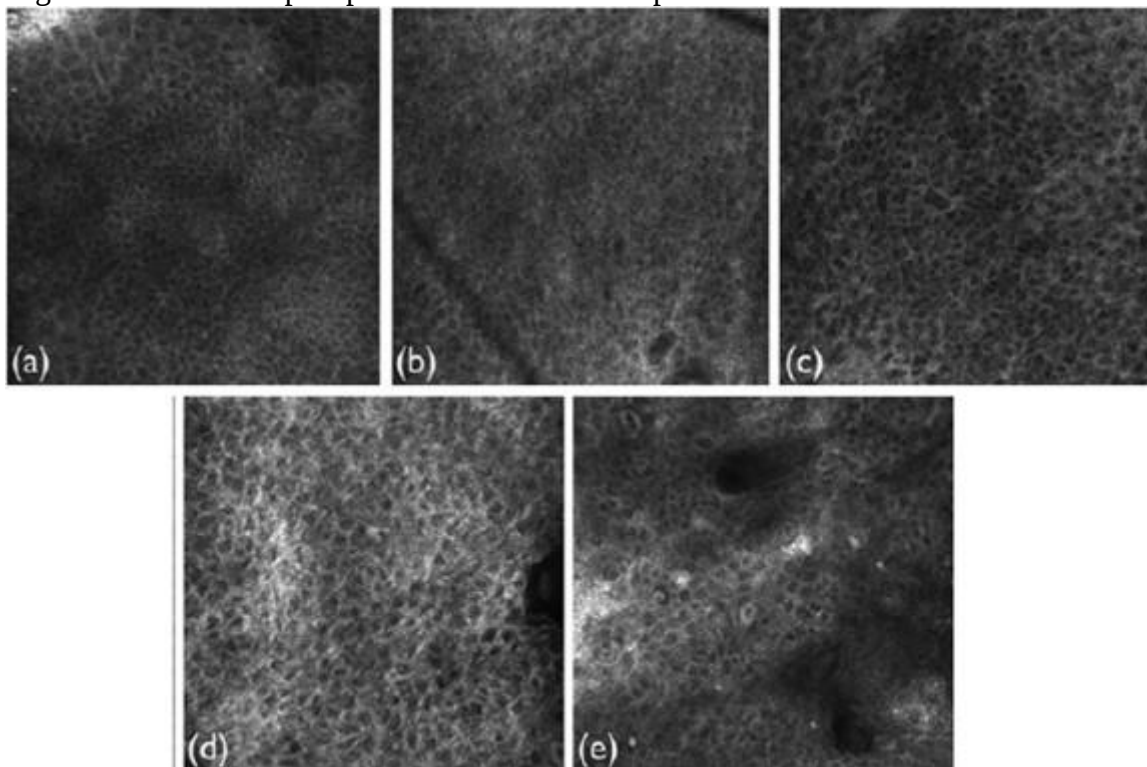


Legenda: Ceratose actínica (CA); Microscopia confocal a laser (MCL).

(A) Camada córnea: superfície hiperqueratótica (asterisco vermelho), grandes estruturas de alta refletância que correspondem à descamação (quadrado vermelho) e células nucleadas poligonais correspondentes à paraceratose (setas amarelas); (B) Camada espinhosa: padrão em favo de mel atípico caracterizado por células grandes e nucleadas com variadas dimensões e morfologias (setas vermelhas) e células inflamatórias (setas amarelas). As conexões intercelulares são irregulares e espessas (asterisco vermelho); (C) Camada dérmica: presença de células inflamatórias (setas amarelas). As papilas dérmicas são pouco visíveis ou mal definidas (asterisco amarelo).

Fonte: A autora, 2019.

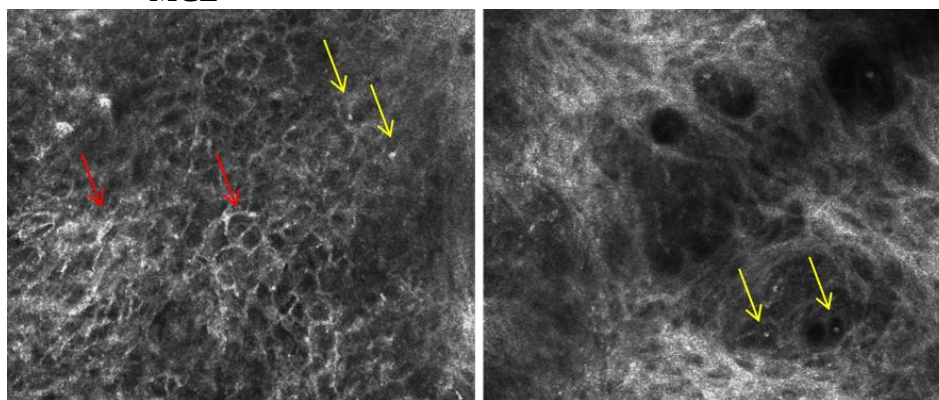
Figura 9 - Grau de atipia epidérmica na camada espinhosa



Legenda: À Microscopia confocal a laser (MCL): (a) Grau 1: leve irregularidade dos ceratinócitos; (b) Grau 2: perda parcial do contorno dos ceratinócitos; (c) Grau 3: ceratinócitos com diferentes tamanhos e formas e espessamento do contorno celular (d) Grau 4: maior atipia ceratinocítica e contorno intercelular brilhante; (e) Grau 5: pleomorfismo intenso com presença de células em alvo, células grandes e bizarras com contornos irregulares e núcleos proeminentes.

Fonte: Pellacani et al. 2015.

Figura 10 - Infiltrado inflamatório linfocitário na epiderme e na derme, à MCL



Legenda: Microscopia confocal a laser (MCL).

Nota: À esquerda (epiderme): células redondas (setas amarelas) e dendríticas (setas vermelhas) de alta refletância. À direita (derme): pequenos pontos de alta refletância (setas).

Fonte: A autora, 2019.

A vantagem principal do método é a oportunidade única de se obter imagens *in vivo* com resolução próxima à da microscopia convencional. Imagens em tempo real podem ser obtidas e avaliadas à beira do leito (Horn et al. 2008). Detalhes arquiteturais e celulares podem ser examinados sem a necessidade da excisão e do processamento teciduais, viabilizando a avaliação de um grande número de lesões. Esta tecnologia permite a coleta de informações dinâmicas que ocorrem no curso da doença, sem artefatos histológicos, facilitando a avaliação celular da resposta terapêutica da CA (Pellacani et al. 2015) e do campo de cancerização (Malvey et al. 2015).

As limitações técnicas da MCL incluem o tempo prolongado para aquisição das imagens correspondentes a grandes áreas anatômicas, além da profundidade alcançada de apenas 0,3mm, equivalente à derme papilar. Nas lesões hiperkeratóticas, as quais são mais suspeitas de malignidade, a MCL apresenta resolução e penetração reduzidas, com alcance máximo até a camada espinhosa. Os resultados são técnico-dependentes, com reprodutibilidade variável entre os investigadores. Diferentes tipos de pele mostram diferentes índices de refletância na camada basal, dependendo da quantidade de melanina, variável com o fototipo (Fitzpatrick. 1975) e a exposição solar (Horn et al. 2008).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar a aplicabilidade da microscopia confocal a laser no diagnóstico da ceratose actínica.

2.2 Objetivos específicos

Comparar os resultados aferidos, por critério, na histopatologia e na microscopia confocal a laser.

Determinar a sensibilidade, a especificidade e os valores preditivos positivo e negativo de cada critério à microscopia confocal a laser no diagnóstico da ceratose actínica.

Comparar os parâmetros observados através do exame clínico, dermatoscópico, histopatológico e de microscopia confocal a laser.

3 METODOLOGIA

3.1 Desenho do estudo

Este é um estudo analítico, observacional, transversal, de acurácia, realizado em centro único (HUPE) e auto comparativo (dois métodos aplicados à mesma lesão clínica de CA), para correlacionar os critérios diagnósticos da ceratose actínica à histopatologia e à microscopia confocal a laser (Hochman et al. 2005).

Foi submetido ao Comitê de ética e pesquisa (CEP) do HUPE e aprovado sob o número CAAE 61911116.5.0000.5259 (ANEXO A).

3.2 Casuística

3.2.1 Pacientes

A seleção para o estudo consistia de pacientes diagnosticados com lesões de ceratose actínica nos antebraços, oriundos do ambulatório de Dermatologia do HUPE-UERJ, no Rio de Janeiro (RJ), agendados sob livre demanda.

3.2.2 Critérios de inclusão

- a) Pacientes de ambos os sexos, com idade maior ou igual a 18 anos;
- b) Pacientes com diagnóstico clínico de pelo menos uma lesão de ceratose actínica localizada nos antebraços;
- c) Conhecimento e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), presente no APÊNDICE A.

3.2.3 Crêterios de exclusão

- a) Gestão ou lacta o;
- b) Lesões de CA com suspeita de transforma o para CEC ou hiperkeratose exuberante (grau III);
- c) Não compreensão do TCLE ou recusa pelo paciente, responsável ou familiar em participar do estudo;
- d) Tratamento t pico para CA no local anat mico a ser estudado nas doze semanas anteriores ao estudo;
- e) Pacientes portadores de outras doenças cutâneas na área a ser avaliada.

3.3 **Financiamento**

O projeto não foi financiado por fontes externas ou  g ncias de fomento e dispôs de financiamento próprio. Nenhum pesquisador envolvido no projeto recebeu qualquer tipo de remunera o para a execu o deste estudo.

3.4 Métodos

3.4.1 Avaliação epidemiológica

Todos os pacientes foram submetidos a um questionário (APÊNDICE B), no qual foram coletados os dados demográficos e epidemiológicos, a presença de comorbidades sistêmicas ou cutâneas, o uso de medicamentos e a presença de alergias. Com relação às ceratoses actínicas, o paciente foi questionado sobre os tratamentos prévios realizados nos antebraços, incluindo tipo, duração e tempo decorrido antes da inclusão no estudo. Todos os pacientes foram orientados a evitar exposição solar direta e a utilizarem protetor solar com fator de proteção solar (FPS) maior ou igual a 30 regularmente.

3.4.2 Exame clínico

No exame dermatológico, foram examinados os antebraços dos pacientes, buscando-se a presença de pequenas placas eritematodescamativas, compatíveis com o diagnóstico clínico de CA. Após a seleção das lesões para inclusão no estudo, as localizações das mesmas foram indicadas no esquema de topografia cutânea presente no formulário de avaliação médica (APÊNDICE B), com a respectiva distância em relação à proeminência radial. Estas lesões foram submetidas ao registro fotográfico clínico (Iphone 7 12.0 megapixels, EUA), à avaliação através da dermatoscopia (3Gen Dermlite DL3, EUA, aumento de 10x) e à fotografia da imagem dermatoscópica (3Gen Dermlite DL3 acoplado através de case adaptador Dermlite 3Gen para Iphone 7).

3.4.3 Exame de microscopia confocal a laser

A lesão de CA selecionada foi avaliada *in vivo* através do exame de microscopia confocal a laser (Vivascope® 1500, Caliber Imaging and Diagnostics Inc., Rochester, NY, USA) que se encontra no setor de dermatopatologia do HUPE-UERJ. Óleo foi usado como interface entre a pele e o anel metálico, enquanto gel de ultrassom, entre este anel e o dispositivo de MCL. O mapeamento vertical (Z-stack) foi realizado em cada lesão, guiado pela dermatoscopia (VivaCam Vivascope® 1500, Caliber Imaging and Diagnostics Inc., Rochester, NY, USA) e capturou 200 imagens de 5x5 mm, sequenciais de toda epiderme (camadas córnea, granulosa, espinhosa) e da derme superficial, com cada nova imagem obtida à profundidade de 1,52 micrômetros da anterior. A captura das imagens foi iniciada imediatamente acima da camada córnea. Cada imagem, do total de 5000 imagens, foi examinada por dois dermatologistas experientes em MCL e os dados obtidos foram registrados em formulário próprio (APÊNDICE C). Os critérios avaliados à MCL estão listados na Figura 11.

Figura 11 - Critérios avaliados através do mapeamento vertical à MCL

Hiperceratose	Ausente - 0	Presente - 1
Paraceratose	Ausente - 0	Presente - 1
Disceratose	Ausente - 0	Presente - 1
Células inflamatórias na epiderme	Ausente - 0	Presente - 1
Grau de atipia na espinhosa	Ausente - 0	Leve irregularidade dos ceratinócitos - 1
	Pleomorfismo intenso com células em alvo, células grandes e bizarras com contorno irregular e núcleo irregular proeminente - 5	Ceratinócitos com diferentes tamanhos, formas e espessamento do contorno celular - 3
Células inflamatórias na derme	Ausente - 0	Presente - 1

Legenda: Microscopia confocal a laser (MCL).

Nota: A hiperceratose foi definida por Peppelman et al. (2015), como camada córnea com espessura superior a 15 micrômetros. O cálculo desta medida é dado por $n \times 1,52$ (espessura de n em micrômetros). Desta forma, a hiperceratose foi classificada como presente quando a contagem de cortes (n) à MCL foi superior a 10. O grau de atipia na espinhosa foi classificado segundo a escala de Pellacani et al. (2015).

Fonte: A autora, 2019.

3.4.4 Análise histopatológica (AH)

A mesma lesão avaliada através da MCL foi submetida ao tratamento por *shaving*, com bisturi descartável de lâmina nº 15, no setor de dermatopatologia do HUPE-UERJ. O tratamento foi precedido por anestesia infiltrativa local com lidocaína 2% injetável sem vasoconstritor, através de seringa descartável associada à agulha Gauge 26 de 13 mm. O material foi armazenado em formaldeído e as análises histopatológicas foram realizadas pela rotina do HUPE-UERJ, na coloração H&E, sob responsabilidade do dermatopatologista Prof. Dr. Juan Maceira (coorientador) e colaboração do biólogo Hélcio F. Frias Júnior, cegos quanto aos resultados obtidos através da MCL. Os mesmos critérios avaliados à MCL (Figura 11) foram utilizados à AH. A avaliação do grau de atipia da camada espinhosa neste trabalho excluiu as gradações 2 e 4 relatadas originalmente por Pellacani et al. (2015) pela não reprodutibilidade histopatológica destas (no referido estudo a classificação mais detalhada em 5 graus foi obtida através de *software*). Os dados encontrados foram preenchidos na ficha de avaliação histopatológica presente no APÊNDICE D.

3.4.5 Análise estatística

O cálculo do tamanho amostral de 25 lesões (com colaboração do estatístico Prof. José Francisco Pessanha – UERJ) foi realizado com base na estimativa do valor preditivo positivo (VPP) da MCL para o diagnóstico da CA obtida na literatura (Horn et al. 2008).

$$n = \frac{P \times (1 - P)}{(P \times CV)^2} \quad (1)$$

n = Tamanho amostral

P = VPP da MCL para avaliação da CA oriundo da literatura (Horn et al. 2008): 80%

CV = Coeficiente de variação (Silva. 1998): 10%.

Os testes de hipóteses aplicados na avaliação da significância de mudanças para estudos onde as amostras são pareadas (McNemar e Wilcoxon) foram utilizados para calcular

a concordância entre os métodos de MCL e AH. O teste de hipótese é uma maneira de tirar conclusões sobre uma população a partir de uma amostra. É constituída de uma hipótese nula (H_0), que indica que a medida da amostra é igual à da população, e uma hipótese alternativa (H_1), a qual indica que há diferença entre essas medidas (Pagano e Gauvreau. 2018). Considerando-se a hipótese formulada de que a MCL é uma técnica útil para o diagnóstico das ceratoses actínicas, tem-se como H_0 : não há distinção significativa entre o resultado da avaliação realizada pela MCL em relação àquela da AH. Tem-se, então, como H_1 : há distinção significativa entre o resultado da avaliação realizada pela MCL e pela AH. Através da validação dessas hipóteses, espera-se manter – ou descartar – a hipótese original.

O teste de McNemar foi aplicado para as variáveis binárias (hiperceratose, paraceratose, disceratose, células inflamatórias na epiderme e na derme). Este teste avalia a significância de mudanças para estudos onde as amostras são pareadas, ou seja, avaliadas em dois momentos distintos, e os dados são classificatórios (Siegel. 1956, Pagano e Gauvreau. 2018). Como os dados para o grau de atipia dos ceratinócitos na camada espinhosa não são binários, o teste de McNemar não pôde ser empregado. Assim, o teste de Wilcoxon foi uma alternativa para avaliar as diferenças entre cada par de observações, e não requer que a distribuição normal. Este teste de hipótese compara a mediana das diferenças para variáveis ordinais contínuas (Pagano e Gauvreau. 2018, Siegel. 1956).

A tabela de contingência (Figura 12) foi utilizada para obtenção dos valores de sensibilidade e especificidade de cada critério diagnóstico da CA à MCL, em relação ao padrão-ouro AH (Pagano e Gauvreau, 2018, Parikh et al. 2008). A sensibilidade é a probabilidade do teste MCL indicar o critério diagnóstico nos casos em que ele realmente está presente. Já a especificidade é a fração daqueles no qual a MCL não mostrou a presença do critério naqueles em que a AH também revelou sua ausência. Ambas são características inerentes ao teste e não influenciadas pela prevalência da doença na população. As equações para seus respectivos cálculos estão representadas a seguir.

Figura 12 - Tabela de contingência

		AH		
		AUSENTE	PRESENTE	
MCL	AUSENTE	VN	FN	VN + FN
	PRESENTE	FP	VP	FP + VP
		VN + FP	FN + VP	

Legenda: Verdadeiro negativo (VN); Falso negativo (FN); Falso positivo (FP); Verdadeiro positivo (VP).

Fonte: A autora, 2019.

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{VP}}{(\text{VP} + \text{FN})} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Especificidade} = \frac{\text{VN}}{(\text{VN} + \text{FP})} \times 100 \quad (3)$$

Através da tabela de contingência, também foram calculados os dados relativos ao valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN). Estes valores são influenciados pela prevalência da doença na população que está sendo testada. As equações para seus respectivos cálculos estão representadas abaixo.

$$\text{VPP} = \frac{\text{VP}}{(\text{VP} + \text{FP})} \times 100 \quad (4)$$

$$\text{VPN} = \frac{\text{VN}}{(\text{VN} + \text{FN})} \times 100 \quad (5)$$

Todos os testes estatísticos consideraram o nível de significância como $p < 0,05$ (5%) para a rejeição ou não da hipótese nula (Pagano e Gauvreau. 2018). O programa Excel (Microsoft Office® 2010, Microsoft Corporation, EUA) foi utilizado nas análises estatísticas.

4 RESULTADOS

4.1 Pacientes

A equipe responsável pelo projeto incluiu 27 lesões no estudo por apresentarem diagnóstico clínico compatível com ceratose actínica e atenderem aos critérios de inclusão e exclusão. Após cautelosa análise através da MCL e AH, duas lesões foram excluídas. Uma devido à colisão com ceratose seborreica, que configurava um viés para correta correlação entre os métodos diagnósticos complementares. Já a segunda lesão foi excluída por apresentar critérios incipientes para o diagnóstico celular de CA, com ausência de paraceratose e atipia pouco significativa dos ceratinócitos da camada espinhosa, sendo melhor definida pelo diagnóstico de CA subclínica ou campo cancerizável, causados pelo intenso fotodano.

4.2 Aspectos demográficos

Foram coletadas 25 amostras válidas de 10 pacientes, sendo 4 do gênero feminino e 6 do gênero masculino, com idade variando entre 68 e 86 anos; e média de 76.7 anos. Referente ao tratamento prévio para CA nos antebraços, com a exceção de um paciente, todos tinham sido submetidos à crioterapia em outras lesões, com tempo superior a 12 meses antes da inclusão neste estudo. Quanto às comorbidades, 3 pacientes não apresentavam nenhuma, 4 apresentavam diabetes *mellitus*, 6 apresentavam hipertensão arterial sistêmica (HAS). Um dos pacientes apresentava osteoporose, além de HAS e dislipidemia. A distribuição dos pacientes segundo a escala de Fitzpatrick (Fitzpatrick, 1975) encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição dos pacientes pela classificação de Fitzpatrick

Escala	I	II	III
Número de pacientes	1	7	2

Fonte: A autora, 2019.

4.3 Aspectos clínicos

De acordo com a classificação clínica das CAs, 16 lesões (64%) foram classificadas como grau I, enquanto 9 (36%), como grau II. Nenhuma ceratose actínica de grau III foi avaliada neste estudo devido ao fato das lesões que apresentavam intensa ceratose terem sido excluídas da pesquisa, pelo possível viés de existir carcinoma espinocelular subjacente.

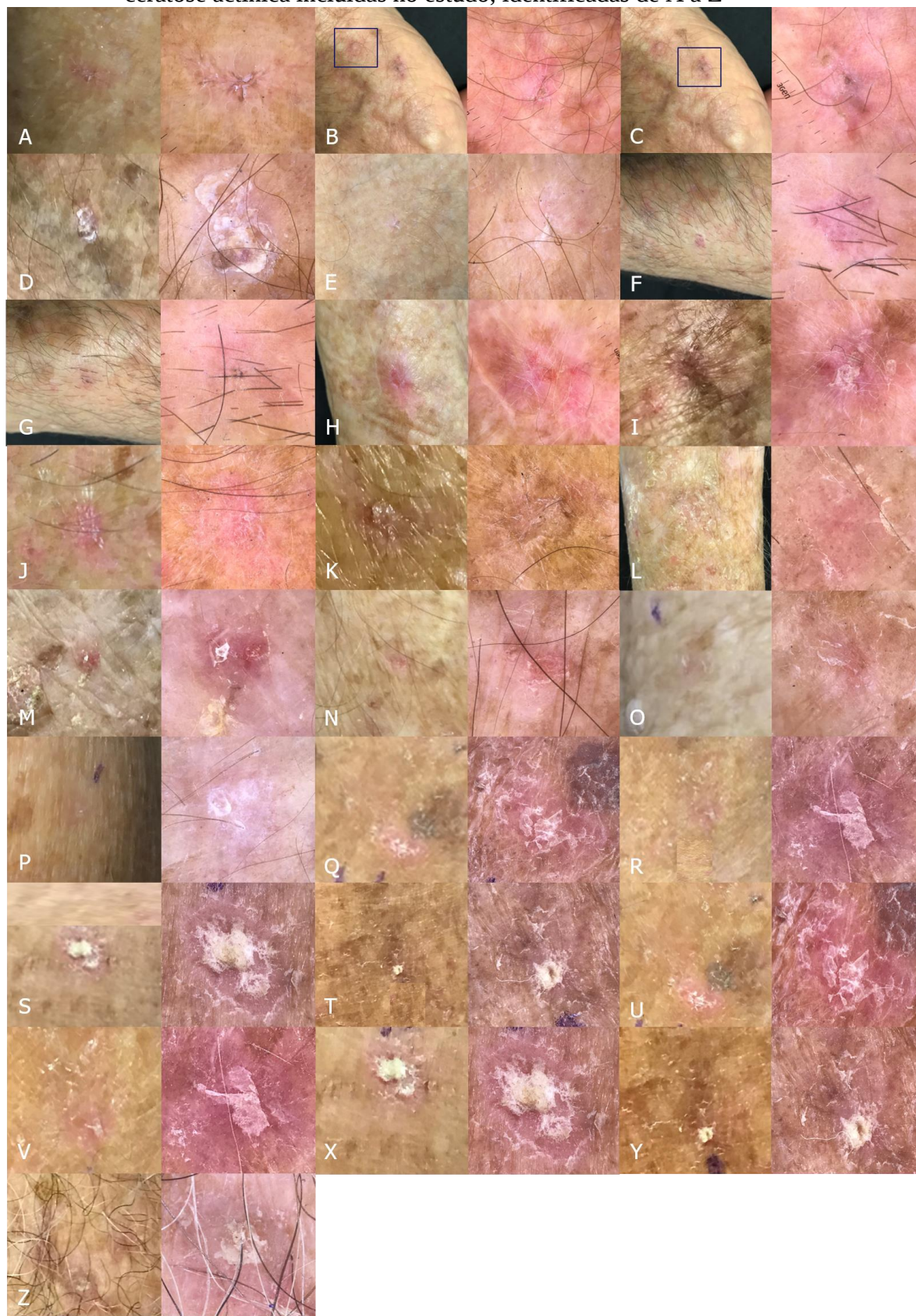
Na Figura 13 estão representadas as imagens clínicas e dermatoscópicas das lesões incluídas no projeto. Observa-se desde aquelas mais palpáveis e pouco visíveis, de difícil identificação na fotografia clínica, porém mais evidentes à dermatoscopia através da pseudorede vermelha (como vistas nas imagens A, B, E-G, I, J, L, N-P, R, T-V e Z), descritas como grau I; até aquelas placas eritematodescamativas nítidas tanto a olho nu quanto à dermatoscopia (fundo vermelho entremeado de aberturas foliculares ceratóticas), ilustradas nas imagens C, D, H, K, M, Q, S, X e Y (grau II).

A dermatoscopia realizada em todos os pacientes auxiliou na observação das lesões pequenas e incipientes, além de corroborar o diagnóstico das clinicamente mais clássicas. Desta forma, evitou-se a inclusão de outros tipos de lesões (como carcinomas basocelulares superficiais, doenças de Bowen, lentigos solares ou ceratoses seborreicas planas), já que os pacientes avaliados apresentavam intenso fotodano e diversidade de lesões cutâneas.

A totalidade dos pacientes apresentava outras lesões de CA nas áreas fotoexpostas (face, couro cabeludo, colo e antebraços) além daquelas abordadas no estudo. Todas foram adequadamente tratadas, através de tratamentos direcionados ao campo de cancerização, à lesão ou através da associação de ambos, de acordo com a avaliação médica.

Não foram observadas reações adversas ao exame de MCL ou à terapêutica por *shaving*, com bons resultados clínicos ao acompanhamento.

Figura 13 - Fotografias clínicas (à esquerda) e dermatoscópicas (à direita) das 25 lesões de ceratose actínica incluídas no estudo, identificadas de A a Z



Fonte: A autora, 2019.

4.4 Aspectos à microscopia confocal a laser

Devido à existência de seis critérios para diagnóstico (hiperceratose, paraceratose, disceratose, células inflamatórias na epiderme, grau de atipia na camada espinhosa e células inflamatórias na derme), descritos na figura 11, foram testadas seis hipóteses diferentes, avaliando-se as H_0 e H_1 para cada critério e consequentemente sua aplicabilidade para o diagnóstico da CA através da MCL, como mostrado nas Tabelas 2 e 3. Os critérios estão exemplificados na figura 14.

Tabela 2 - P-valor correspondente a cada critério diagnóstico obtido pelo Teste de McNemar, aplicado para as variáveis binárias

Critério	p-valor
Células inflamatórias (Epiderme)	1.000000
Disceratose	0.617075
Paraceratose	0.449690
Hiperceratose	0.248213
Células inflamatórias (Derme)	0.013328*

Nota: O asterisco (*) indica diferença estatística significativa entre Microscopia confocal a laser (MCL) e análise histopatológica (AH).

Fonte: A autora, 2019.

Avaliando-se os p-valores da Tabela 2, podemos concluir que não há diferença significativa entre a MCL e a AH para os quatro primeiros parâmetros. Embora a análise dos Gráficos 1 a 5 e das tabelas de contingência (Tabelas 4 a 8) mostre que alguns elementos foram avaliados como ausentes na MCL, mas encontram-se presentes após a AH, estatisticamente esta diferença não é significativa.

Para a presença de células inflamatórias na derme, o p-valor encontra-se abaixo do nível de 5%. Portanto, rejeita-se a hipótese nula e conclui-se que o equipamento de MCL não realizou uma análise adequada deste critério.

Tabela 3 - P-valor obtido pelo Teste de Wilcoxon aplicado ao critério contínuo

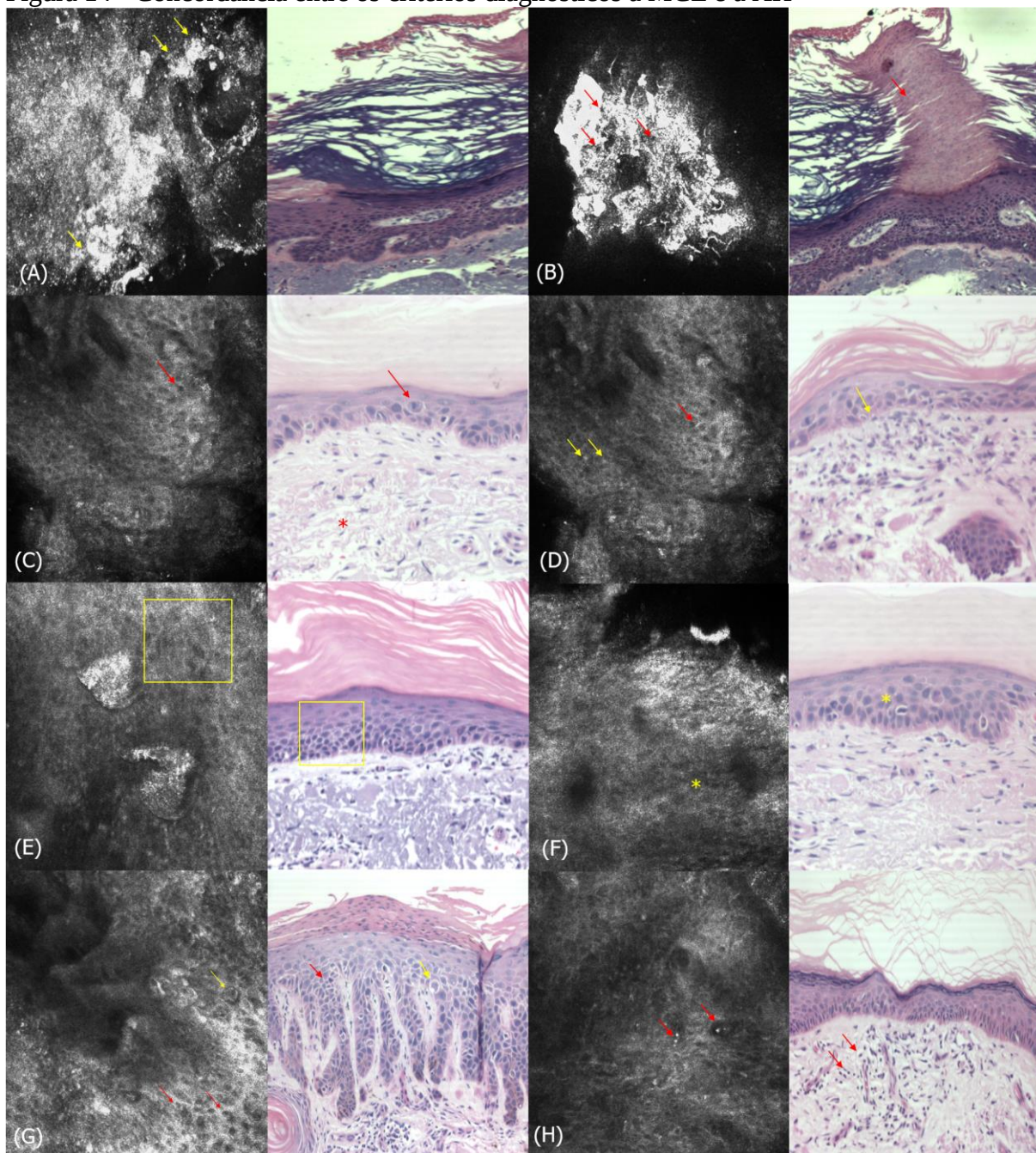
Critério	p-valor
Grau de Atipia	0.145032

Fonte: A autora, 2019.

Como o p-valor é maior que 0.05, não há indícios para rejeitar a hipótese nula. Assim, o equipamento de MCL é capaz de detectar corretamente a atipia dos ceratinócitos na camada espinhosa nas lesões de CA.

Desta forma, para 5 dos 6 critérios, os resultados foram positivos, ou seja, a MCL se mostrou apropriada para realizar suas mensurações. Existiu apenas um critério no qual a hipótese não foi satisfeita. A MCL não apresentou capacidade para realizar a avaliação das células inflamatórias na derme de maneira satisfatória, o que pode levar uma avaliação errônea deste critério.

Figura 14 - Concordância entre os critérios diagnósticos à MCL e à AH



Legenda: Microscopia confocal a laser (MCL); análise histopatológica (AH).

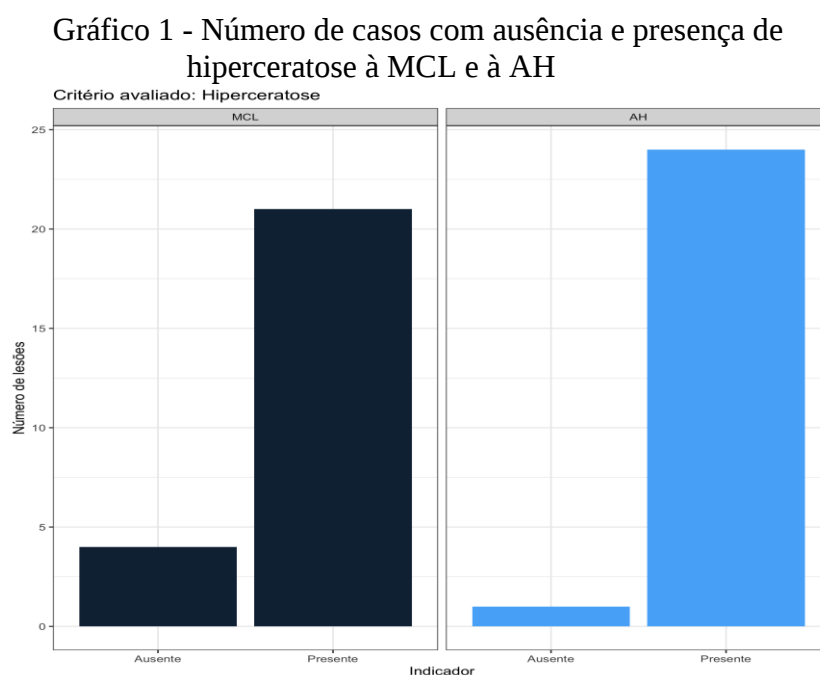
Fotografias da MCL (esquerda) e da AH (direita) com imagens representativas de cada critério avaliado neste estudo. (A) Hiperqueratose: setas indicam a camada córnea com alta refletância; (B) Paraceratose: setas mostram núcleos arredondados na camada córnea; (C) Disceratose: setas apontam as células redondas e nucleadas na camada espinhosa. Asterisco indica elastose solar na derme; (D) Infiltrado inflamatório epidérmico: células redondas (setas amarelas) e dendríticas (seta vermelha); (E) Atipia de grau 1 na camada espinhosa: quadrado delimita área que exibe leve irregularidade dos ceratinócitos; (F) Atipia de grau 3 na camada espinhosa: asterisco mostra região com ceratinócitos de contornos celulares espessados; (G) Atipia de grau 5 na camada espinhosa: célula em alvo evidenciada por seta amarela e setas vermelhas indicando intenso pleomorfismo; (H) Infiltrado inflamatório dérmico: linfócitos redondos indicados por setas vermelhas.

Fonte: A autora, 2019.

4.4.1 Hiperkeratose

A contagem das camadas componentes da córnea (n) foi de em média de 26,6, com mínimo de 5 e máximo de 30.

Para a avaliação da presença ou ausência de camada córnea com espessura superior a 15 micrômetros (equivalente a n igual ou maior a 10) à MCL, em relação à AH, foram encontrados os valores de sensibilidade igual a 87,5%, especificidade igual a 100%, VPP igual a 100% e VPN igual a 25%. Conclui-se que, para a amostra estudada, foi possível obter um excelente desempenho para identificação da condição (VPP=100%), sendo o critério afastado e identificado corretamente em 100% e 87,5% dos casos, respectivamente. O Gráfico 1 e a Tabela 4 mostram maiores detalhes dos resultados obtidos.



Legenda: Microscopia confocal a laser (MCL); Análise histopatológica (AH).
Fonte: A autora, 2019.

Tabela 4 - Contingência para hiperkeratose

		AH		
		Ausente	Presente	
MCL	Hiperkeratose Ausente	1	3	4
	Hiperkeratose Presente	0	21	21
		1	24	25

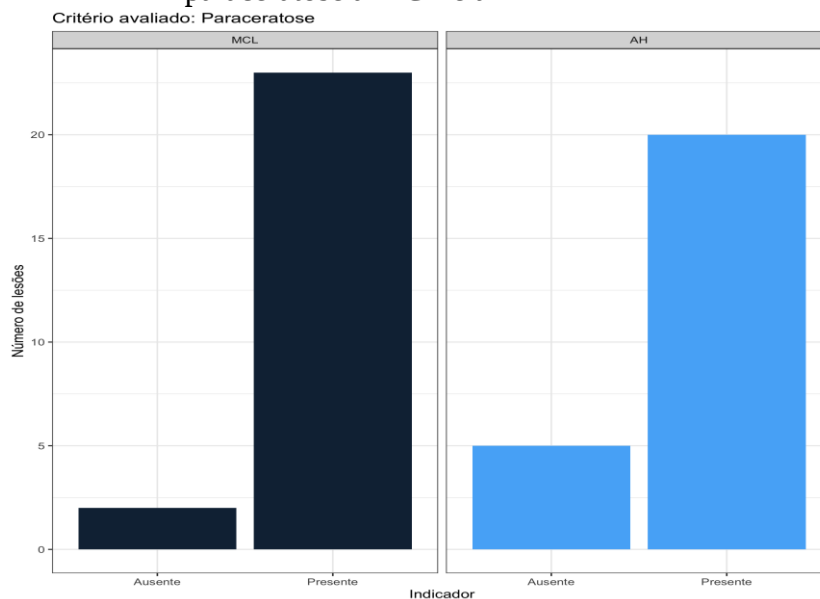
Legenda: Microscopia confocal a laser (MCL); Análise histopatológica (AH).

Fonte: A autora, 2019.

4.4.2 Parakeratose

Nota-se que para a avaliação da presença ou ausência de células nucleadas na camada córnea à MCL, em relação à AH, foram encontrados os valores de sensibilidade igual a 90%, especificidade igual a 0%, VPP igual a 78,26% e VPN igual a 0%. Assim sendo, conclui-se que, para a amostra estudada, foi possível obter um bom desempenho para identificação da condição (VPP=78,26%), mas não foi possível avaliar sua ausência (VPN=0%), e o critério foi identificado corretamente em 90% dos casos. O Gráfico 2 e a Tabela 5 detalham os resultados encontrados.

Gráfico 2 - Número de casos com ausência e presença de paraceratose à MCL e à AH



Legenda: Microscopia confocal a laser (MCL); Análise histopatológica (AH).

Fonte: A autora, 2019.

Tabela 5 - Contingência para paraceratose

		AH		
Paraceratose		Ausente	Presente	
MCL	Ausente	0	2	2
	Presente	5	18	23
		5	20	25

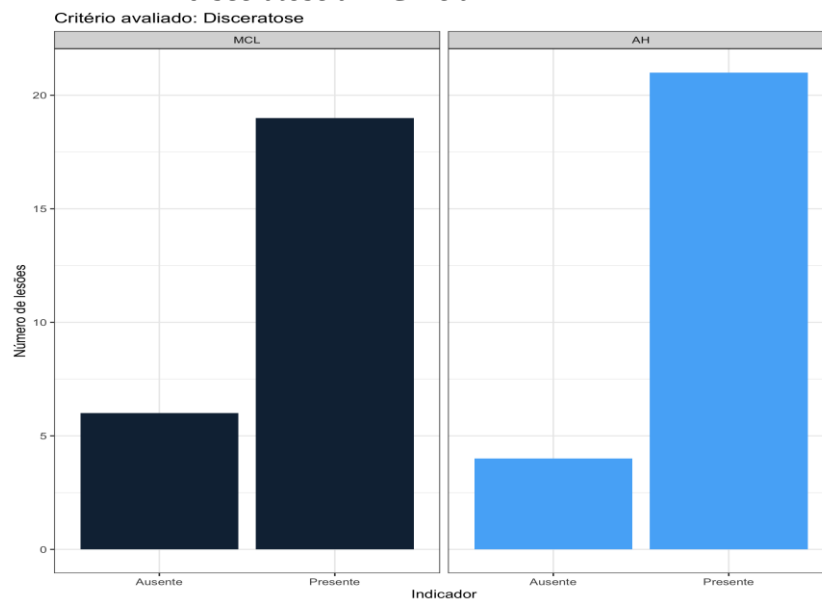
Legenda: Microscopia confocal a laser (MCL); Análise histopatológica (AH).

Fonte: A autora, 2019.

4.4.3 Disceratose

Nota-se que para a avaliação da presença ou ausência de células redondas e nucleadas na camada espinhosa à MCL, em relação à AH, foram encontrados os valores de sensibilidade igual a 85,71%, especificidade igual a 75%, VPP igual a 94,74% e VPN igual a 50%. O Gráfico 3 e a Tabela 6 detalham os resultados encontrados.

Gráfico 3 - Número de casos com ausência e presença de disceratose à MCL e à AH



Legenda: Microscopia confocal a laser (MCL); Análise histopatológica (AH).

Fonte: A autora, 2019.

Tabela 6 - Contingência para disceratose

		AH		
Disceratose		Ausente	Presente	
MCL	Ausente	3	3	6
	Presente	1	18	19
		4	21	25

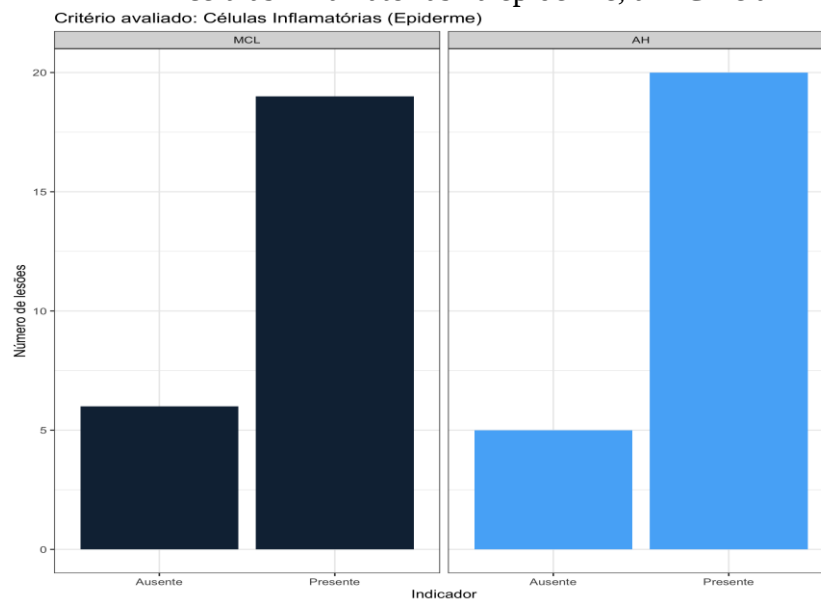
Legenda: Microscopia confocal a laser (MCL); Análise histopatológica (AH).

Fonte: A autora, 2019.

4.4.4 Células inflamatórias na epiderme

Para a avaliação da presença ou ausência de linfócitos arredondados ou dendríticos (células de Langerhans) de alta refletância na epiderme à MCL, em relação à AH, foram encontrados os valores de sensibilidade igual a 75%, especificidade igual a 20%, VPP igual a 78,95% e VPN igual a 16,67%. O Gráfico 4 e a Tabela 7 mostram maiores detalhes dos resultados obtidos.

Gráfico 4 - Número de casos com ausência e presença de células inflamatórias na epiderme, à MCL e à AH



Legenda: Microscopia confocal a laser (MCL); Análise histopatológica (AH).
Fonte: A autora, 2019.

Tabela 7 - Contingência para células inflamatórias na epiderme

		AH	
Inflamação (Epiderme)		Ausente	Presente
MCL	Ausente	1	5
	Presente	4	15
		5	20

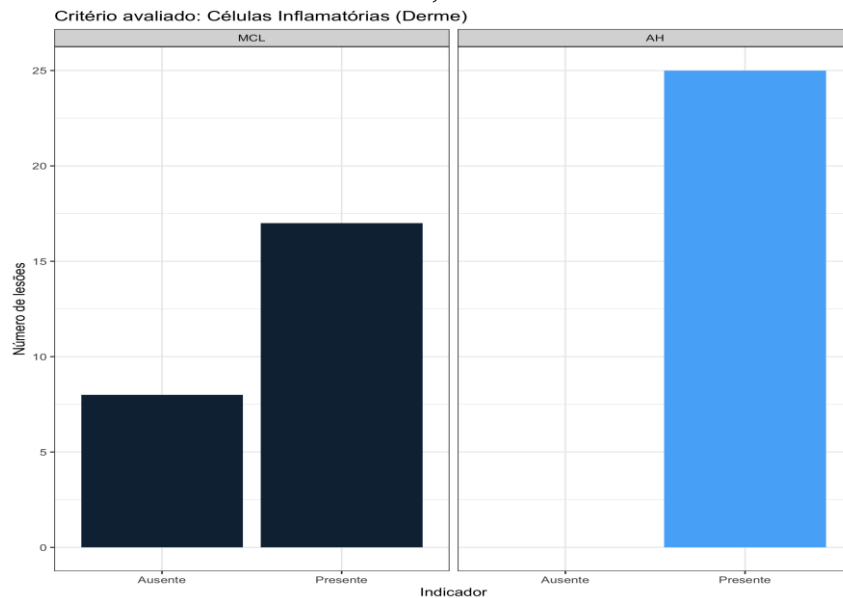
Legenda: Microscopia confocal a laser (MCL); Análise histopatológica (AH).
Fonte: A autora, 2019.

4.4.5 Células inflamatórias na derme

Para a avaliação da presença ou ausência de linfócitos arredondados de alta refletância na derme à MCL, em relação à AH, foram encontrados os valores de sensibilidade igual a 68%, VPP igual a 100% e VPN igual a 0%. A especificidade das células inflamatórias na derme é indefinida, pois o cálculo na tabela resulta em uma divisão de 0 por 0. Conclui-se

que, para a amostra estudada, não foi possível avaliar a ausência da condição (VPN=0%), sendo o critério identificado corretamente em 68% dos casos. O Gráfico 5 e a Tabela 8 detalham os resultados encontrados.

Gráfico 5 - Número de casos com ausência e presença de células inflamatórias na derme, à MCL e à AH



Legenda: Microscopia confocal a laser (MCL); Análise histopatológica (AH).
Fonte: A autora, 2019.

Tabela 8 - Contingência para células inflamatórias na derme

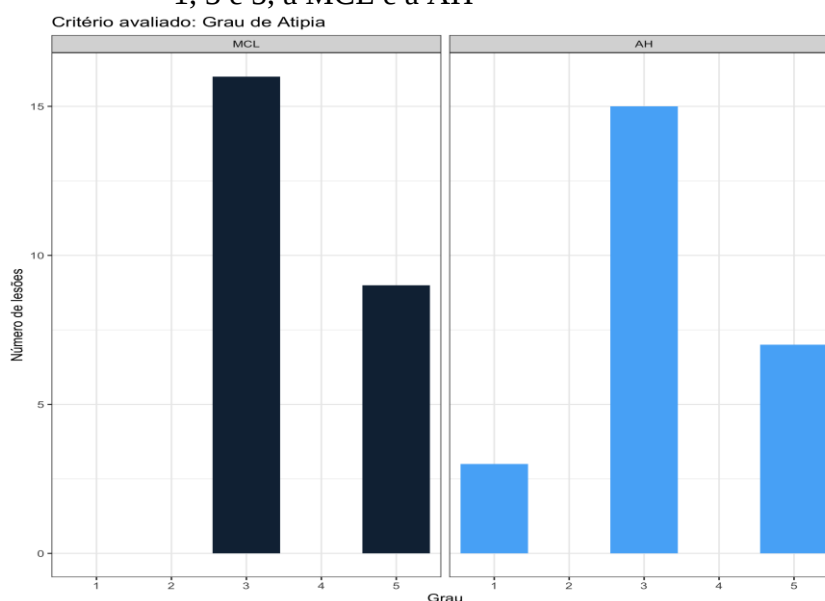
		AH	
		Ausente	Presente
MCL	Inflamação (Derme)		
	Ausente	0	8
	Presente	0	17
		0	25

Legenda: Microscopia confocal a laser (MCL); Análise histopatológica (AH).
Fonte: A autora, 2019.

4.4.6 Grau de atipia dos ceratinócitos da camada espinhosa

Através da avaliação do grau de atipia e do pleomorfismo ceratinocítico na camada espinhosa, à MCL não foram identificadas lesões de grau 1, que, por sua vez, se mostraram presentes em três casos analisados à AH. A maioria das CAs foram classificadas como grau 3 em ambos os métodos diagnósticos. Já as lesões de grau 5 foram mais comumente classificadas desta maneira à MCL em relação a AH. O Gráfico 6 mostra os resultados obtidos de forma mais detalhada.

Gráfico 6 - Número de casos com atipia dos ceratinócitos da camada espinhosa, com distribuição entre os graus 1, 3 e 5, à MCL e à AH



Legenda: Microscopia confocal a laser (MCL); Análise histopatológica (AH).
Fonte: A autora, 2019.

4.5 Aspectos histopatológicos

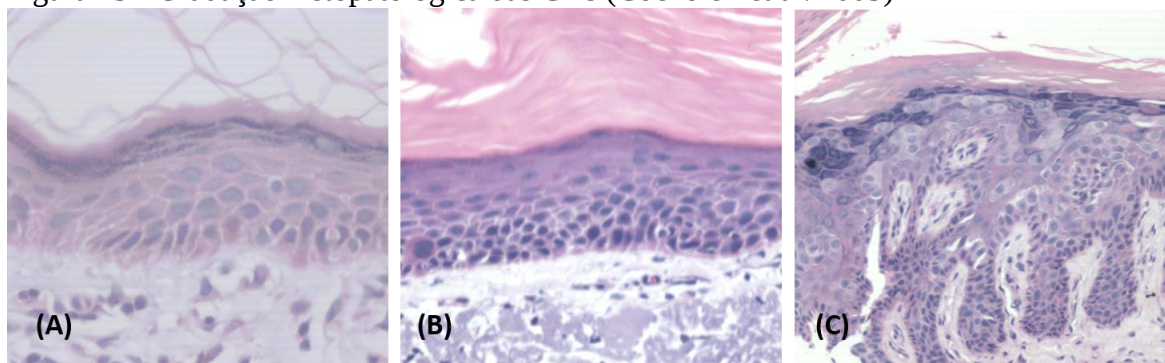
A avaliação através da histopatologia ainda é a forma de microscopia que serve como base de comparação para as demais. Desta forma, foi através dela que se optou por descartar duas lesões do estudo. Uma por apresentar colisão com ceratose seborreica e outra por

mostrar aspectos ainda incipientes de CA (mais adequadamente classificada como CA subclínica ou campo de cancerização).

Segundo a classificação histopatológica das CAs em 3 graus (Figura 15), de acordo com a espessura da atipia epidérmica mensurada a partir da camada basal, 9 lesões (36%) foram classificadas como grau I, enquanto 15 (60%), como grau II e 1 (4%) foi classificada como grau III.

A Tabela 9 pareia os resultados encontrados através da análise clínica e da AH, comparando a concordância entre estes métodos.

Figura 15 - Gradação histopatológica das CAs (Cockerell et al. 2005)



Legenda: Ceratose actínica (CA).

(A) Grau I, com acometimento apenas do 1/3 inferior da epiderme; (B) Grau II, com atipia presente nos 2/3 inferiores da epiderme; (C) Grau III, que apresenta epiderme integralmente afetada pela atipia ceratinocítica.

Fonte: A autora, 2019.

Tabela 9 - Comparação entre as classificações histopatológicas e clínico-dermatoscópicas das lesões de CA incluídas no estudo

AH	Grau I	Grau II	Grau III
	9 (36%)	15 (60%)	1 (4%)
Clínica	Grau I	Grau II	Grau III
	16 (64%)	9 (36%)	0 (0%)

Legenda: Ceratose actínica (CA); Análise histopatológica (AH).

Nota: Há correlação adequada em 56% dos casos, enquanto em 44% deles não há correspondência entre os dois tipos de classificação.

Fonte: A autora, 2019.

5 DISCUSSÃO

As ceratoses actínicas caracterizam-se por máculas eritematoescamosas ou placas ceratóticas. São concentradas nas áreas de maior exposição solar (cabeça, pescoço e extremidades superiores) em pessoas de pele clara (fototipos I a III de Fitzpatrick). Semelhante à literatura, nosso estudo mostrou acometimento de pacientes com fototipos baixos. O fototipo II foi o que apresentou maior número de pacientes (70%), seguido pelos III (20%) e I (10%), em ordem decrescente. Na nossa casuística composta pela população brasileira, tipicamente miscigenada, o fototipo I tem menor expressividade do que na literatura europeia ou americana. Todos os pacientes foram orientados a evitar exposição solar e a utilizar regularmente protetor com fator de proteção acima de 30.

Os fatores de risco mais relacionados ao surgimento da CA, além da pele clara, são: exposição solar crônica, idade acima de 40 anos, imunossupressão, gênero masculino e exposição ao arsênico. São acometidos 55% dos homens e 37% das mulheres com idade entre 30 e 70 anos (Richtig et al. 2010). Assim como ocorreu na nossa amostra, composta por 40% de mulheres e 60% de homens, com idade média de 76.7 anos. Outros fatores de risco menos comuns, como pacientes transplantados ou portadores de síndromes genéticas com mutações do gene p53 e consequente dano ao reparo do DNA, não foram observados, devido aos critérios de exclusão impostos pelo desenho do estudo. Quanto às comorbidades, três pacientes não apresentavam, 4 apresentavam diabetes *mellitus*, 6 apresentavam HAS. Um dos pacientes apresentava osteoporose, HAS e dislipidemia.

O manejo da CA engloba educação quanto à proteção solar e à importância do autoexame, além da detecção e tratamento precoces, evitando-se a possível progressão para CEC (Ferrándiz et al. 2014). Uma vez desenvolvida, a CA pode apresentar três caminhos diferentes de evolução: regressão espontânea, persistência ou transformação para CEC, sendo que uma lesão não precisa necessariamente seguir os três graus clínicos (Olsen et al. 1991). Sabe-se que esta gradação clínica é compatível com a histológica em apenas 50% dos casos, não devendo ser usada como preditor (Dirschka et al. 2017). No nosso estudo, foi observada correlação clínico-histológica adequada em 56% dos casos, enquanto em 44% deles não houve correspondência entre os dois tipos de classificação. Através da gradação histopatológica, 9 lesões (36%) foram classificadas como grau I, 15 (60%), como grau II e 1 (4%), como grau III. Já na avaliação clínica, 16 lesões (64%) foram classificadas como grau I e 9 (36%) como grau II. Nenhuma CA de grau III foi incluída no estudo.

As características das CAs que se associam ao maior risco de progressão para CEC são induração, inflamação, diâmetro superior a 2cm, crescimento rápido, sangramento e ulceração. Outros fatores são pigmentação, dor, prurido, ceratose acentuada e localização na cabeça ou no pescoço (Rigel et al. 2013). Desta forma, para não termos o possível viés da análise de um CEC ou de uma CA de comportamento mais agressivo, estas características foram tidas como critérios de exclusão e a única localização estudada foi o antebraço.

As avaliações histológicas demonstram que 60 a 80% dos CECs surgem a partir de uma CA, corroborando a estratégia do tratamento precoce (Rigel e Steingold. 2013). A escolha da melhor opção terapêutica depende do número, tamanho e localização das lesões de CA. Porém, ainda não há consenso na literatura sobre a melhor escolha para o tratamento das CAs, provavelmente pela dificuldade de seguimento terapêutico não invasivo para comparação entre diferentes métodos e protocolos. Costuma-se indicar a associação de tratamentos localmente destrutivos aos tópicos, com o objetivo de reduzir a recorrência tumoral. Os tratamentos direcionados à lesão são particularmente úteis nas CAs isoladas. Dentre as opções terapêuticas estão a crioterapia, a eletrocirurgia, a biopsia por *shave* e a excisão. Esses procedimentos requerem anestesia local (exceto na crioterapia) e podem evoluir com cicatrizes ou alterações pigmentares. Em geral são métodos de rápida execução e com boa eficácia. Já o tratamento direcionado ao campo de cancerização pode promover períodos de remissão mais prolongados. É indicado para os pacientes que apresentam múltiplas lesões de CA na mesma área anatômica, associadas a sinais de fotodano acentuado. As opções mais utilizadas são: terapia fotodinâmica, 5-fluoracil, imiquimode, mebutato de ingenol e diclofenaco (Ferrándiz et al. 2014). Na população estudada, referente ao tratamento prévio para CAs nos antebraços, com a exceção de um paciente, todos os demais tinham sido submetidos à crioterapia em outras lesões, com tempo superior a 12 meses antes da inclusão neste estudo. A preferência pela utilização desta modalidade terapêutica se deve ao fato de ser a primeira escolha segundo o consenso europeu de CA, além de rápida e de baixo custo.

Como o diagnóstico da CA é primordialmente clínico, a dermatoscopia é um método semiológico não invasivo que auxilia nesta avaliação, por permitir o reconhecimento de estruturas morfológicas que não são observadas a olho nu e o acompanhamento da lesão ao longo do tempo. O treinamento na interpretação dos critérios dermatoscópicos e sua correlação com os aspectos clínicos e histopatológicos, é fundamental para aumentar a eficiência diagnóstica. A dermatoscopia também é útil na diferenciação da gradação entre I, II, III e do CEC, o qual apresenta diferentes padrões vasculares (vasos puntiformes, glomerulares, em grampo ou lineares), massa central de ceratina, ulceração e áreas amorfas

brancacentas (Zalaudek et al. 2014). A realização deste exame em todos os pacientes do estudo proporcionou uma melhor observação das lesões pequenas e incipientes, além de corroborar o diagnóstico das clinicamente mais clássicas. Evitou-se também a inclusão de outros tipos de lesões (que poderiam ser diagnósticos diferenciais das CAs), já que os pacientes avaliados apresentavam ampla diversidade de lesões cutâneas decorrentes do intenso fotodano.

A indicação da AH é reservada aos casos duvidosos (Ulrich et al. 2010), suspeitos de CEC ou não responsivos ao tratamento convencional (Stockfleth et al. 2011). O diagnóstico clínico apresenta VPP de 74% quando comparado à AH (Venna et al. 2005), com relatos na literatura de subdiagnóstico de lesões de CEC, erroneamente classificadas através da avaliação clínica isolada como CAs (Aghassi et al. 2000, Venna et al. 2005). A vantagem da histopatologia é a possibilidade da avaliação com resolução celular.

A MCL configura mais um método de imagem não invasivo que vem sendo estudado para aprimorar a avaliação da CA e do campo de cancerização (Pellacani et al. 2015, Peppelman et al. 2015, Ulrich et al. 2010). Apresenta a vantagem de ser um método de imagem não invasivo aliado à resolução celular, características que possibilitam a observação dos detalhes arquiteturais e celulares, *in vivo*, em tempo real, com resolução equivalente à da microscopia convencional, porém sem artefatos histológicos. Lista-se a seguir os principais critérios diagnósticos descritos na literatura. Na camada córnea: hiperqueratose, parakeratose e descamação. Na camada espinhosa: disqueratose, perda do padrão em favo de mel típico e infiltrado inflamatório linfocitário. E na derme: presença de infiltrado inflamatório linfocitário, em meio a papilas dérmicas pouco definidas (Peppelman et al. 2015). Elastose solar e vasodilatação estão presentes em apenas 31% dos casos (Ishioka et al. 2015). Os critérios mais relevantes para distinção entre a CA e o CEC são o desarranjo arquitetural na camada granulosa e a presença de ninhos tumorais dérmicos encontrados exclusivamente no CEC (Peppelman et al. 2015). A maioria dos estudos não compara os critérios à AH (amplamente reconhecida como eficiente neste diagnóstico) e os classifica apenas em presentes ou ausentes, de forma descritiva e não padronizada, não possibilitando a determinação da gravidade ou a diferenciação da resposta terapêutica em parcial ou total. Desta forma, selecionamos os 6 principais critérios citados na avaliação da CA à MCL (hiperqueratose, parakeratose, disqueratose, atipia dos ceratinócitos da CE, inflamação epidérmica e dérmica) e os analisamos em conjunto com a histopatologia.

Considerando-se a hipótese formulada de que a MCL é uma técnica útil para o diagnóstico das ceratoses actínicas, tem-se como hipótese nula: não há distinção significativa

entre o resultado da avaliação realizada pela MCL em relação àquela da AH. Através dos p-valores calculados pelos testes de McNemar (aplicado às variáveis binárias) e Wilcoxon (variáveis contínuas), conclui-se que não há diferença significativa entre a MCL e a AH para 5 dos 6 parâmetros analisados. Os critérios que se mostraram estatisticamente relevantes foram: paraceratose (p-valor 0.449690), hiperkeratose (p-valor 0.248213), diskeratose (p-valor 0.617075), atipia dos ceratinócitos da camada espinhosa (p-valor 0.145032) e inflamação na epiderme (p-valor 1.000000). A presença de células inflamatórias na derme (p-valor 0.013328) não revelou p-valor acima de 5%, necessário para afastar validação diferente da AH. Tem-se, então, a hipótese alternativa, na qual há distinção significativa entre o resultado da avaliação realizada pela MCL e pela AH. Não foram observadas reações adversas ao exame de MCL ou à terapêutica através do *shaving*, com bons resultados clínicos ao acompanhamento.

Diferente da histopatologia, a MCL limita-se a uma profundidade de até 0,3mm (equivalente à derme papilar), porém não configura um fator limitante no caso da CA, por esta ser uma afecção restrita à epiderme. Nas lesões mais ceratóticas, a MCL apresenta resolução e penetração reduzidas, alcançando apenas até a camada espinhosa, sendo este o motivo deste estudo enquadrar estas lesões mais espessas como critério de exclusão. Assim, as dificuldades técnicas encontradas incluem o alto custo do equipamento de MCL (previamente disponível no setor de Dermatopatologia do HUPE-UERJ), o tempo prolongado para aquisição das imagens (30 a 40 minutos para cada lesão), além do método ser técnico dependente, o que requer treinamento dos seus avaliadores e pode repercutir em reprodutibilidade variável. Para minimizar este fator, a mestrandia realizou treinamento no setor de MCL da Universidade de Modena e Reggio Emília (UNIMORE), na Itália, sob orientação do Prof. Dr. Giovanni Pellacani, referência neste promissor exame. O Prof Pellacani também forneceu assistência remota ao trabalho. A Dra. Nathalie De Carvalho, estudiosa do assunto e doutoranda em MCL na UNIMORE, realizou a validação da análise das imagens de MCL em conjunto com a mestrandia.

Como continuação deste trabalho e baseado nos artigos já publicados, os autores sugerem como perspectivas para futuros estudos a utilização de uma amostra com maior tamanho e a avaliação de lesões de CA com localizações diferentes do antebraço. É sugerida também a utilização da abordagem padronizada através MCL demonstrada neste trabalho para estudos comparativos entre diferentes opções terapêuticas para as lesões de CA. Não há um protocolo de tratamento bem estabelecido para as CAs e lesões subclínicas, provavelmente por estes estudos não se mostrarem possíveis através da avaliação histopatológica invasiva.

Sugere-se novos trabalhos com avaliação de diferentes tipos de lesões cutâneas (tumoriais e inflamatórias), com o intuito de diversificar a indicação da MCL para além das lesões melanocíticas, área mais amplamente estudada.

CONCLUSÃO

Diferente da maioria dos artigos encontrados na literatura, que não correlaciona a MCL com a histopatologia (que já tem sua acurácia e critérios diagnósticos bem estabelecidos), neste estudo foi corroborada a aplicabilidade da MCL como método semiológico efetivo para as lesões de ceratose actínica, com correlação consistente à AH. Outro importante diferencial é a proposta de sistematização desta avaliação, através de cinco critérios com pontuação numérica objetiva, que confere melhor reprodutibilidade e possibilidade de comparação evolutiva de uma mesma lesão. Os critérios indicados são hiperkeratose (S = 87,5%, E = 100%, VPP = 100% e VPN = 25%), parakeratose (S = 90%, E = 0%, VPP = 78,26% e VPN = 0%), disqueratose (S = 85,71%, E = 75%, VPP = 94,74% e VPN = 50%), inflamação na epiderme (S = 75%, E = 20%, VPP = 78,95% e VPN = 16,67%) e atipia dos ceratinócitos na camada espinhosa. Esta atipia foi graduada em três diferentes níveis, que correspondem a leve, moderada ou acentuada irregularidade ceratinocítica. Esta gradação, em conjunto com a presença ou ausência dos demais critérios, permite o diagnóstico das lesões de CA. A avaliação dos linfócitos na derme não apresentou significância estatística, apesar de ótimos valores de sensibilidade (68%) e preditivo positivo (100%).

A aproximação entre os diferentes tipos de microscopia (dermatoscopia, histopatologia e MCL), correlacionadas às manifestações clínicas, resulta em grande benefício na avaliação dos pacientes com múltiplas lesões decorrentes do fotodano cutâneo. Permite o estabelecimento mais preciso do diagnóstico e do tratamento, com redução das abordagens empíricas.

REFERÊNCIAS

- Aghassi D, Anderson RR, González S. Confocal laser microscopic imaging of actinic keratoses in vivo: a preliminary report. *J Am Acad Dermatol*. 2000;43(1 Pt 1):42-8.
- Ahlgrimm-Siess V, Hofmann-Wellenhof R, Cao T, Oliviero M, Scope A, Rabinovitz HS. Reflectance Confocal Microscopy in the daily practice. *Semin Cutan Med Surg*. 2009;28(3):180-9.
- Ahmed I, Berth-Jones J, Charles-Holmes S, O'Callaghan CJ, Ilchyshyn A. Comparison of cryotherapy with curettage in the treatment of Bowen's disease: a prospective study. *Br J Dermatol*. 2000;143(4):759-66.
- Bassoli S, Rabinovitz HS, Pellacani G, Porges L, Oliviero MC, Braun RP, et al. Reflectance confocal microscopy criteria of lichen planus-like keratosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2012;26(5):578-90.
- Castro LG, Pimentel ER, Lacaz CS. Treatment of chromomycosis by cryosurgery with liquid nitrogen: 15 years experience. *Int J Dermatol*. 2003;42(5):408-12.
- Cockerell CJ, Wharton JR. New histopathological classification of actinic keratosis (incipiente intraepidermal squamous cell carcinoma). *J Drugs Dermatol* 2005; 4(4):462-7.
- Dirschka T, Gupta G, Micali G, Stockfleth E, Basset-Séguin N, Del Marmol V, et al. Real-world approach to actinic keratosis management: practical treatment algorithm for office-based dermatology. *J Dermatol Treat*. 2017;28(5):431-42.
- Eichert S, Moehrle M, Breuninger H, Roewken M, Garbe C, Bauer J. Diagnosis of cutaneous tumors with in vivo confocal laser scanning microscopy. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2010;8(6):400-10.
- Farnetani F, Scope A, Braun RP, Gonzalez S, Guitera P, Malvey J, et al. Skin cancer diagnosis with reflectance confocal microscopy: reproducibility of feature recognition and accuracy of diagnosis. *JAMA Dermatol*. 2015;151(10):1075-80.
- Fernandez Figueras MT. From actinic keratosis to squamous cell carcinoma: pathophysiology revisited. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2017;31(Suppl. 2):5-7.
- Ferrándiz C, Fonseca-Capdevila E, García-Diez A, Guillén-Barona C, Belinchón-Romero I, Redondo-Bellón P, et al. Adaptación española de la Guía europea para la evaluación y tratamiento de la queratosis actínica. *Actas Dermosifiliogr*. 2014;105(4):378-93.
- Ferreira CMM, Barcaui C, Maceira JP. Atlas de Dermatoscopia: aplicação clínica e correlação histopatológica. Rio de Janeiro: Dilivros; 2011. p.1-2.
- Fitzpatrick TB. Soleil et peau. *J Méd Esthét*. 1975;2:33-4.

Foley P, Merlin K, Cumming S, Campbell J, Crouch R, Harrison S, et al. A comparison of cryotherapy and imiquimod for treatment of actinic keratosis: lesion clearance, safety, and skin quality outcomes. *J Drugs Dermatol*. 2011;10(12):1432-8.

Freeman M, Vinciullo C, Francis D, Spelman L, Nguyen R, Fergin P, et al. A comparison of photodynamic therapy using topical methyl aminolevulinate (Metvix) with single cycle cryotherapy in patients with actinic keratosis: a prospective, randomized study. *J Dermatolog Treat*. 2003;14(2):99-106.

Galvão LEG. Terapia fotodinâmica com luz do dia: benefício clínico e estético com sessões repetidas para ceratoses actínicas faciais. *Surg Cosmet Dermatol*. 2016;8(4 Suppl. 1):S40-2.

Goldberg LH, Kaplan B, Vergilis-Kalner I, Landau J. Liquid nitrogen: temperature control in the treatment of actinic keratosis. *Dermatol Surg*. 2010;36(12):1956–61.

González S, Sánchez V, González-Rodríguez A, Parrado C, Ullrich M. Patrones de Microscopia Confocal para el câncer cutâneo no melanoma y aplicaciones clínicas. *Actas Dermosifiliogr*. 2014;105(5):446-58.

Harvey I, Frankel S, Marks R, Shalom D, Nolan-Farrell M. Non-melanoma skin cancer and solar keratoses. I. Methods and descriptive results of the South Wales Skin Cancer Study. *Br J Cancer*. 1996;74:1302-7.

Heerfordt IM, Nissen CV, Poulsen T, Philipsen PA, Wulf HC. Thickness of Actinic Keratosis Does Not Predict Dysplasia Severity or P53 Expression. *Sci Rep*. 2016;6:33952.

Hochman B, Nahas FX, Oliveira Filho RS, Ferreira LM. Desenhos de pesquisa. *Acta Cir Bras*. 2005;20(Suppl. 2):2-9.

Hofmann-Wellenhof R, Pellacani G, Malvehy J, Soyer HP. Reflectance confocal microscopy for skin diseases. Berlin: Springer; 2012.

Horn M, Gerger A, Ahlgrimm-Siess V, Weger W, Koller S, Kerl H, et al. Discrimination of actinic keratoses from normal skin with reflectance mode confocal microscopy. *Dermatol Surg*. 2008;34(1Pt 1):620-5.

Huang CM, Emily YL, Kirchho MG. Cellulitis Secondary to Liquid Nitrogen Cryotherapy: Case Report and Literature Review. *J Cutan Med Surg*. 2017;21(4):334-8.

Ianhez M, Miot HA, Bagatin E. Liquid nitrogen for the treatment of actinic keratosis: A longitudinal assessment. *Cryobiology*. 2014;69(1):140–3.

Incel P, Gurel MS, Erdemir AV. Vascular patterns of nonpigmented tumoral skin lesions: confocal perspectives. *Skin Res Technol*. 2014;21(3):333-9.

Ishioka P, Maia M, Rodrigues SB, Marta AC, Hirata SH. Evaluation of the therapeutic results os actinic keratosis treated with topical 5% fluoracil by reflectance confocal laser microscopy: preliminary study. *An Bras Dermatol*. 2015;90(3):426-9.

Kac N, Zalaudek I, Yildiz N, Ergin S. Dermatoscopy for monitoring treatment of actinic keratosis with imiquimod. *Clin Exp Dermatol*. 2012;37(5):567-9.

Kaur RR, Alikhan A, Maibach HI. Comparison of topical 5-fluorouracil formulations in actinic keratosis treatment. *J Dermatolog Treat*. 2010;21(5):267-71.

Krawtchenko N, Roewert-Huber J, Ulrich M, Mann I, Sterry W, Stockfleth E. A randomised study of topical 5% imiquimod vs. topical 5-fluorouracil vs. cryosurgery in immunocompetent patients with actinic keratoses: a comparison of clinical and histological outcomes including 1-year follow-up. *Br J Dermatol*. 2007;157(Suppl 2):34-40.

López Estebaranz JL, Pampin Franco A, Gamo Villegas R, Floristán U. Monitoring Ingenol Mebutate Gel Treatment of Actinic Keratoses by Reflectance Confocal Microscopy. *Acta Derm Venereol*. 2017;97(5):646-8.

Malveyh J, Alarcon I, Montoya J, Rodríguez-Azaredo R, Puig S. Treatment monitoring of 0,5% 5-fluorouracil and 10% salicylic acid in clinical and subclinical actinic keratoses with the combination of optical coherence tomography and reflectance confocal microscopy. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2015 Feb;30(2):258-65.

Malveyh J, Roldán-Marín R, Iglesias-García P, Díaz A, Puig S. Monitoring treatment of field cancerisation with 3% diclofenac sodium 2.5% hyaluronic acid by reflectance confocal microscopy: a histologic correlation. *Acta Derm Venereol*. 2015;95(1):45-50.

Morton C, Campbell S, Gupta G, Keohane S, Lear J, Zaki I, et al. Intraindividual, right-left comparison of topical methyl aminolaevulinate-photodynamic therapy and cryotherapy in subjects with actinic keratoses: a multicentre, randomized controlled study. *Br J Dermatol*. 2006 Nov;155(5):1029-36.

Morton CA, Whitehurst C, Moseley H, McColl JH, Moore JV, MacKie RM. Comparison of photodynamic therapy with cryotherapy in the treatment of Bowen's disease. *Br J Dermatol*. 1996;135(5):766-71.

Nguyen KP, Peppelman M, Hoogedoorn L, Van Erp PEJ, Gerritsen MJP. The current role of in vivo reflectance confocal microscopy within the continuum of actinic keratosis and squamous cell carcinoma: a systematic review. *Eur J Dermatol*. 2016;26(6):549-65.

Oliveira MC, Trevisan F, Pinto CAL, Xavier CA, Pinto JCC. Histopathological analysis of the therapeutic response to cryotherapy with liquid nitrogen in patients with multiple actinic keratosis. *An Bras Dermatol*. 2015;90(3):384-9.

Olsen EA, Abernethy ML, Kulp-Shorten C, Callen JP, Glazer SD, Huntley A, et al. A double-blind, vehicle-controlled study evaluating masoprocol cream in the treatment of actinic keratoses on the head and neck. *J Am Acad Dermatol*. 1991;24(5 Pt 1):738-43.

Pagano M, Gauvreau K. *Principles of Biostatistics*. Florida: Duxbury Press; 2018. 525p.

Parikh R, Mathai A, Parikh S, Sekhar GC, Thomas R. Understanding and using sensitivity, specificity and predictive values. *Indian J Ophthalmol*. 2008;56(1):45-50.

Pasquali P. Cryosurgery: a practical manual. Berlin: Springer; 2015.

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(11):2216-21.

Peppelman M, Nguyen KP, Hoogedoorn L, van Erp PE, Gerritsen MJ. Reflectance confocal microscopy: non-invasive distinction between actinic keratosis and squamous cell carcinoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2015;29(7):1302-9.

Poziomczyk CS, Köche B, Dornelles MA, Dornelles SIT. Avaliação da dor em criocirurgia de ceratoses actínicas. *An Bras Dermatol*. 2011;86(4):645-50.

Ranawaka RR, Amarasinghe N, Hewage D. Chromoblasto- mycosis: combined treatment with pulsed itraconazole therapy and liquid nitrogen cryotherapy. *Int J Dermatol*. 2009; 48(4):397-400.

Ranawaka RR, Weerakoon HS, Opathella N. Liquid nitrogen cryotherapy on *Leishmania donovani* cutaneous leishmaniasis. *J Dermatolog Treat*. 2011;22(4):241-5.

Rappini RP. Dermatopatologia prática. Rio de Janeiro: Dilivros; 2007.

Raulin C, Karsai S. Tecnologias laser e LIP em dermatologia e medicina estética. Rio de Janeiro: Dilivros; 2011.

Rezze G, Cazagrande J. Atlas de microscopia confocal na dermatologia. São Paulo: Lemar; 2016.

Richtig E, Ahlgrimm-Siess V, Koller S, Gerger A, Horn M, Smolle J, et al. Follow-up of actinic keratoses after shave biopsy by in-vivo reflectance confocal microscopy – a pilot study. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2010;24(3):293-8.

Rigel DS, Steingold LF. The importance of early diagnosis and treatment of actinic keratosis. *J Am Acad Dermatol*. 2013;68(Suppl. 1):S20-7.

Rishpon A, Kim N, Scope A, Porges L, Oliviero MC, Braun RP, et al. Reflectance confocal microcopy criteria for squamous cell carcinomas and actinic keratosis. *Arch Dermatol*. 2009;145(7):766-72.

Röwert-Huber J, Patel MJ, Forschner T, Ulrich C, Eberle J, Kerl H, et al. Actinic keratosis is an early in situ squamous cell carcinoma: a proposal for reclassification. *Br J Dermatol*. 2007;156(Suppl 3):8-12.

Segatto MM, Dornelles SIT, Silveira VB, Frantz GO. Comparative study of actinic keratosis treatment with 3% diclofenac sodium and 5% 5-fluorouracil. Estudo comparativo do tratamento de ceratoses actínicas com diclofenaco sodico 3% e 5-fluorouracil 5%. *An Bras Dermatol*. 2013;88(5):732-8.

Segurado-Miravalles G, Jiménez-Gómez N, Muñoz Moreno-Arrones O, Alarcón-Salazar I, Alegre-Sánchez A, Saceda-Corralo D, et al. Assessment of the Effect of 3% Diclofenac

Sodium on Photodamaged Skin by Means of Reflectance Confocal Microscopy. *Acta Derm Venereol.* 2018;98(10):963-9.

Siegel S. *Nonparametric Statistics: for the Behavioral Sciences.* New York: McGraw Hill; 1956. 312p.

Silva NN. *Amostragem probabilística: um curso introdutório.* São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo; 1998.

Spencer JM, Hazan C, Hsiung SH, Robins P. Therapeutic decision making in the therapy of actinic keratoses. *J Drugs Dermatol.* 2005;4(3):296-301.

Stockfleth E. From a new vision of actinic keratosis to imiquimod 3.75%, the new treatment standard. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2015;29(Suppl. 1):1–2.

Stockfleth E, Kerl H. Guidelines for the management of actinic ceratoses. *Eur J of Dermatol.* 2006;16(6):599-606.

Stockfleth E, Terhorst D, Braathen L, Cribier B, Cerio R, Ferrandiz C. Guideline on Actinic Keratoses, developed by the Guideline Subcommittee «Actinic Keratoses» of the European Dermatology Forum. Berlin; 2011.

Tan JM, Lambie D, Sinnya S, Sahebian A, Soyer HP, Prow TW, et al. Histopathology and reflectance confocal microscopy features of photodamaged skin and actinic keratosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2016;30(11):1901-11.

Thai KE, Fergin P, Freeman M, Vinciullo C, Francis D, Spelman L, et al. A prospective study of the use of cryosurgery for the treatment of actinic keratoses. *Int J Dermatol.* 2004;43(9):687-92.

Torezan LAR, Festa-Neto C. Campo de cancerização cutâneo: implicações clínicas, histopatológicas e terapêuticas. *An Bras Dermatol.* 2013;88(5):775-86.

Ulrich M, Alarcon I, Malveyh J, Puig S. In vivo Reflectance Confocal Microscopy characterization of field-directed 5-Fluorouracil 0.5%/Salicylic Acid 10% in Actinic Keratosis. *Dermatology.* 2015;230(3):193-8.

Ulrich M, Krueger-Corcoran D, Roewert-Huber J, Sterry W, Stockfleth E, Astner S. Reflectance confocal microscopy monitoring of actinic keratosis. *Dermatology.* 2010;220:15-24.

Ulrich M, Maltusch A, Rius-Diaz F, Rowert-Huber J, Gonzalez S, Sterry W, et al. Clinical Applicability of in vivo Reflectance Confocal Microscopy for the Diagnosis of Actinic Keratoses. *Dermatol Surg.* 2008;34(5):610-9.

Venna SS, Lee D, Stadecker MJ, Rogres GS. Clinical recognition os actinic keratoses in a high-risk population. How good are we? *Arch Dermatol.* 2005;141(4):507-9.

Waalboer-Spuij R, Holterhues C, van Hattem S, Schuttelaar ML, Gaastra MT, Kuijpers DI, et al. Patient Perception of Imiquimod Treatment for AK and sBCC. *Dermatology*. 2015;231(1):56-62.

Webber A. Estudo comparativo entre terapia fotodinâmica e imiquimod tópico para tratamento de ceratoses actínicas [dissertação]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2009.

Zalaudek I, Piana S, Moscarella E, Longo C, Zendri E, Castagnetti F, et al. Morphologic grading and treatment of facial actinic keratosis. *Clinics in Dermatol*. 2014;32(1):80-7.

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - UERJ HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO – HUPE DISCIPLINA DE DERMATOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título: Avaliação dos critérios diagnósticos da ceratose actínica através da microscopia confocal a laser

Pesquisadora: Dra. Amanda Nascimento Cavalleiro de Macedo Mota da Silva

Orientadores: Prof. Dr. Carlos Baptista Barcaui e Prof. Dr. Juan Manuel Piñeiro-Maceira

PROPOSTA

Você está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar do estudo **Avaliação dos critérios diagnósticos da ceratose actínica através da microscopia confocal a laser**, por estar em acompanhamento no ambulatório de Dermatologia para tratamento das lesões de pele, chamadas de ceratoses actínicas.

PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

Sua participação no referido estudo será constituída por uma avaliação através do exame clínico, da microscopia confocal a laser (exame de imagem com duração estimada de 30 minutos) e retirada da lesão de ceratose actínica (área áspera na pele encontrada em pessoas que tenham se exposto muito ao sol ao longo da vida), localizada no antebraço.

RISCOS E BENEFÍCIOS

Dentre os benefícios esperados está o desaparecimento de parte ou de toda lesão. É possível que ocorra uma pequena cicatriz no local de realização do procedimento.

SIGILO E PRIVACIDADE

Nome ou outro elemento que possa, de qualquer forma, identificar o voluntário, será mantido em sigilo. Os pesquisadores se responsabilizam pela guarda e confidencialidade dos dados, bem como a não exposição dos dados da pesquisa.

Rubrica do participante da pesquisa

Rubrica do Pesquisador

AUTONOMIA

É assegurada a assistência durante toda pesquisa, bem como o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências antes, durante e depois a participação no estudo. O paciente convidado pode se recusar a participar do estudo sem precisar justificar, e não sofrerá qualquer prejuízo à assistência recebida regularmente.

CONTATO

Os pesquisadores envolvidos com o referido projeto são Carlos Barcaui, Juan Maceira e Amanda Mota, os quais acompanharão o planejamento e a execução da pesquisa de forma ética, em concordância com o determinado pelo Comitê de Ética em Pesquisa HUPE-UERJ.

Hospital Universitário Pedro Ernesto – Universidade do Estado do Rio de Janeiro – Serviço de Dermatologia – Av. Vinte e oito de setembro 77 – 2º. Andar – Vila Isabel – Tel.: 28688478

Comitê de Ética em Pesquisa – HUPE – UERJ – Av. Vinte e oito de setembro 77 – 3º. Andar – Vila Isabel – tel.: 28688341/ 28688345 – e-mail: cda.hupe@gmail.com

CONSENTIMENTO

Declaro que li e entendi todas as informações presentes neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e tive a oportunidade de discutir as informações deste termo. Todas as minhas perguntas foram respondidas e eu estou satisfeito com as respostas. Entendo que receberei uma via assinada e datada deste documento e que outra via assinada e datada será arquivada pelo pesquisador responsável pelo estudo. Tendo sido orientado quanto ao teor de tudo aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do já referido estudo, manifesto meu livre consentimento em participar, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, por minha participação.

Rio de Janeiro, ____ de _____ de ____

Nome do voluntário (letra de forma): _____

Assinatura do participante da pesquisa

Assinatura do Pesquisador

USO DE IMAGEM

Autorizo o uso de minha imagem para fins da pesquisa, sendo seu uso restrito a fotografias.

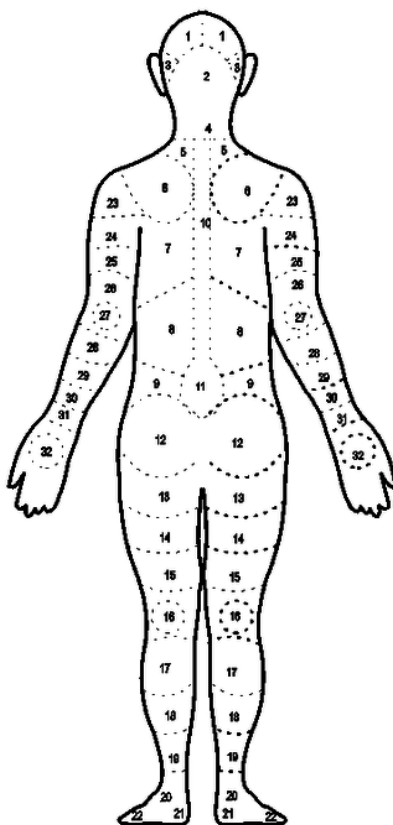
Assinatura do participante da pesquisa

Assinatura do Pesquisador

APÊNDICE B - Formulário de avaliação médica

Formulário de avaliação médica

Nome: _____
 Identidade: _____ Órgão emissor: _____ CPF: _____
 E-mail: _____ Telefone: (____) _____
 Sexo: (M) (F) Data de nascimento: ____/____/____ Idade: _____
 Fototipo de Fitzpatrick: (I) (II) (III) (IV) (V) (VI) Gestante ou lactente: (S) (N)
 Medicções: _____
 Alergias: (S) (N). Quais: _____
 Tratamento prévio para CA nos antebraços: (S) (N). Qual? _____
 Término há quanto tempo (em semanas): _____
 Assinatura do TCLE: (S) (N). Data: ____/____/____
 Observações: _____



APÊNDICE C - Formulário de avaliação à microscopia confocal a laser

Formulário de avaliação à MCL

Data: __/ __/ ____

Identificação do exame: _____

Observações: _____

Pontuação total: _____

CAMADA CÓRNEA:

- Espessura = Número de camadas na córnea: ____ x 1,52 = ____ micrômetros
- **Hiperceratose:** 0 – Ausente (___) 1 – Presente; se $n > 10$ (___)
- **Paraceratose:** 0 – Ausente (___) 1 – Presente (___)

CAMADAS GRANULOSA E ESPINHOSA:

- **Disceratose:** 0 – Ausente (___) 1 – Presente (___)
- **Células inflamatórias na epiderme:** 0 – Ausente (___) 1 – Presente (___)
- **Grau de atipia na camada espinhosa:**

0 – Ausente (___)
1 – Leve irregularidade dos ceratinócitos (___)
3 – Ceratinócitos de diferentes tamanhos e formas, com espessamento do contorno celular (___)
5 – Pleomorfismo intenso com células em alvo, células grandes e bizarras com contorno irregular e núcleo irregular proeminente (___)

DERME:

- **Células inflamatórias na derme:** 0 – Ausente (___) 1 – Presente (___)

APÊNDICE D - Formulário de avaliação histopatológica**Formulário de avaliação histopatológica**

Data: __/__/____

Identificação do exame: _____

Observações: _____

Pontuação total: _____

CAMADA CÓRNEA:

- **Hiperceratose:** 0 – Ausente (___) 1- Presente (___)
- **Paraceratose:** 0 – Ausente (___) 1 – Presente ()

CAMADAS GRANULOSA E ESPINHOSA:

- **Disceratose:** 0 – Ausente (___) 1 – Presente (___)
- **Células inflamatórias na epiderme:** 0 – Ausente (___) 1 – Presente (___)
- **Grau de atipia na camada espinhosa:**

0 – Ausente (___)
1 – Leve irregularidade dos ceratinócitos (___)
3 – Ceratinócitos de diferentes tamanhos e formas, com espessamento do contorno celular (___)
5 – Pleomorfismo intenso com células em alvo, células grandes e bizarras com contorno irregular e núcleo irregular proeminente (___)

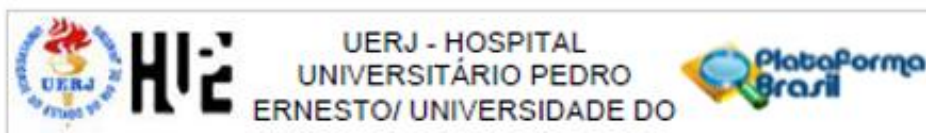
0 – Ausente (___)
1 – Atipia no 1/3 inferior da epiderme (___)
2 – Atipia nos 2/3 inferiores da epiderme (___)
3 – Atipia em toda extensão da epiderme (___)

DERME:

- **Células inflamatórias na derme:** 0 – Ausente (___) 1 – Presente (___)

OUTROS CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS; OBSERVAÇÕES:

**ANEXO A - Parecer consubstanciado pelo Comitê de Ética em Pesquisa HUPE/UERJ –
CAE: 61911116.5.0000.5259**



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Avaliação dos critérios diagnósticos da ceratose actínica através da microscopia confocal a laser

Pesquisador: AMANDA NASCIMENTO CAVALLEIRO DE MACEDO MOTA DA SILVA

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 61911116.5.0000.5259

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Médicas

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.612.011

Apresentação do Projeto:

Emenda para aprovação de documentação e alteração de informações relativas ao protocolo.

Objetivo da Pesquisa:

Emenda para aprovação de documentação e alteração de informações relativas ao protocolo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Emenda para aprovação de documentação e alteração de informações relativas ao protocolo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Justificativa da Emenda:

Enfoque principal do projeto no método de avaliação das ceratoses actínicas pela microscopia confocal a laser (MCL) devido ao baixo número de artigos científicos encontrados que correlacionem os critérios deste método ao histopatológico. Desta forma, buscaremos tornar os critérios a MCL objetivos e com quantificação numéricas, possibilitando diagnóstico e acompanhamento terapêutico.

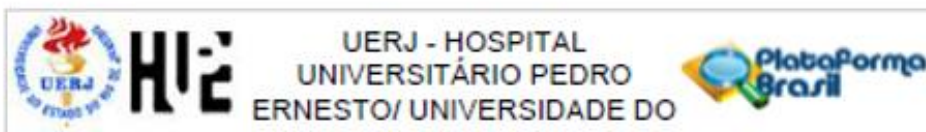
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os Termos de apresentação obrigatória estão de acordo com a legislação pertinente e devidamente assinados pelos responsáveis.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A emenda apresenta todas as informações necessárias para avaliação ética. Diante do exposto e a

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo	CEP: 20.551-030
Bairro: Vila Isabel	
UF: RJ	Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2568-8253	E-mail: cep.hupe.interno@gmail.com



Continuação do Parecer: 2.612.011

luz da Resolução CNS nº466/2012, a Emenda pode ser enquadrada na categoria – APROVADO.

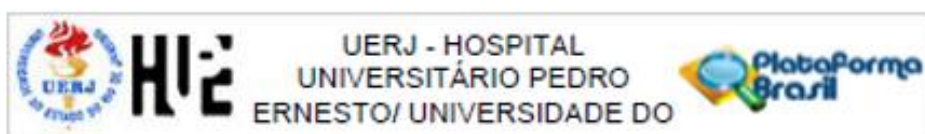
Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente, o CEP recomenda ao Pesquisador: Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e no termo de consentimento livre e esclarecido, para análise das mudanças; Informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa; O Comitê de Ética solicita a V. Sª., que encaminhe relatórios parciais de andamento a cada 06 (seis) Meses da pesquisa e ao término, encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto; Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1096458_E1.pdf	24/03/2018 21:12:45		Aceito
Parecer Anterior	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_1873813.pdf	24/03/2018 21:02:32	AMANDA NASCIMENTO CAVALLEIRO DE MACEDO MOTA DA SILVA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	BROCHURA_COMPLETA_CEP_18_03_18.docx	24/03/2018 21:01:58	AMANDA NASCIMENTO CAVALLEIRO DE MACEDO MOTA DA SILVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_apos_reformulacao.docx	24/03/2018 21:00:23	AMANDA NASCIMENTO CAVALLEIRO DE MACEDO MOTA DA SILVA	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_22mar18.pdf	24/03/2018 20:57:45	AMANDA NASCIMENTO CAVALLEIRO DE MACEDO MOTA DA SILVA	Aceito
Outros	declaracao_dencia_ass_pdf.pdf	12/02/2017 15:23:58	AMANDA NASCIMENTO CAVALLEIRO DE MACEDO MOTA DA SILVA	Aceito
Orçamento	orcamento.docx	12/02/2017	AMANDA	Aceito

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo
 Bairro: Vila Isabel CEP: 20.551-030
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
 Telefone: (21)2868-8253 E-mail: cep.hupe.interno@gmail.com



Continuação do Parecer: 2.612.011

Orçamento	orcamento.docx	15:20:54	NASCIMENTO CAVALLEIRO DE MACEDO MOTA DA SILVA	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.docx	12/02/2017 15:20:19	AMANDA NASCIMENTO CAVALLEIRO DE MACEDO MOTA DA SILVA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	carla_de_aceite.pdf	09/10/2016 12:32:34	AMANDA NASCIMENTO CAVALLEIRO DE MACEDO MOTA DA SILVA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 20 de Abril de 2018

Assinado por:
WILLE OIGMAN
(Coordenador)

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo
Bairro: Vila Isabel CEP: 20.551-030
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2668-8253 E-mail: cep.hupe.interno@gmail.com

ANEXO B – Artigo científico submetido **Experimental Dermatology**[# Home](#)[# Author](#)[# Review](#)

Submission Confirmation

 Print

Thank you for your submission

Submitted to

Experimental Dermatology

Manuscript ID

EXD-19-0419

Title

Evaluation of diagnostic criteria of actinic keratosis through reflectance confocal microscopy

Authors

Nascimento Cavalleiro de Macedo Mota, Amanda

Pifeiro-Maceira, Juan Manuel

Baptista Barcaul, Carlos

Date Submitted

09-Nov-2019

Author Dashboard

Experimental Dermatology

Evaluation of diagnostic criteria of actinic keratosis through reflectance confocal microscopy

Journal:	Experimental Dermatology
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Focus Theme Issue: Regular Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Nascimento Cavaleiro de Macedo Mota, Amanda; UERJ, Dermatology Pileiro-Macena, Juan Manuel; Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Pathology Baptista Barceul, Carlos; Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Dermatology
Area of Expertise:	Non-melanoma skin cancer
Keywords:	ACTINIC KERATOSIS, CANCER, KERATINOCYTES
Additional Keywords:	Confocal microscopy, Dermoscopy, Histopathology

SCHOLARONE[®]
Manuscripts

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Hyperkeratosis	Absent - 0	Present - 1
Parakeratosis	Absent - 0	Present - 1
Dyskeratosis	Absent - 0	Present - 1
Inflammatory cells in epidermis	Absent - 0	Present - 1
Degree of atypia in spinous layer	Absent - 0	Slight keratinocyte irregularity - 1
Intense pleomorphism with target cells, large and bizarre cells with irregular contour and prominent irregular nucleus - 5		
Keratinocytes with different cell contour size, shape and thickness - 3		
Inflammatory cells in dermis	Absent - 0	Present - 1

Figure 1 - Criteria assessed through reflectance confocal microscopy and histopathological analysis

140x101mm (300 x 300 DPI)

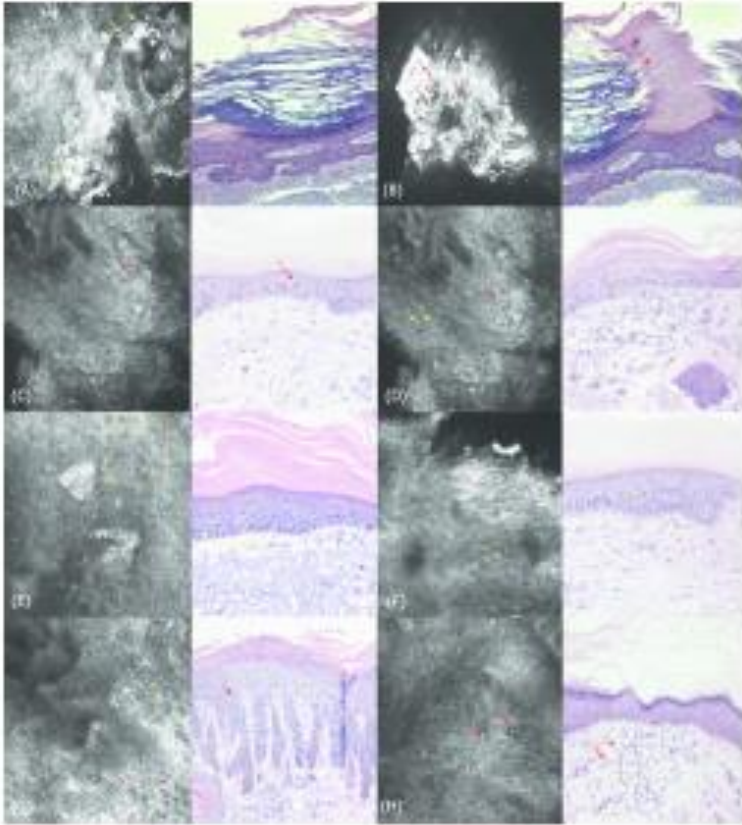


Figure 2 – Actinic keratosis diagnostic criteria
189x211mm (300 x 300 DPI)



Figure 3 - Clinical (left) and dermoscopic (right) photographs of a total of 25 actinic keratosis included in the study, identified from A to Z
169x262mm (300 x 300 DPI)

Title:

Evaluation of diagnostic criteria of actinic keratosis through reflectance confocal microscopy

Running title:

Actinic keratosis evaluation by RCM

Authors:

Amanda Nascimento Cavalleiro de Macedo Mota (Mota ANCM)^{a,b}
amandamotadermatologia@gmail.com

Juan Manuel Piñeiro-Maceira (Piñeiro-Maceira JM)^a
pineiromaceira@gmail.com

Carlos Baptista Barcaui (Barcaui CB)^a
cbbarcaui@gmail.com

^a Department of Dermatology, State University of Rio de Janeiro (UERJ), Bv. 28 de Setembro, 77 - Vila Isabel, Rio de Janeiro - RJ, 20551-030, Brazil

^b Department of Dermatology, Aviation Central Hospital, R. Barão de Itapagipe, 167 - Rio Comprido, Rio de Janeiro - RJ, 20261-003

Abstract

Background: The diagnosis of actinic keratosis (AK) is based on clinical evaluation and confirmed by histopathological analysis (HA). The challenge is to establish the correct diagnosis with a minimally invasive assessment.

Objectives: The aim of this study is to validate the analysis of AK by reflectance confocal microscopy (RCM), a cellular resolution, non-invasive imaging method and to determine the relevant parameters for diagnosis, compared to HA, by calculating the sensitivity (S), specificity (E), positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of each criterion.

Methods: Through clinical examination, 25 AKs were selected for dermoscopy and RCM evaluation followed by shaving excision for HA. Statistical analysis was done by hypothesis tests (McNemar for binary and Wilcoxon for continuous variables).

Results: There was no significant difference between RCM and HA for 5 of the 6 parameters analyzed. The criteria that were statistically relevant were: parakeratosis (p-value 0.449690; S 90%; PPV 78.26%), hyperkeratosis (p-value 0.248213; S 87.5%; E 100%; PPV 100%; NPV 25%), dyskeratosis (p-value 0.617075; S 85.71%; E 75%; PPV 94.74%; NPV 50%), spinous layer keratinocyte atypia classified as mild, moderate or severe (p-value 0.143032) and inflammation in epidermis (p-value 1.000000; S 75%; E 20%; PPV 78.95%; NPV 16.67%). RCM could not adequately measure inflammation in dermis (p-value 0.013328), despite good sensitivity (68%) and PPV (100%).

Conclusion: RCM proved to be an effective method for the diagnosis of AK, contributing to the selection of the most appropriate treatment option.

Key words:

Actinic keratosis; Confocal Microscopy; Skin neoplasm; Dermoscopy.

Conflict of interest:

The authors have no conflict of interest to declare.

Funding:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Abbreviations:

AK - Actinic keratosis

cm – centimeters

HA – Histopathological analysis

H&E - Hematoxylin & eosin

H0 - Null hypothesis

H1 – Alternative hypothesis

RCM - Reflectance confocal microscopy

RJ – Rio de Janeiro

SCC - Squamous cell carcinoma

UERJ - State University of Rio de Janeiro

UNIMORE – University of Modena and Reggio Emilia

Text word count: 2488 words

Abstract: 238 words

Number of references: 16

Number of tables and figures: 4

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Introduction

Actinic keratosis (AK) is a disease of wide public health relevance and presents an increasing incidence (Spencer et al., 2003). It is characterized by multiple erythematous and keratotic plaques, which tend to become progressively thicker. They are typically concentrated in sun-exposed areas (80% on head, neck and upper extremities) of light-skinned people. Dermatological diagnosis is based on visual inspection and eventually confirmed by histopathological analysis (HA). While visual inspection may fail to detect early changes, repeated invasive histological analysis of large areas with actinic damage are impractical. The challenge is to establish the correct diagnosis with minimal invasive assessment. Thus, some noninvasive techniques, such as dermoscopy and reflectance confocal microscopy (RCM) are being studied to increase the accuracy of in vivo diagnosis (Farnetani et al., 2013). RCM is an imaging method that allows the observation of architectural and cellular details, with no need for excision and tissue processing, allowing a good accuracy evaluation of many lesions. RCM allows the analysis of skin cells in their physiological state without retraction generated by fixation and processing through the histopathological technique. Early changes in epidermal morphology and cellular atypia may be assessed before becoming clinically clear. This technology assists in diagnosis and therapeutic monitoring, unlike histopathology, which does not allow such dynamic evaluation. Therefore, the aim of this study is to evaluate the validity of RCM for the diagnosis of AK identifying the main parameters.

Materials and methods

Study design: This is an analytical, observational, cross-sectional, single-center (UERJ) and self-comparative accuracy study to correlate the diagnostic criteria for AK by HA and RCM (Hochman et al., 2005). The research was submitted to the Research Ethics Committee of Pedro Ernesto University Hospital and approved under the number CAAE 61911116.5.0000.5239.

Patients: Patients diagnosed with AK in forearms, coming from UERJ Dermatology Outpatient Clinic in Rio de Janeiro (RJ), scheduled on demand.

Inclusion criteria: a) Patients of both genders, aged over 18 years; b) Patients with a clinical diagnosis of at least one AK lesion in the forearms; c) Knowledge and signature of the Informed Consent Form.

Exclusion Criteria: a) Pregnancy or lactation; b) Lesions suspected of transformation into SCC or exhibiting exuberant hyperkeratosis; c) Non-understanding of informed consent or refusal by patient or family member to take part; d) Topical treatment for AK on the forearms 12 weeks or fewer prior to the study; e) Other skin diseases in the area to be evaluated.

Risks: RCM is noninvasive and rarely poses a risk. However, the examined area must be shaved, and some scarring may occur.

Epidemiological evaluation: All patients underwent a questionnaire which collected demographic and epidemiological data, presence of systemic or cutaneous comorbidities, allergies, and use of medications. Patients were asked about previous treatments for AK (type, duration, and time elapsed before study inclusion). All patients were oriented to use sunscreen and to avoid sun exposure.

Clinical examination: Small erythematous plaques, consistent with AK, were submitted to clinical photography (Iphone 7 12.0 megapixels, USA), dermoscopic evaluation (3Gen DermLite DL3, USA, 10x magnification) and dermoscopic image photography (3Gen DermLite DL3 adapted for Iphone 7).

RCM examination: The selected AKs were evaluated in vivo by RCM (Vivascope® 1500, Caliber Imaging and Diagnostics Inc., Rochester, NY, USA). We used oil as an interface between the skin and the metal ring, while ultrasound gel was

applied between this ring and the RCM device. Vertical mapping (Z-stack) was performed, guided by dermoscopy (VivaCam Vivascope® 1500, Caliber Imaging and Diagnostics Inc., Rochester, NY, USA) and 200 sequential 5x5 mm images of epidermis were captured (horny, granular – GL, and spinous layers) and superficial dermis. Each new image was obtained at a depth of 1.52 micrometers from the previous one. We started image capture immediately above the horny layer. Each image, out of 3000, was examined by two dermatologists with experience in RCM.

Histopathological analysis (HA): The same AK evaluated by RCM was excised by shaving, preceded by infiltrative anesthesia (2% lidocaine), through a 13 mm Gauge 26 needle. The material was stored in formaldehyde and stained in hematoxylin & eosin (H&E). The same criteria evaluated by RCM were used for HA (Figures 1 and 2).

Statistical analysis: Considering that RCM is a useful technique for AK diagnosis, the null hypothesis (H0) is: there is no significant distinction between evaluation performed by RCM in relation to that of HA. Then the alternative hypothesis (H1) is: there is a significant distinction between the outcome of the assessment carried out by RCM and HA. McNemar test was applied for binary variables (hyperkeratosis, parakeratosis, dyskeratosis, inflammatory cells in epidermis and dermis). Wilcoxon test does not require the normal distribution and was used to evaluate keratinocyte atypia, a continuous variable. The contingency table was used to obtain sensitivity (S), specificity (E), positive (PPV) and negative predictive value (NPV) of each criterion for AK comparing RCM with HA. All statistical tests considered the significance level as $p < 0.05$ (5%) for rejecting or not the null hypothesis (Pagano et al., 2018). Excel (Microsoft Office® 2010, Microsoft Corporation, USA) was used for statistical analysis.

Results

Patients: 27 clinical AK lesions met the inclusion criteria. After careful HA, we excluded 2 lesions. One due to a collision with seborrheic keratosis. The second was excluded because it had incipient criteria for AK diagnosis (absence of parakeratosis and low-grade atypia in the spinous layer).

Demographic aspects: 25 valid samples were collected from 10 patients, 40% female and 60% male, with ages ranging from 68 to 86 years; and an average of 76.7 years. Regarding previous treatment for AK in forearms, except for 1 patient, all had been submitted to cryotherapy for other lesions over 12 months before inclusion in the study. Regarding comorbidities, 3 patients had none, 4 had diabetes mellitus, and 6 had hypertension. One patient had osteoporosis, hypertension and dyslipidemia. According to Fitzpatrick skin type scale (Fitzpatrick TB, 1975) the distribution of patients is 1 type I, 7 type II and 2 type III.

Clinical aspects: According to clinical classification, 16 lesions (64%) were classified as grade I (more palpable than visible), 9 (36%) as grade II (both visible and palpable). No grade III AK (thick and keratotic) was evaluated (exclusion criteria). Figure 3 shows clinical and dermoscopic images. All patients had other AKs in sun exposed areas (face, scalp, neck and forearms) and all were adequately treated. No adverse reactions to RCM examination or shaving excision were observed.

Aspects of RCM: Six different hypotheses were assessed, testing H0 and H1 for each criterion (table 1). There was no significant difference between RCM and HA for 5 of the 6 tested parameters. For evaluation of inflammatory cells in the dermis, p-value is below 5%, therefore, RCM did not perform an adequate analysis.

Hyperkeratosis: Presence or absence of horny layer thickness greater than 13 micrometers ($n > 10$). The measurement of the horny layers (n) averaged 26.6, with a minimum of 3 and a maximum of 30 layers. $S = 87.5\%$, $E = 100\%$, $PPV = 100\%$ and $NPV = 25\%$.

Parakeratosis: Presence of nucleated cells in the horny layer. $S = 90\%$, $E = 0\%$, $PPV = 78.26\%$ and $NPV = 0\%$.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Dyskeratosis: Presence of round nucleated cells in the spinous layer. $S = 83.71\%$, $E = 73\%$, $PPV = 94.74\%$ and $NPV = 30\%$.

Inflammatory cells in epidermis: Presence of rounded or dendritic lymphocytes of high reflectance in epidermis. $S = 73\%$, $E = 20\%$, $PPV = 78.95\%$ and $NPV = 16.67\%$.

Inflammatory cells in dermis: Presence of high reflectance rounded lymphocytes in dermis. $S = 68\%$, $PPV = 100\%$ and $NPV = 0\%$. The specificity is undefined because the calculation results in a division of 0 by 0.

keratinocyte atypia: No grade 1 (mild keratinocyte irregularity) lesions were identified, and 3 cases (12%) were determined by HA. Most AK were classified as grade 3 (keratinocyte of different shapes and sizes, with thickened cell contour) in both methods, being 16 cases (64%) through RCM and 13 (60%) through HA. Grade 3 (absence of typical honeycomb pattern, intense pleomorphism, large and eccentric target cells with irregular contour and prominent nucleus) lesions were more commonly classified in this way by RCM (9 cases; 36%) compared to HA (7 cases; 28%).

Histopathological aspects: According to histopathological classification, which relies on the extent of atypia in the epidermis measured from basal layer, 9 lesions (36%) were classified as grade I, 13 (60%) as grade II and 1 (4%) as grade III.

Discussion

Actinic keratoses are defined as erythematous and scaly plaques located in Sun exposed areas of light-skinned people. Similar to literature, our study showed involvement of patients of skin types I, II and III. Skin type II presented the largest number of patients (70%), followed by III (20%) and I (10%). In our sample composed of the typical mixed-race Brazilian population, type I is less common than in European or American literature.

The most related risk factors are chronic sun exposure, age over 40 years, immunosuppression, male gender and arsenic exposure. 33% of men and 37% of women aged between 30 and 70 years are affected (Richtig et al., 2010). This difference is attributed to men's higher occupational risk (Zalaudek et al., 2014). Our sample comprised 40% women and 60% men, with an average age of 76.7 years. Other less common risk factors, such as transplanted or p53 gene mutation genetic syndromes, were not observed due to exclusion criteria imposed by study design.

The management of AK includes education regarding sun protection and the importance of self-examination, as well as early detection and treatment, avoiding the possible progression to SCC. Once developed, AK can follow 3 different pathways: spontaneous regression, persistence or transformation into SCC, not necessarily following the clinical scale (Olsen et al., 1991). It is known that clinical examination is consistent with histological grading in only 30% of cases and should not be a predictor (Dirschka et al., 2017). In our study, adequate clinical-histological correlation was observed in 36% of cases.

Actinic keratosis characteristics associated with an increased risk for SCC progression are: induration, inflammation, diameter greater than 2 cm, rapid growth, bleeding, and ulceration. Other factors are pigmentation, pain, itching, marked keratosis, and location on head or neck (Rigel et al., 2013). Thus, in order not to have the possible bias of including an SCC or an aggressive AK, these characteristics were considered as exclusion criteria and the only location studied was the forearm.

Histological evaluation shows that 60 to 80% of SCC arise from an AK, corroborating the early treatment strategy (Rigel et al., 2013). The choice of the best

therapeutic option depends on number, size, and location. However, there is no consensus in the literature about the best choice for AK and field cancerization treatment. The association of destructive methods with topical treatments is often indicated, aiming to reduce tumor recurrence. Injury-directed treatments are particularly useful in isolated AK. Therapeutic options include: cryotherapy, electrosurgery, shave biopsy, and excision. These procedures require local anesthesia (except cryotherapy) and may evolve with scarring or pigmentary changes. These are generally fast and effective methods. On the other hand, treatment directed to the cutaneous field cancerization may promote longer remission periods. It is indicated for patients who have multiple lesions in the same anatomical area and signs of photodamage. The most commonly used options are photodynamic therapy, 5-fluorouracil, imiquimod cream, ingenol mebutate, and diclofenac.

The population we studied, except for 1 patient, had been previously submitted to cryotherapy in other lesions. This therapeutic modality is usually preferred because it is a low-cost fast technique, considered the first choice treatment according to the European consensus (Stockfleth et al., 2011).

As AK diagnosis is primarily clinical, dermoscopy is a noninvasive method that assists in this evaluation, as it allows the recognition of morphological structures that are not observed by naked eye. Training in dermoscopic interpretation and correlation with clinical and histopathological aspects is essential to increase diagnostic efficiency. The sensitivity and specificity values are 98% and 93%, respectively (Zalaudek et al., 2014). Dermoscopy is also useful in differentiating grades I, II, III and SCC, which presents different vascular patterns (punctate, glomerular or linear vessels), central keratin mass, ulceration and whitish amorphous areas (Zalaudek et al. et al., 2014). Performing this examination in all patients of this study provided a better observation of small and incipient lesions, besides corroborating the diagnosis of those more clinically classic. We avoided the inclusion of other lesions (which could be AK differential diagnoses) since evaluated patients presented a wide diversity of cutaneous photodamaged lesions. HA is indicated for doubtful cases (Ulrich et al., 2010), SCC suspicion or non-responsive to conventional treatment (Stockfleth et al., 2011). The clinical diagnosis has PPV of 81 to 94% when compared to HA (Venna et al., 2005).

RCM is another noninvasive method that has been studied to improve the assessment of AK (Ulrich et al., 2010; Pellacani et al., 2013; Peppelman et al., 2015). The following are the main diagnostic criteria described in literature. In horny layer: hyperkeratosis, parakeratosis and detached keratinocyte. In the spinous layer: dyskeratosis, atypical honeycomb pattern and inflammatory infiltrate. In dermis: inflammatory infiltrate and poorly defined dermal papillae. Solar elastosis and vasodilation are present in only 31% of cases (Ishioke et al., 2015). The most relevant criteria for distinguishing AK from SCC are architectural disruption and dermal tumor nests found only in SCC (Peppelman et al., 2015).

Unlike most studies, which do not correlate RCM with HA (accuracy and diagnostic criteria well established), our study corroborates the applicability of RCM as an effective method for AK, with a consistent correlation to HA. Another differential is systematized evaluation, through 5 criteria aiming numerical scores, which allows a better reproducibility and the possibility of evolutionary comparison of the same lesion. The showed criteria are hyperkeratosis (p-value 0.248213), parakeratosis (p-value 0.449690), dyskeratosis (p-value 0.617075), inflammation in epidermis (p-value 1.000000), and spinous layer keratinocyte atypia (p-value 0.143032). This atypia was graded into 3 different levels, which correspond to mild, moderate, or marked keratinocyte irregularity. This gradation, together with the presence or absence of other criteria, allows AK diagnosis. The evaluation of inflammatory cells in the dermis (p-value 0.013328) by RCM did not reveal a p-value above 5%, necessary to rule out different validation of HA.

RCM is limited to a depth of up to 0.3mm (equivalent to papillary dermis), but this is not a limiting factor for AK, a condition restricted to the epidermis. In extremely keratotic lesions, RCM presents reduced resolution and penetration, reaching only to SL, so this type of lesion was excluded from our study. Technical difficulties include high cost of RCM equipment, prolonged time for image acquisition, and training on examining the images.

The authors suggest as perspectives for future studies: use of a larger sample, evaluation of different locations, enlargement of the scoring system, and the use of this standardized RCM approach to compare different treatment options, developing a

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

therapeutic protocol. There is probably no well-established treatment protocol for AK
because these studies are not practical through invasive evaluation.

For Review Only

Acknowledgements

We thank UERJ Dermatology residents for referring patients assessed at general outpatient clinic for our project, the receptiveness of Prof. Pellacani and his UNIMORE RCM entire team, the statistical aid of Piñeiro-Maccira E, the brilliant cutting and staining histopathological work of Frias H, and the support of Melo DF, De Carvalho N and Faria P during this study.

For Review Only

References

- Dirschka T, Gupta G, Micali G, Stockfleth E, Basset-Séguin N, Del Marmol V et al. Real-world approach to actinic keratosis management: practical treatment algorithm for office-based dermatology. *J of Dermatol Treat* 2017;28(5): 431–442.
- Farnetani F, Scope A, Braun RP et al. Skin cancer diagnosis with reflectance confocal microscopy: reproducibility of feature recognition and accuracy of diagnosis. *JAMA Dermatol* 2015;151:1073–80.
- Fitzpatrick TB. Soleil et peau (Sun and skin). *Journal de Médecine Esthétique* (in French). 1975;(2): 33–34.
- Hochman B, Nahas FX, Oliveira Filho RS, Ferreira LM. Desenhos de pesquisa. *Acta Cir Bras* [serial online] 2003;20 Suppl. 2:02–9.
- Ishioaka P, Misia M, Rodrigues SB, Marta AC, Hirata SH. Evaluation of the therapeutic results os actinic keratosis treated with topical 5% fluorouracil by reflectance confocal laser microscopy: preliminary study. *An Bras Dermatol* 2013;90(3):426–9.
- Olsen EA, Abernethy ML, Kulp-Shorten C, Callen JP, Glazer SD, Huntley A, McCray M, Monroe AB, Tschien E, Wolf JE. A double-blind, vehicle-controlled study evaluating masoprocol cream in the treatment of actinic keratoses on the head and neck. *J Am Acad Dermatol* 1991;24:738–43.
- Pagano M, Gauvreau K. Principles of Biostatistics. 2. CRC Press.: 2018, Florida, 525p.
- Pellacani G, Ulrich M, Casari A, Prow TW, Cannillo F, Benati E, Losi A, Cesinaro AM, Longo C, Argenziano G, Soyer HP. Grading keratinocyte atypia in actinic keratosis: a correlation of reflectance confocal microscopy and histopathology. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2015;29,2216–2221.
- Peppelman M, Nguyen KP, Hoogendoorn L, van Erp PE, Gerritsen MJ. Reflectance confocal microscopy: non-invasive distinction between actinic keratosis and squamous cell carcinoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2015;29,1302–1309.
- Richtig E, Ahlgrimm-Siess V, Koller S, Gerger A, Horn M, Smolle J, Hofmann-Wellenhof R. Follow-up of actinic keratoses after shave biopsy by in-vivo reflectance confocal microscopy – a pilot study. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2010;24,293–298.
- Rigel DS, Steingold LF. The importance of early diagnosis and treatment of actinic keratosis. *J Am Acad Dermatol* 2013;68, N1: 520–27.
- Spencer JM, Hazan C, Hsiung SH, Robins P. Therapeutic decision making in the therapy of actinic keratoses. *J Drugs Dermatol* 2003;4:296–301.

Stockfleth E, Terhorst D, Braathen L, Cribier B, Cerio R, Ferrandiz C. Guideline on Actinic Keratoses, developed by the Guideline Subcommittee «Actinic Keratoses» of the European Dermatology Forum. 2011.

Ulrich M, Krueger-Corcoran, Roewert-Huber, Sterry, Stockfleth, Astner: Reflectance confocal microscopy monitoring of actinic keratosis. *Dermatology* 2010;220:13-24.

Venna SS, Lee D, Stadedker MJ, Rogers GS: Clinical recognition of actinic keratoses in a high-risk population. How good are we? *Arch Dermatol* 2005;141:307-309.

Zalaudek I, Piana S, Moscarella E, Longo C, Zendri E, Castagnetti F, Pellacani G, Lallas A, Argenziano G. Morphologic grading and treatment of facial actinic keratosis. *Clinics in Dermatol* 2014;32,80–87.

For Review Only

Tables

Table 1 – P-value corresponding to each diagnostic criterion obtained by McNemar (first five parameters) and Wilcoxon tests (last parameter)

Criteria	p-value
Inflammatory cells (epidermis)	1.000000
Dyskeratosis	0.617073
Parakeratosis	0.449690
Hyperkeratosis	0.248213
Inflammatory cells (dermis)	0.013328*
Keratinocyte atypia	0.143032

Legends

Figure 1 - Hyperkeratosis is defined as horny layer thickness greater than 15 micrometers (Peppelman et al., 2015). This measurement is obtained by $n \times 1.52$ (thickness of n in micrometers). Thus, hyperkeratosis was classified as present when the cutoff count (n) was higher than 10. Keratinocyte atypia is classified in 5 grades (Pelleciani et al., 2015). Although, grades 2 (partial loss of keratinocyte contour) and 4 (greater atypia and bright intercellular contour) were omitted because of their lack of reproducibility in histopathology.

Figure 2 – Reflectance confocal microscopy (left) and histopathological analysis (right): (A) Hyperkeratosis: arrows show the high reflectance horny layer. (B) Parakeratosis: Arrows show rounded nuclei in the horny layer. (C) Dyskeratosis: Arrows point to round nucleated cells in the spinous layer. Asterisk shows solar elastosis in dermis. (D) Epidermal inflammatory infiltrate: round cells (yellow arrows) and dendritic cells (red arrow). (E) Mild atypia in the spinous layer: square delimits area that exhibits slight keratinocyte irregularity. (F) Moderate atypia in the spinous layer: the asterisk shows area with thickened cellular contour keratinocytes. (G) Severe atypia in the spinous layer: target cell evidenced by the yellow arrow and red arrows showing intense pleomorphism. (H) Dermal inflammatory infiltrate: round lymphocytes showed by red arrows.

Figure 3 - A, B, E-G, I, J, L, N-P, R, T-V and Z: Grade I lesions (more palpable and barely visible), which are difficult to be identified in clinical photography, but more evident through dermoscopy as a red pseudo network. C, D, H, K, M, Q, S, X and Y: Grade II lesions, which are clearly erythematous plaques, exhibiting red background and keratotic follicular openings, through dermoscopy.

Table 1 - The asterisk shows a statistically significant difference between reflectance confocal microscopy and histopathological analysis.