PAULA SILVA FERREIRA

**Uso da microscopia confocal de reflectância na avaliação de
queilite actínica: padrões pareados com histologia e sinais
precoces de evolução para carcinoma espinocelular**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutora em Ciências

Programa de Dermatologia

Orientador: Prof. Dr. Marcello Menta Simonsen Nico

**São Paulo
2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Ferreira, Paula Silva

Uso da microscopia confocal de reflectância na
avaliação de queilite actínica : padrões pareados com
histologia e sinais precoces de evolução para
carcinoma espinocelular / Paula Silva Ferreira. --
São Paulo, 2019.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Dermatologia.

Orientador: Marcello Menta Simonsen Nico.

Descritores: 1.Queilite 2.Microscopia confocal
3.Carcinoma de células escamosas 4.Neoplasias
bucais

USP/FM/DBD-201/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

À casa de Arnaldo e ao Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, minha segunda casa e onde encontrei uma segunda família.

Aos meus amados pais, José Luiz e Célia e aos meus amados irmãos, Luiza e Felipe, ao querido Denis, aos meus companheiros de panela e a toda minha família e amigos, pelo amor, amizade e por sempre deixar a vida mais leve.

Ao Deus que em mim e em tudo habita, por me guiar por essa existência.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Marcello Menta Simonsen Nico, meu querido orientador, agradeço imensamente a introdução ao universo da microscopia confocal e o incentivo permanente à paixão pela dermatologia.

À Professora Doutora Sílvia Vanessa Lourenço, igualmente agradeço pela introdução à microscopia confocal, pelo incentivo a iniciar um ambulatório de microscopia confocal no Departamento de Dermatologia do HCFMUSP e pelos ensinamentos de histopatologia, fundamentais para realização desse trabalho.

Aos Professores Doutores José Antonio Sanchez Junior e Cyro Festa Neto, pelo apoio e suporte para que essa tese fosse concluída.

À Doutora Ana Patrícia Carneiro Gonçalves Bezerra, pela parceria e amizade durante o início do ambulatório de microscopia confocal e pelo auxílio na realização dos exames de microscopia confocal e dos exames anatomopatológicos da mucosa oral.

Às Doutoras Lilian Kelly Faria Licarião Rocha e Marcella Veronica Ricaurte Jimenez e mais recentemente Caroline Takatu Maris, pela parceria, amizade e pelo auxílio fundamental na condução do ambulatório de microscopia confocal.

À Doutora Claudia Giuli Santi, pela amizade especial, conselhos e incentivo à finalização dessa obra.

À Doutora Denise Miyamoto, pela amizade e pela revisão e conselhos em relação a obra final.

À Doutora Claudia Giuli Santi, Professor Doutor Vitor Manoel Silva dos Reis, Doutor Eugenio Pimental e Professora Doutora Sheyla Bologna pela amizade e pelas correções e preciosas sugestões na melhoria desse trabalho.

Aos meus amigos e parceiros de HC, Doutores Luciana Samorano e João Avancini, pela amizade e estímulo constante tanto na vida profissional, quanto pessoal.

À Ruth Eugenio Meneses, ao Rodrigo Nakagawa e ao Marcelo Alves pela paciência e eficiência em me auxiliar nos trâmites da pós-graduação.

Às amigas do Nice e aos meus demais amigos, mestres, preceptores, residentes, alunos e pacientes do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, pelas trocas e experiências fundamentais a medicina que pratico hoje.

Aos Professores da banca examinadora, pela participação nessa etapa de conclusão do doutorado, etapa tão importante da minha vida.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2016.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	A queilite actínica (QA)	2
1.2	A microscopia confocal de reflectância (MCR)	3
2	OBJETIVOS.....	5
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	7
3.1	Queilite actínica	8
3.1.1	Histórico e conceito	8
3.1.2	Manifestações clínicas	8
3.1.3	Diagnóstico histopatológico.....	9
3.1.4	CEC superficialmente invasivo.....	10
3.1.5	CEC do lábio	11
3.1.6	Progressão da queilite actínica para CEC invasivo	13
3.1.7	Técnicas de imagem <i>in vivo</i> para avaliação da queilite actínica ...	14
3.2	Microscopia confocal de reflectância	15
3.2.1	Histórico e conceito	15
3.2.2	Correlação com histopatologia e glossário.....	18
3.2.3	Microscopia confocal de reflectância do lábio normal	20
3.2.4	Microscopia confocal da queilite actínica e carcinoma espinocelular do lábio.....	21
4	MÉTODOS.....	24
4.1	Casuística	25
4.2	Métodos	26
4.2.1	Avaliação clínica.....	26
4.2.2	Intervenção com MCR.....	27
4.2.3	Análise histopatológica.....	31
4.2.4	Correlação entre MCR e histopatologia	32
4.2.5	Análise estatística	32
4.2.6	Achados éticos	33

5	RESULTADOS	34
5.1	Dados gerais.....	35
5.2	Achados clínicos	37
5.3	Achados da MCR.....	38
5.3.1	Achados da MCR no lábio normal.....	38
5.3.2	Achados da MCR da superfície - camada semimucosa.....	40
5.3.3	Achados da MCR na junção entre semimucosa e lâmina própria	42
5.3.4	Achados da MCR no nível da lâmina própria	44
5.4	Análise histopatológica	46
5.5	Correlação de MCR e histopatologia	49
5.6	Análise estatística	52
5.6.1	Resultados da análise comparativa com o teste de Fisher, <i>odds ratio</i> (razão de chances) e valores de significância (p) das características clínicas.....	52
5.6.2	Resultados da análise comparativa com o teste de Fisher, <i>odds ratio</i> (razão de chances) e valores de significância (p) dos achados da MCR.....	53
5.6.3	Resultados de sensibilidade e especificidade para as variáveis avaliadas no estudo: características clínicas e achados da MCR	55
5.6.4	Resultado do teste de regressão logística binária e análise multivariada considerando as variáveis clínicas e de MCR que apresentaram significância (p) menor ou igual a 5% no teste de Fisher.....	57
5.6.5	Critérios diagnósticos de CEC labial através da MCR obtidos a partir dos testes de regressão logística binária e análise multivariada	58
6	DISCUSSÃO.....	60
7	CONCLUSÕES.....	67
8	ANEXOS.....	69
9	REFERÊNCIAS	82

Listas de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

a	anos
AC	Actinic cheilitis
CAPPesq	Comitê de Ética e Pesquisa
CEC	carcinoma espinocelular
CIS	carcinoma espinocelular in situ
cm	centímetro
et al.	E outros
Fem.	Feminino
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HC	Hospital das clínicas
HD	Hard disk drive
HE	Hematoxilina eosina
LP	Lâmina própria
Masc.	Masculino
MCR	Microscopia confocal
mm	Milímetros
mW	Miliwatt
NA	<i>Numerical aperture</i>
nm	Nanômetro
NY	New York
QA	Queilite Actínica
RCM	Reflectance confocal microscopy
SCC	Squamous cell carcinoma
x	Vezes
µm	Micrômetro
%	Por cento
UV	Ultravioleta
TRFS	Espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo

Lista de Figuras

Figura 1. Princípio da microscopia confocal (Nehal et al., 2008).....	17
Figura 2. (a) Aparelho de microscopia confocal de reflectância VIVASCOPE 3000 utilizado na avaliação dos casos de queilite actínica.	30
Figura 3. Características clínicas de queilite actínica difusa.	38
Figura 4 . Achados da MCR obtidos a partir do vivascope 3000 no lábio normal	39
Figura 5. Achados da MCR na superfície semimucosa.....	41
Figura 6. Achados da MCR entre a semimucosa e a lâmina própria.....	43
Figura 7. Achados da MCR na lâmina própria.....	45
Figura 8. Achados histopatológicos. Diagnóstico de displasia epitelial e diagnóstico de CEC.....	48
Figura 9. Caso de CEC acantolítico.	51
Figura 10. Caso de CEC superficialmente invasivo com pérolas córneas.	51

Diagramas

Diagrama 1. Total de casos avaliados, casos incluídos e casos excluídos do estudo..... 26

Diagrama 2. Divisão dos casos em 2 grupos após o resultado histopatológico definitivo 35

Lista de Tabelas

Tabela 1. Critérios de MCR já descritos para o diagnóstico de QA e queratose actínica e CEC e sua morfologia no exame de MCR	23
Tabela 2. Critérios de MCR das camadas superficiais do epitélio semimucoso	29
Tabela 3. Critérios de MCR da junção entre lâmina própria-epitélio semimucoso	29
Tabela 4. Critérios de MCR da lâmina própria	29
Tabela 5. Dados epidemiológicos de cada caso e diagnóstico histopatológico	36
Tabela 6. Frequência das características clínicas no grupo de casos com diagnóstico histopatológico de displasia parcial epitélio e no grupo com diagnóstico histopatológico de CEC	37
Tabela 7. Frequência dos achados de MCR na camada semimucosa no grupo com diagnóstico histopatológico de displasia parcial do epitélio e no grupo com CEC	42
Tabela 8. Frequência dos achados da MCR na junção entre semimucosa e lâmina própria no grupo de casos com diagnóstico histopatológico de displasia parcial do epitélio e no grupo com de CEC	42
Tabela 9. Frequência dos achados da MCR na lâmina própria no grupo com diagnóstico histopatológico de displasia parcial do epitélio e no grupo com CEC	44
Tabela 10. Frequência dos diagnósticos histopatológicos definitivos em números absolutos e porcentagem no grupo total avaliado durante o estudo ..	47
Tabela 11. Frequência dos achados clínicos nos dois grupos avaliados (QA e CEC)	52
Tabela 12. Frequência dos achados de MCR nos dois grupos avaliados (QA e CEC)	54
Tabela 13. Sensibilidade e especificidade dos achados clínicos nos dois grupos avaliados (QA e CEC)	56
Tabela 14. Sensibilidade e especificidade dos achados de MCR nos dois grupos avaliados (QA e CEC)	56
Tabela 15. Resultado do teste de regressão logística binária** considerando as variáveis que apresentaram significância (p) menor ou igual a 5% no teste de Fisher	58
Tabela 16. Score elaborado a partir dos testes de regressão logística binária e análise multivariada	59

Resumo

Ferreira PS. *Uso da microscopia confocal de reflectância na avaliação de queilite actínica: padrões pareados com histologia e sinais precoces de evolução para carcinoma espinocelular* (tese). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Fundamentos: A queilite actínica (QA) é uma alteração clinico-histopatológica dos lábios causada pela exposição solar crônica e prolongada. Clinicamente, é caracterizada por achados difusos e mal delimitados e a histopatologia mostra múltiplos focos de displasia de intensidade variável, muitas vezes até com progressão para carcinoma espinocelular (CEC) sem lesão clínica óbvia e aparente. A adequada avaliação clínica do dano actínico tem sido considerada difícil, pois muitas vezes o achado clínico não tem correlação com o grau de atipia histopatológico. A microscopia confocal de reflectância (MCR) é um método de imagem não invasivo para avaliação de lesões cutâneas superficiais, que permite guiar o local da biópsia e monitorizar o tratamento de diversas doenças cutâneas. **Objetivos:** Estudar, por meio da MCR, casos clínicos difusos de queilite actínica, guiar a biópsia desses casos e identificar critérios de MCR que permitam a identificação precoce de progressão para CEC do lábio. **Métodos:** Foi realizado um estudo com casos clínicos de QA matriculados no ambulatório da Dermatologia da Faculdade de Medicina da universidade de São Paulo (FMUSP) de março de 2015 a fevereiro de 2018. A MCR foi realizada em toda a extensão do lábio inferior. Os locais que mostraram mais alterações na MCR, de acordo com critérios previamente estabelecidos para QA e CEC, foram biopsiados. Foi avaliada a correlação entre a MCR e a histopatologia. **Resultados:** Foram incluídos 61 casos com diagnóstico de QA do lábio inferior, em 43 homens e 18 mulheres. Todos os doentes eram de pele clara (fototipo I e II), com idades variando de 29 a 87 anos, com idade média de 65 anos. A análise histopatológica das biópsias realizadas mostrou displasia epitelial parcial do epitélio em 25 casos (41%) e CEC em 36 (59%). Os critérios da MCR para QA identificados foram escama, hiperqueratose / paraqueratose, padrão de favo de mel atípico (desarranjo) no estrato espinhoso e granuloso, células grandes e arredondadas (disqueratósicas) na epiderme e lâmina própria, papila mal delimitada, papila preenchida por células, ninhos de células da lâmina própria, vasos arredondados / dilatados, inflamação, elastose e fibroplasia de colágeno. Papila mal delimitada (sensibilidade de 84% e especificidade de 88%), papilas preenchidas por células (sensibilidade de 82% e especificidade de 93%), inflamação (sensibilidade de 68% e especificidade de 68%), células grandes e arredondadas (sensibilidade de 65% e especificidade de 100%) e ninhos na lâmina própria (sensibilidade de 54% e especificidade de 100%) são critérios da MCR que podem identificar o CEC incipiente do lábio. **Discussão:** Dentre os casos avaliados, nenhum apresentava característica clínica de CEC e, por meio do exame de MCR, foi possível o diagnóstico de lesões incipientes. Após Além disso, a MCR possibilitou a escolha da área mais suspeita para biópsia. **Conclusões:** A MCR pode ser utilizada para monitorizar casos de QA, guiar o local da biópsia e identificar a progressão precoce da QA para CEC.

Descritores: Queilite. Microscopia confocal. Carcinoma de células escamosas. Neoplasias bucais.

Summary

Ferreira PS. *Use of reflectance confocal microscopy (RCM) in the evaluation of clinical cases of actinic cheilitis and RCM criteria for progression to squamous cell carcinoma: a prospective study (thesis)*. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Background: Actinic cheilitis (AC) is a diffuse clinical-histopathological alteration of the lip caused by chronic and prolonged sun exposure. Clinically, it is characterized by diffuse and poorly defined findings and histopathology shows multiple foci of dysplasia of variable intensity, and even progression to squamous cell carcinoma (SCC) without obvious and apparent clinical lesion. The adequate clinical evaluation of actinic cheilitis has been considered difficult, since the clinical finding does not correlate with the histopathological damage. Reflectance confocal microscopy (RCM) is a noninvasive imaging method for the evaluation of superficial cutaneous lesions, that can guide the biopsy site and monitor the treatment of various diseases. **Objectives:** To study, through RCM, diffuse clinical cases of AC, to guide the biopsies sites of these cases and to identify RCM criteria that allow the early identification of progression to SCC of the lip. **Methods:** Patients with clinical cases of AC were enrolled in the Dermatology department of Faculty of Medicine of University of Sao Paulo (FMUSP) from March of 2015 to February of 2018. RCM was performed over the entire extension of the lower lip. The sites that showed the highest degree of alteration in the RCM, according to previously established criteria for AC and SCC, were biopsied. The correlation between RCM and histopathology was analyzed. **Results:** We included 61 cases with diagnosis of lower lip AC, 43 men and 18 women. All patients were fair-skinned, ranging in age from 29 to 87 years, mean age 65 years. The histopathological analysis of the biopsies performed showed partial epithelial dysplasia in 25 cases (41%) and SCC in 36 (59%). RCM criteria for AC were scales, hyperkeratosis / parakeratosis, atypical honeycomb pattern (derangement) in the stratum spinosus and granulosa, large and rounded (dyskeratotic) cells in the semimucosa and lamina propria, poorly defined papilla, papilla filled by cells, nests in the lamina propria, rounded / dilated vessels, inflammation, elastosis, and collagen fibroplasia. Poorly defined papilla (84% sensitivity and 88% specificity), papilla filled by cells (82% sensitivity and 93% specificity), inflammation (68% sensitivity and 68% specificity), large and rounded cells (65% sensitivity and 100% specificity) and nests in the lamina propria (54% sensitivity and 100% specificity) are RCM criteria that can identify incipient lip SCC. **Discussion:** Among the evaluated cases, none had an obvious clinical characteristic of SCC and, through the examination with RCM, it was possible to diagnose incipient lesions. In addition, the RCM made it possible to choose the most suspected area for biopsy. **Conclusions:** RCM can be used to monitor AC cases, guide the biopsy site, and identify the early progression of AC to SCC.

Keywords: Cheilitis. Confocal microscopy. Squamous cell carcinoma. Oral neoplasia. of the lower lip.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A queilite actínica (QA)

A queilite actínica (QA) é uma alteração clínico-histopatológica difusa do lábio induzida pela exposição solar crônica. A prevalência de QA na população geral varia de 0,45 a 2,4%¹.

Clinicamente, a QA apresenta alterações multifocais e mal definidas do lábio inferior que incluem: borramento do limite do vermelhão do lábio inferior e a pele, áreas avermelhadas, atrofia, escamas, pápulas ou placas brancas queratóticas, áreas amareladas, crostas e erosões². As características anatômicas e histológicas do vermelhão labial fazem com que as lesões se apresentem frequentemente difusas e mal delimitadas por sua extensão e a histopatologia da queilite actínica mostra diversos pontos com alterações epiteliais de intensidade variável ao longo de todo lábio, como em um campo de cancerização³.

A adequada avaliação da QA e sua progressão para carcinoma espinocelular (CEC) é considerada difícil, pois muitas vezes o achado clínico não tem correlação com o dano histológico: lesões clinicamente exuberantes podem mostrar apenas discretas alterações histopatológicas e casos clinicamente insuspeitos por sua vez apresentar dano epitelial significativo⁴.

O diagnóstico e tratamento precoces são desejáveis uma vez que a QA pode evoluir para CEC invasivo⁵. A progressão da queilite actínica não tratada para CEC invasivo é estimada entre 3,07% a 16,9%^{6,7,8}. O CEC do lábio inferior apresenta um risco maior de progressão metastática e recorrências, quando

comparado ao CEC de outros locais de pele que sofreram dano actínico crônico^{2,9}.

O CEC invasivo do lábio é suspeitado e diagnosticado clinicamente quando uma pápula infiltrada, nódulo, úlcera, verrucosidade ou vegetação estão presentes. Entretanto casos de CEC incipiente ou invasivo foram relatados em biópsias de QA diagnosticadas clinicamente, ou seja, sem sinais clínicos evidentes de progressão para CEC¹⁰. Além disso, em uma série de casos, foram realizados cortes histológicos seriados de produtos de vermelhectomias indicadas por QA clinicamente difusa e esses cortes demonstraram CEC em até 50% dos casos de QA clínica, sem evidência clínica óbvia de CEC invasivo¹¹.

Uma das estratégias de seguimento para QA é o monitoramento clínico das alterações e realização de biópsias incisionais (indicadas de acordo com a aparência clínica da lesão ou surgimento de novas lesões) para prever possível transformação maligna. Entretanto, nessa abordagem, a gravidade da alteração clínica muitas vezes não corresponde aos achados histopatológicos, tornando-se um desafio o diagnóstico clínico da progressão de QA para CEC incipiente¹⁴.

1.2 A microscopia confocal de reflectância (MCR)

A MCR é um método de imagem não invasivo *in vivo*, que tem sido frequentemente utilizado no diagnóstico e acompanhamento de muitas lesões cutâneas. A MCR permite imagens em tempo real da epiderme até a derme

superficial com resolução celular próxima à histopatologia convencional^{12,13}. Como a QA mostra-se como múltiplos focos descontínuos de grau variável de displasia epitelial, incluindo progressão para CEC não diagnosticada clinicamente¹⁴, questionamos se com o uso de MCR na avaliação e monitoramento da QA, seria possível identificar critérios para diferenciar uma displasia de um caso de CEC incipiente, orientar locais de biopsia e fazer uma diagnóstico precoce de progressão para CEC em lesões ainda clinicamente não detectáveis.

2 OBJETIVOS

1. Avaliar e mapear casos de queilite actínica difusa do lábio inferior com o auxílio da microscopia confocal de reflectância (MCR).
2. Guiar os locais de biopsia pelas áreas que apresentem a maior alteração epitelial de cada caso de acordo com critérios de MCR já descritos na literatura para queratose actínica/queilite actínica e carcinoma espinocelular.
3. Estabelecer critérios de MCR que possam diferenciar alteração epitelial displásica inicial de um caso de carcinoma espinocelular labial em lesões clinicamente indistinguíveis.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Queilite actínica

3.1.1 Histórico e conceito

A QA foi descrita pela primeira vez em 1923 por Ayres e pode ser considerada uma queratose actínica do lábio sendo, portanto, uma lesão precursora do carcinoma espinocelular. Havia confusão da origem dessa condição que, por vezes, era considerada um eczema causado pelo vento e por alterações climáticas. Observações epidemiológicas posteriores vieram confirmar sua relação etiológica com a exposição solar crônica e prolongada¹⁵.

A QA caracteriza-se clínica e histopatologicamente como uma doença difusa, com graus variáveis de displasia ao longo da extensão dos lábios, podendo apresentar progressão para neoplasia maligna invasiva em pontos focais únicos ou múltiplos, como ocorre classicamente em um campo de cancerização³.

3.1.2 Manifestações clínicas

Clinicamente a QA caracteriza-se pela presença, em maior ou menor intensidade, das seguintes alterações clínicas: borramento do limite entre o vermelhão do lábio e a pele, eritema, descamação, atrofia, placas brancas queratósicas, áreas amareladas (elastose), crostas e erosões. A QA pode se manifestar tanto no lábio superior quanto no inferior, sendo mais frequente o

acometimento do lábio inferior que pode ocorrer de maneira isolada em até 97% dos casos^{16,17}.

A adequada avaliação clínica da queilite actínica tem sido considerada difícil, pois muitas vezes o achado clínico não tem paralelo com o dano histológico. Lesões clinicamente exuberantes às vezes mostram apenas discretas alterações histopatológicas e casos clinicamente insuspeitos podem apresentar dano epitelial significativo. Somam-se a isso as características anatômicas e histológicas do vermelhão labial, que fazem as lesões se apresentar frequentemente difusas e mal delimitadas por sua extensão.

Vários autores^{1,4,11,17} têm tentado relacionar os achados clínicos com os histopatológicos com a finalidade de se estabelecerem parâmetros clínicos indicativos de lesão epitelial significativa à histopatologia. A importância de cada achado tem variado conforme o autor consultado. Em casos de carcinomas invasivos pequenos, é comum não haver detecção clínica como mostra uma série publicada de 20 casos de queilite actínica difusa onde o vermelhão labial foi excisado e inteiramente analisado por cortes seriados de histopatologia e, onde, foram encontrados múltiplos focos de carcinomas em 50% dos casos avaliados¹¹.

3.1.3 Diagnóstico histopatológico

3.1.3.1 Classificação e gradação histopatológica

A gradação histopatológica de displasia epitelial é utilizada para alterações pré-neoplásicas epiteliais de órgãos como a cavidade oral, laringe e

colo uterino. A graduação histopatológica das lesões malignas epiteliais intra-orais foi também adotada para análise de lesões no vermelhão do lábio no XIV Congresso Internacional de Câncer¹⁸. Essa gradação avalia critérios arquiteturais e citológicos das alterações do epitélio da mucosa e semimucosa que incluem alterações citológicas e histomorfológicas:

Alterações citológicas: células e núcleos aumentados, nucléolos grandes, hipercromasia nuclear, núcleos pleomórficos, queratinização individual (disqueratose), aumento no número de mitoses, mitoses atípicas.

Alterações histomorfológicas: papilas epiteliais em forma de gota, perda da polaridade, pérolas córneas, perda da coesão celular.

As alterações arquiteturais são classificadas em¹⁹:

I- Displasia leve - alterações celulares e arquiteturais limitadas à camada basal e para-basal;

II- Displasia moderada - comprometimento celular desde a camada basal até a metade da espinhosa;

III- Displasia intensa - comprometimento celular e arquitetural da camada basal até acima da metade do epitélio;

IV- Carcinoma espinocelular *in situ* (CIS) - desarranjo arquitetural acompanhado de alterações citológicas em toda a espessura do epitélio.

3.1.4 CEC superficialmente invasivo

O CEC superficialmente invasivo (também conhecido como CEC microinvasivo, minimamente invasivo, precocemente invasivo) é definido como um câncer que infiltra o compartimento superficial da lâmina própria ou da derme²⁰.

Por mais simples que isso possa parecer, o diagnóstico de CEC superficialmente invasivo pode ser subjetivo, sem definição unânime entre os patologistas²¹.

Para lesões laríngeas, a definição mais aceita para o carcinoma microinvasivo é a presença de CEC invasivo que se estende até 0,5 mm do estroma, medido a partir da membrana basal epitelial adjacente (não-neoplásica)²². Na pele, o CEC superficialmente invasivo foi definido como nível II de Clark (invasão da derme papilar)²³. Não foi encontrada a definição do conceito de CEC superficialmente invasivo para CEC da semimucosa labial, por esse motivo utilizamos a definição de CEC superficialmente invasivo de mucosas do trato aerodigestivo superior²⁰.

3.1.5 CEC do lábio

A progressão da QA não tratada para CEC invasivo é estimada entre 3,07% a 16,9%⁶. A radiação ultravioleta (RUV) tem sido implicada como um dos mais fortes fatores de risco para o desenvolvimento do CEC do lábio. Há uma incidência maior de CEC labial em pessoas com pele clara e naquelas com exposição solar crônica. Além disso, a localização mais comum para o CEC labial é a borda lateral inferior do vermelhão labial, que é a parte do lábio mais provável de receber RUV^{7,8,24}.

O CEC do lábio inferior é relatado juntamente com carcinomas orais nas estatísticas oficiais brasileiras e ocupa a quinta posição nas estatísticas de 2018 de neoplasias malignas do Ministério da Saúde do Brasil²⁵. Estima-se que o CEC labial constitua de 21,7% a 24,7% de todo o câncer oral²⁶. O CEC invasivo de lábio inferior tem um risco maior de metástase quando comparado

com CEC de outros locais da pele danificados pela RUV, fazendo com que um diagnóstico precoce desta condição seja imperativo para reduzir o risco de progressão do tumor para outros locais e minimizar a agressividade da abordagem terapêutica²⁷.

A taxa de mortalidade geral do CEC de lábio é baixa, com uma média de aproximadamente 2%. Por sua vez, a taxa de disseminação nodal varia entre 2,3% a 5,2% no geral. A sobrevida global do CEC de lábio inferior em 5 anos é de 82,1%, e as taxas de metástase linfonodal são variáveis e fortemente correlacionadas com o tamanho do tumor. De acordo com o estadiamento do tamanho do tumor (T), o acometimento linfonodal durante o seguimento varia de 3,4% a 7% para estadiamento T1 (CEC invasivo até 2 cm), 11% a 35% para tumores com estadiamento T2 (tumores com tamanho entre 2 e 4 cm), e 17% a 100% para tumores com estadiamento T3 (maiores que 4 cm) e com estadiamento T4 (tumores que invadem estruturas adjacentes como musculatura e ossos)²⁸.

Na literatura dermatológica, tem sido sugerido que o CEC dos lábios apresenta maior risco e comportamento clínico mais agressivo quando comparado a outros CECs cutâneos de localização em cabeça e pescoço, enquanto várias fontes de otorrinolaringologia sugerem que o CEC labial tem um prognóstico mais favorável em comparação ao CEC oral. A taxa de sobrevida de um ano para o estágio inicial do CEC do lábio é de 90%, no entanto, na presença de metástases linfonodais de pescoço, a taxa de sobrevida diminui em 50%²⁹. O CEC do lábio tem uma propensão para drenagem linfática variável e, muitas vezes, o acometimento por metástases linfonodais ocorre bilateralmente, o que pode ser uma complicação ao estadiamento nodal preciso^{30,31,32}.

3.1.6 Progressão da queilite actínica para CEC invasivo

Histologicamente, a progressão da QA para CEC superficialmente invasivo ou CEC invasivo pode ocorrer em duas fases não relacionadas. O primeiro é o desenvolvimento a partir de um *continuum* do CIS ou de displasia intraepitelial de alto grau de todas as camadas epiteliais. A segunda é a invasão da lâmina própria sem a ocorrência displasia intraepitelial de espessura total ou CIS. No trato aerodigestivo superior, particularmente na laringe, o CIS não é pré-requisito para o desenvolvimento de carcinoma espinocelular invasivo. Esses carcinomas invasivos afetam a camada celular basal e a lâmina própria subjacente, sem evidência de displasia total do epitélio mucoso. Uma alteração histopatológica que indica a progressão para um CEC invasivo é a presença de granuloma de queratina nas camadas superficiais da lâmina própria. Tal achado é uma evidência presumida da presença de CEC superficialmente invasivo em casos onde a invasão não está clara²¹.

A invasão superficial da lâmina própria ou o CEC superficialmente invasivo é uma lesão biologicamente maligna, potencialmente capaz de ter acesso a canais linfáticos ou vasculares na lâmina própria e, portanto, capaz de resultar em doença metastática. Para o carcinoma superficialmente invasivo de localização na glote ou laringe, vários estudos mostraram que o significado clínico é similar ao CIS / displasia epitelial de alto grau. Tanto os carcinomas superficialmente invasivos, quanto os CIS ou displasia de alto grau tratados com terapia apropriada (excisão e/ou radioterapia) não evoluem para um carcinoma mais invasivo ou disseminação nodal e à distância³³. Diferentemente dos carcinomas superficialmente invasivos da com a glote e laringe, os carcinomas

superficialmente invasivos da região supraglótica evoluem para doença metastática em aproximadamente 20% dos casos³⁴. Não há relato na literatura que aborde o comportamento biológico do CEC da semimucosa labial, ou que relate quais lesões precursoras (o CIS ou o carcinoma superficialmente invasivo) teriam maior risco para progredir para invasão.

A literatura, portanto, é rica em estudos sobre as lesões incipientes (queilite actínica) e lesões avançadas (CEC invasivo), porém há poucos relatos a respeito das lesões onde a progressão está em sua fase inicial, antes que o diagnóstico de carcinoma do lábio possa ser estabelecido até mesmo clinicamente (clássicas lesões nódulo-ulceradas no vermelhão). Nessa fase inicial de progressão tumoral, as lesões podem ainda ser totalmente curáveis¹⁹. Entretanto, é impossível se antever quais progredirão para tumores maiores ou mesmo para metástases ou se permanecerão por muito tempo nessa fase de crescimento superficial.

3.1.7 Técnicas de imagem *in vivo* para avaliação da queilite actínica

Além do exame clínico, foram descritas técnicas de imagem *in vivo* para avaliar a QA. Uma publicação prévia estudou 14 casos de QA com espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo (TRFS), mas não conseguiu correlacionar os achados de imagem com o grau de displasia pelo uso exclusivo do método³⁵. Posteriormente também foi relatado o uso de um algoritmo automatizado com TRFS para diferenciar a QA de casos controle de lábios sem alterações³⁶. Outro método relatado para identificar lesões e alterações não observadas clinicamente e orientar biopsias foi a videoroscopia,

com esse método e realização de biopsia em ponto único, foi detectado CEC em 5,4% das biopsias de QA clínica³⁷. Entretanto, nesses casos, a extensão completa dos lábios inferiores não foi avaliada por histopatologia.

A dermatoscopia é outro método de imagem já descrito na avaliação da QA difusa clínica, mas seu uso não foi relatado para orientar o local da biopsia, e sim para diferenciar casos de QA de casos de queilite de células plasmáticas³⁸. A dermatoscopia também foi usada para diagnosticar um caso de CEC no lábio inferior; no caso descrito, um nódulo verrucoso e, portanto, a suspeita clínica de CEC invasivo já estava presente³⁹. A dermatoscopia também foi relatada em um estudo retrospectivo de 22 casos de CEC de lábio inferior comprovados histologicamente, mostrando que, a presença de escamas é a característica mais importante para diagnóstico dermatoscópico de CEC labial⁴⁰.

3.2 Microscopia confocal de reflectância

3.2.1 Histórico e conceito

Em 1955, Marvin Minsky, na época um pós-graduando na Universidade de Harvard, criou o sistema de microscopia confocal, o qual foi patenteado em 1957⁴¹.

Entretanto, apenas em 1995 o sistema criado por Minsky foi utilizado para o desenvolvimento do microscópio confocal como o conhecemos nos dias de hoje. Nesse ano, o protótipo criado capturou imagens da epiderme e da derme papilar com moderado contraste, profundidade e campo de visão

limitada, utilizando comprimentos de onda visíveis e próximos do infravermelho e lentes objetivas com aumento, resolução e distância fixas. O equipamento que fazia a interface entre o microscópio e a pele podia ser utilizado apenas nos braços e o local a ser estudado não conseguia ser perfeitamente estabilizado para uma captura apropriada de imagens⁴².

Posteriormente, uma série de parâmetros foram testados para melhorar a resolução e contraste, adquirir imagens em níveis mais profundos e em campos de visão maiores, o que é obtido com comprimentos de ondas maiores e próximos do infravermelho, lentes objetivas com aumento e abertura numérica variáveis, distâncias maiores e tamanhos variáveis de abertura. Um anel de contato com a pele associado a fita adesiva dupla face que possa se manter estável em diferentes locais do corpo e um *handpiece* que faça movimentos de extensão e rotação também são desenvolvidos, permitindo o acesso do microscópio aos diferentes sítios corpóreos. Dessa forma, baseado em resultados experimentais, em 1999 é criado um microscópio confocal *in vivo* portátil, que pode ser facilmente transportado e utilizado para screening e diagnóstico de lesões, tal como o disponível atualmente⁴³.

O princípio da microscopia confocal de reflectância envolve o uso de uma fonte pontual de luz que ilumina um pequeno pedaço de tecido. A luz refletida é então fotografada em um detector após passar através de um pequeno orifício, que previne que a luz fora de foco atinja o detector. Isto significa que nesta técnica apenas a região que está em foco será fotografada, daí o termo confocal (Figura 1)⁴⁴.

Figura 1. Princípio da microscopia confocal (Nehal et al., 2008)

Para criar uma imagem de todo o plano da amostra a ser estudada, a fonte de luz pontual é digitalizada, o que permite o seccionamento virtual de planos horizontais de tecido *in vivo*. A resolução da MCR depende do tamanho do orifício, da abertura numérica da lente objetiva e do comprimento de onda utilizado. Comprimentos de onda maiores penetram mais profundamente na pele, entretanto, apresentam menor resolução lateral. Comprimentos de onda próximos do infravermelho produzem um forte retroespelhamento dos melanossomos, apesar da absorção de melanina, porque eles possuem um alto índice de refração relativo à epiderme adjacente e tem um tamanho semelhante ao do comprimento de onda. Isto significa que se a célula contém melanina, como os queratinócitos basais e os melanócitos, sua imagem é brilhante. Quanto mais escura for a pele ou se a lesão for pigmentada, mais contraste será obtido⁴².

No momento existem quatro versões do aparelho de microscopia confocal *in vivo*: o Vivascope 1500, Vivascope 1500 multilaser, Vivascope 2500 e Vivascope 3000, sendo esta a versão utilizada em lesões de difícil acesso como cavidade oral e região periocular devido a sua ponteira mais fina. A versão comercialmente disponível utilizada, o Vivascope 3000, consiste em um microscópio confocal de comprimento de onda de 830 nm e lentes objetivas de 0,9 NA e aumento de 30x, que capta imagens a uma resolução lateral de 0,5 μm e resolução axial de 3 a 5 μm . Com este sistema, é possível captar imagens de pele normal a uma profundidade de 200 a 250 μm , com intervalos de 4 a 5 μm , o que é suficiente para gerar imagens da epiderme e de parte da derme, que incluem derme papilar e derme reticular superficial. Imagens de partes mais profundas da derme podem ser obtidas se utilizarmos uma energia maior do laser, entretanto, neste sistema, a energia é inferior à 30 mW e por isso não causa dano ocular e nem à pele⁴².

Mudando as lentes objetivas no plano vertical à pele é possível capturar imagens em níveis horizontais, já que o foco altera-se progressivamente para as partes mais profundas do tecido. Pode-se então obter imagens horizontais e subsequentes da pele bem como gravar pequenos vídeos, nos quais é possível demonstrar eventos dinâmicos como o fluxo sanguíneo⁴⁵.

3.2.2 Correlação com histopatologia e glossário

Desde a criação do primeiro equipamento de MCR que possibilitou o estudo da pele *in vivo*, as imagens obtidas foram comparadas com as da histopatologia convencional correspondente, sendo encontrada boa correlação.

Como a MCR é completamente não invasiva, ela acaba se tornando um método livre de alguns artefatos que o processamento de qualquer tecido pode trazer, como a própria biópsia, fixação no formol, realização dos cortes histológicos e coloração. Por outro lado, as imagens da MCR podem apresentar artefatos provenientes de bolhas de ar ou impurezas no meio de imersão o que pode ser minimizado com a boa prática na obtenção das imagens.

Os queratinócitos da camada córnea apresentam-se sem núcleo, brilhantes e poligonais com contornos escuros e são menores do que os visualizados nos cortes histopatológicos devido ao artefato de estiramento vertical e horizontal. Contudo, nas camadas granulosa, espinhosa e basal a similaridade visual entre as imagens de MCR e de histologia é maior. Nestas camadas, os queratinócitos apresentam citoplasma brilhante e granuloso e núcleos escuros e ovais.

Conforme nos aprofundamos nas camadas da epiderme, visualizamos a diminuição do tamanho das células e núcleos e o aumento da densidade do citoplasma e da quantidade de melanina. Os contornos celulares também são mais brilhantes nas células espinhosas quando comparadas às células presentes na camada granulosa, o que corresponde provavelmente aos desmossomos. Em fototipos mais altos, as células, especialmente as basais, são ainda mais brilhantes, pois a melanina é o principal cromóforo na MCR e gera grande contraste.

Na derme superficial, as fibras colágenas apresentam-se pouco brilhantes e com baixa resolução e contraste quando analisadas *in vivo*, provavelmente devido à epiderme sobrejacente. Por outro lado, os vasos e o fluxo sanguíneos, são facilmente visualizados de maneira dinâmica.

Após cerca de 10 anos de uso da MCR na dermatologia, seis investigadores experientes, de três centros diferentes, revisaram a terminologia utilizada até então e desenvolveram um glossário com termos que descrevem os achados de MCR tanto na pele normal quanto em lesões melanocíticas⁴⁶. Este glossário encontra-se no Anexo C.

3.2.3 Microscopia confocal de reflectância do lábio normal

O exame de MCR do lábio normal e sua correlação com a histopatologia convencional foi descrito em 2013⁴⁷. O estrato córneo se apresenta à confocal como um mosaico homogêneo esparsos de células poligonais brilhantes anucleadas. A camada granulosa se localiza 5-20 µm abaixo do estrato córneo e apresenta células brilhantes com citoplasma granuloso e núcleo escuro. A camada espinhosa apresenta o padrão em favo de mel com células poligonais com núcleo escuro, citoplasma brilhante e se localiza 20-100 µm abaixo do estrato córneo. A camada suprapapilar é formada por células basais brilhantes, que podem conter melanina e agrupadas na região do topo da papila configurando o padrão em paralelepípedo. Na junção entre a lâmina própria e a semimucosa labial, os melanócitos e os queratinócitos basais, que são células um pouco menores, se apresentam de formato redondo, formando anéis de células brilhantes ao redor de uma área escura, que corresponde à papila/lâmina própria com vasos centrais. Este padrão é conhecido como riniforme. Na derme papilar há presença de fibras colágenas reticuladas ou em feixes e melanóforos ao redor de pequenos vasos. Os melanóforos

apresentam-se como células grandes, com bordas definidas e brilhantes na derme superior.

3.2.4 Microscopia confocal da queilite actínica e carcinoma espinocelular do lábio

O uso da técnica de MCR foi previamente descrita no diagnóstico de QA e CEC invasivo do lábio inferior em alguns relatos e séries de casos, assim como sua utilização no monitoramento de tratamento não invasivo de QA. A abordagem através da MCR para o diagnóstico de casos de QA e acompanhamento do tratamento é relatado a primeira vez em 2011 em um estudo de 6 casos. Os casos foram tratados com diclofenaco a 3% em gel de ácido hialurônico e avaliados antes e após o tratamento com a MCR⁴⁸. Os critérios mais importantes da MCR descritos pelos autores nesse primeiro estudo para o diagnóstico de QA são atipia celular no estrato espinhoso e granuloso com padrão atípico (desarranjo) do favo de mel.

Posteriormente é relatado o uso da MCR associada à dermatoscopia no diagnóstico e acompanhamento de três casos de QA tratados com gel de mebutato de ingenol⁴⁹. A descrição dos achados de MCR nesse último estudo foram idênticos aos critérios já descritos anteriormente⁴⁶.

Dois relatos recentes descrevem o uso da MCR na avaliação do CEC invasivo do lábio inferior. O primeiro publicado em 2017 descreve a utilização da MCR na avaliação de lesões não melanocíticas do lábio, incluindo 14 casos de QA e 9 casos de CEC⁵⁰. Como este estudo não relatou os achados clínicos das lesões labiais e publicou um quadro clínico de um caso de CEC

demonstrando uma úlcera vegetante, não ficou claro se os outros casos de CEC do lábio inferior eram ou não casos suspeitos clinicamente de invasão. E o segundo relato de CEC do lábio inferior publicado em 2018 descreve o uso da MCR em um caso de CEC do lábio inferior, caracterizado clinicamente pela presença de tumor, comparando os achados deste CEC com os achados em um caso de queilite actínica difusa sem lesão aparente suspeita de CEC do lábio inferior⁵¹.

No total de relatos da literatura inglesa, 10 casos de CEC invasivo do lábio inferior foram avaliados com o uso da MCR. Os critérios da MCR descritos nesses relatos para CEC invasivo, com lesões clinicamente detectáveis do lábio foram: ruptura completa da arquitetura epitelial, papilas mal delimitadas, invasão da lâmina própria por células nucleadas, grandes e arredondadas (pleomórficas e disqueratósicas) e ninhos de células na lâmina própria^{50,51}. O exame de MCR ainda não foi descrito para casos de CEC de lábio inferior que não foram identificados clinicamente.

Uma revisão sistemática foi realizada em 2016 para avaliar critérios de MCR do *continuum* da queratose actínica e carcinoma espinocelular da pele e semimucosa labial e suas variantes clínicas. A qualidade dos artigos foi avaliada através de critérios do *Strengthening the Reporting of Observational studies in Epidemiology* checklist e 25 trabalhos foram selecionados. A sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de queratose actínica e carcinoma espinocelular com o uso da MCR ficou entre 79-100% e 78-100% respectivamente. Os critérios encontrados em cada uma das fases do *continuum* estão descritos no Anexo C (tabela original)⁵².

A Tabela 1 contém os critérios de MCR para o diagnóstico de QA e queratose actínica e CEC adaptados da tabela original (ANEXO C).

Tabela 1. Critérios de MCR já descritos para o diagnóstico de QA e queratose actínica e CEC e sua morfologia no exame de MCR

Critérios de MCR	MORFOLOGIA NO EXAME DE MCR
Escama/Crosta/Ruptura córnea	Estruturas brilhantes amorfas na camada córnea
Hiper/paraqueratose	Células poligonais brilhantes na camada córnea
Padrão de favo de mel atípico / Desarranjo arquitetural do estrato granuloso	Variabilidade do tamanho e morfologia celular, variabilidade da espessura e brilho das conexões intercelulares assim como perda do padrão de favo de mel na camada epitelial granulosa
Padrão de favo de mel atípico / Desarranjo arquitetural do estrato espinhoso	Variabilidade do tamanho e morfologia celular, variabilidade da espessura e brilho das conexões intercelulares assim como perda do padrão de favo de mel na camada epitelial espinhosa
Células grandes e arredondadas na semimucosa	Células grandes redondas nucleadas envoltas por halo brilhante espesso no epitélio
Papilas mal delimitadas	Perda do anel brilhante de células basais que envolve a papila da lâmina própria invaginada no epitélio
Ninhos de células na lâmina própria*	Agrupamento de células pleomórficas na lâmina própria
Células grandes e arredondadas na lâmina própria*	Células grandes redondas nucleadas envoltas por halo brilhante espesso na lâmina própria
Vasos redondos/dilatados	Espaços arredondados ou lineares tortuosos onde observam-se células em movimento no exame <i>in vivo</i>
Elastose	Estruturas lineares rendilhadas ou globulares brilhantes na lâmina própria
Inflamação	Pequenas células brilhantes entre os queratinócitos acompanhadas ou não de células dendríticas
Fibroplasia do colágeno	Feixes lineares espessados brilhantes na lâmina própria

*Critérios descritos exclusivamente em casos de CEC invasivo

4 MÉTODOS

4.1 Casuística

Foram analisados prospectivamente 71 casos suspeitos de queilite actínica do lábio inferior provenientes da Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) no período de fevereiro de 2015 a agosto de 2018.

Os critérios de exclusão foram ausência de alterações clínicas (lábio normal), CEC invasivo clinicamente distinguível como presença de pápulas infiltradas, nódulos, úlceras, verrucosidades ou vegetações labiais ou suspeita clínica de outro diagnóstico diferencial. Dentre os 71 casos avaliados, 10 foram excluídos: 5 casos foram excluídos imediatamente por avaliação clínica – 2 casos não apresentavam alterações no lábio inferior e 3 casos apresentavam sinais clínicos de CEC invasivo (2 úlceras e 1 nódulo) e 5 casos foram excluídos após confirmação diagnóstica de outro diagnóstico diferencial – 3 casos diagnosticados pela histopatologia com queilite liquenoide e 2 casos diagnosticados com líquen simples crônico/ queilite friccional pelo exame histopatológico.

Do total de 71 casos avaliados, 61 casos foram incluídos com manifestações clínicas de queilite actínica difusa no lábio inferior. Os casos incluídos eram lesões primárias clinicamente suspeitas de QA, sem diagnóstico prévio de CEC (Diagrama 1). O acometimento do lábio superior pela queilite actínica não foi incluído nesse estudo pois nem todos os casos apresentavam alterações clínicas de queilite nessa região.

Diagrama 1. Total de casos avaliados, casos incluídos e casos excluídos do estudo

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do HCFMUSP e todos os participantes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo A).

Adicionalmente aos 61 casos incluídos, dois voluntários que não apresentavam alterações clínicas nos lábios inferiores foram examinados e seus exames de MCR foram obtidos. Esses dois casos não foram biopsiados por não apresentarem alterações clínicas, foram estudados com a finalidade de se estabelecer os parâmetros confocais de um lábio normal visualizado com o vivascope 3000, uma vez que o lábio normal havia sido estudada anteriormente apenas com o vivascope 1500⁴⁷.

4.2 Métodos

4.2.1 Avaliação clínica

Todos os participantes do estudo foram avaliados clinicamente em consulta por uma ou mais dermatologistas e uma dentista. Uma ou mais fotografias digitais da apresentação clínica inicial foram realizadas do lábio

inferior de cada doente com câmera digital Canon EOS Rebel T3. Dados gerais como idade, sexo e raça foram obtidos dos prontuários e registrados em uma tabela.

4.2.2 Intervenção com MCR

As lesões de QA foram avaliadas na primeira consulta utilizando um microscópio confocal de reflectância portátil comercialmente disponível (Vivascope 3000, Lucid Inc., Rochester, NY, EUA).

Antes do exame MCR, os participantes foram instruídos a usar pomada labial de dexpanthenol comercialmente disponível por duas semanas consecutivas, a fim de minimizar a descamação.

Todos os lábios inferiores afetados com QA foram mapeados ao vivo em vários pontos com a MCR na junção da semimucosa com a lâmina própria. Nos locais que apresentavam o maior grau de atipia celular e desarranjo arquitetural pela MCR na junção entre semimucosa e lâmina própria foram obtidas pilhas de imagens (*stacks*) representativas estendendo-se do estrato córneo à lâmina própria. Essas imagens obtidas como *stacks* foram capturadas para cada caso em pelo menos três locais e armazenadas *en bloc* em microcomputador. Cada *stack* representa 16 imagens e, para cada caso, foram obtidos três *stacks* no mínimo, o que totaliza um mínimo de 48 imagens por paciente.

As características dos locais representativos para cada caso foram analisadas ainda na primeira avaliação com a MCR. Tendo como parâmetros

de avaliação doze (12) critérios de MCR já descritos anteriormente para QA / queratose actínica e CEC (Tabela 1) mais dois (2) critérios inéditos, o local da QA mais alterado de cada caso, foi então marcado com uma caneta cirúrgica (Figura 2)^{53,54}. Os dois critérios inéditos para o continuum QA/CEC acrescentado nesse estudo foram apinhamento de células e papilas preenchidas por células e foram notados desde o início do estudo em muitos casos e, por esse motivo, foram acrescentados para análise.

Os critérios de MCR utilizados no estudo presentes nas camadas mais superficiais foram: escama ou crosta ou ruptura córnea, hiperqueratose, paraqueratose, padrão de favo de mel atípico ou desarranjo arquitetural do estrato granuloso, padrão de favo de mel atípico ou desarranjo arquitetural do estrato espinhoso, apinhamento de células e células grandes e arredondadas no epitélio semimucoso (Tabela 2). Já os critérios de MCR avaliados na junção entre o epitélio semimucoso e a lâmina própria e os critérios da lâmina própria estão contidos na Tabela 3 e 4 e incluem papilas mal delimitadas, papilas preenchidas por células, inflamação, ninhos de células na lâmina própria, células grandes e arredondadas na lâmina própria, elastose, fibroplasia do colágeno e vasos redondos e dilatados.

Tabela 2. Critérios de MCR das camadas superficiais do epitélio semimucoso

Escama/Crosta/Ruptura córnea
Hiper/paraqueratose
Padrão de favo de mel atípico/ Desarranjo arquitetural dos estrato granuloso
Padrão de favo de mel atípico/ Desarranjo arquitetural dos estrato espinhoso
Apinhamento de células**
Células grandes e arredondadas no epitélio semimucoso

** critério de MCR inédito

Tabela 3. Critérios de MCR da junção entre lâmina própria-epitélio semimucoso

Papilas mal delimitadas
Papilas preenchidas por células**
Inflamação

** critério de MCR inédito

Tabela 4. Critérios de MCR da lâmina própria

Células grandes e arredondadas na lâmina própria (LP)*
Ninho de células na LP*
Fibroplasia do colágeno
Elastose
Vasos redondos/dilatados na papila

* critérios diagnósticos sugestivos de CEC

Figura 2. (a) Aparelho de microscopia confocal de reflectância VIVASCOPE 3000 utilizado na avaliação dos casos de queilite actínica. (b) Realização do exame de MCR em um caso de queilite. (c) Marcação do local de realização da biópsia

4.2.3 Análise histopatológica

Foram realizadas biopsias para exame de histopatológico em todos os 61 casos. O local do lábio inferior marcado com uma caneta cirúrgica foi imediatamente submetido a uma biopsia por *punch* de 4 mm para avaliação histopatológica ainda na primeira consulta, garantindo uma fiel correlação entre o local avaliado pela MCR e o exame de histopatologia.

Os espécimes obtidos foram fixados em formol tamponado a 10% e embebidos em parafina. No tecido emblocado, secções consecutivas foram realizadas no sentido perpendicular à epiderme, semelhantes ao da rotina diagnóstica, e posteriormente, corados com hematoxilina e eosina (HE) para análise histopatológica.

Os exames histopatológicos foram vistos por uma patologista oral experiente e a análise de cada seção considerou anormalidades citológicas e arquiteturais para estabelecer um diagnóstico final da condição labial. O espectro de alterações foi classificado em dois grupos:

- A - displasia parcial do epitélio: presença de qualquer grau de displasia epitelial acometendo no máximo dois terços da espessura total do epitélio;
- B - carcinoma espinocelular - CEC: que incluiu 3 situações:
 - CIS - todas as camadas do epitélio afetado por displasia;
 - carcinoma superficialmente invasivo - presença de cones epiteliais aumentados e alongados, com marcadas alterações citológicas e arquiteturais que se estendem à lâmina própria superficialmente e;
 - CEC invasivo - presença evidente da neoplasia na lâmina própria.

4.2.4 Correlação entre MCR e histopatologia

Aproximadamente 12.000 imagens de MCR foram obtidas e armazenadas em um HD externo. Após a obtenção do diagnóstico histopatológico definitivo as imagens de MCR foram revisadas. Os exames de MCR e histopatologia foram subsequentemente comparados e a correlação entre as características da MCR encontradas em cada grupo histopatológico – displasia/QA e CEC - foi feita.

4.2.5 Análise estatística

A análise descritiva de todos os 15 critérios de MCR para QA e CEC foi obtida em todos os casos. Os resultados das variáveis do exame de MCR nos dois grupos de estudo (displasia parcial do epitélio e CEC) foram comparados. Os dados recebidos foram tabulados no *GraphPad Prism 7.03* (Graphpad Software, San Diego, CA, EUA) e foram considerados como variáveis dicotômicas categóricas (sim/não), portanto nenhuma variável segue o padrão de distribuição normal. Foram realizados relatórios de frequências e os grupos tiveram as frequências que foram comparadas entre os grupos através do teste de Fisher e foram considerados significantes os resultados obtidos com valores de significância menor ou igual a 5% ($p \leq 0,05$). Os valores de sensibilidade, especificidade e *odds ratio* (OR) foram calculados para cada uma das variáveis.

Depois do teste de Fisher, a amostra de dados foi submetida a uma análise discriminatória e aplicamos o teste de Regressão Logística Binária para identificar quais as variáveis do estudo eram independentemente correlacionadas com CEC. Através dos coeficientes de Regressão Logística (ponto de

interceptação da reta no eixo “y”) e lambda de Wilk (F) e de posse do valor da significância do teste (p) podemos indicar as variáveis que são relacionadas independentemente ao CEC⁵⁵.

4.2.6 Achados éticos

Esse estudo foi desenvolvido de acordo com os princípios emanados da Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde. O protocolo foi enviado para a análise do Comitê de ética para análise de projetos de pesquisa (CAPPesq) do HCFMUSP e foi aprovado. O parecer consubstanciado do CEP número 2823298 encontra-se no Anexo B. Os doentes assinaram um termo de consentimento (Anexo A) após terem sido informados dos procedimentos deste estudo.

5 RESULTADOS

5.1 Dados gerais

Os 61 casos seleccionados para este estudo incluíram 43 (70%) homens e 18 (30%) mulheres. Quase a totalidade dos casos ocorreram em pacientes que se autointitulavam como raça branca (60 brancos 98%; 1 mulato 2%). As idades dos casos variaram de 29 a 87 anos, com idade média de 65 anos (Tabela 5).

A análise histopatológica das biopsias realizadas mostrou displasia epitelial parcial do epitélio semimucoso (QA) em 25 casos (41%) e CEC (CIS, CEC superficialmente invasivo ou CEC invasivo) em 36 (59%). Para análise estatística das características clínicas e dos critérios de MCR, após o diagnóstico histopatológico definitivo, os casos foram separados em dois grupos - displasia parcial do epitélio e CEC (Diagrama 2).

Diagrama 2. Divisão dos casos em 2 grupos após o resultado histopatológico definitivo

Tabela 5. Dados epidemiológicos de cada caso e diagnóstico histopatológico

Caso	Sexo	Idade	Raça	Diagnóstico
1.	Masc.	74	branco	displasia
2.	Masc.	39	branco	cec
3.	Masc.	42	branco	cec
4.	Masc.	45	branco	displasia
5.	Fem.	65	branco	displasia
6.	Masc.	69	branco	displasia
7.	Fem.	70	branco	cec
8.	Masc.	68	branco	cec
9.	Masc.	63	branco	cec
10.	Fem.	87	branco	cec
11.	Fem.	56	branco	displasia
12.	Fem.	67	branco	displasia
13.	Masc.	58	branco	cec
14.	Fem.	69	branco	displasia
15.	Masc.	65	branco	displasia
16.	Masc.	64	branco	cec
17.	Masc.	70	branco	displasia
18.	Masc.	44	branco	cec
19.	Masc.	92	branco	displasia
20.	Fem.	79	branco	cec
21.	Masc.	77	branco	cec
22.	Fem.	52	branco	displasia
23.	Fem.	60	branco	displasia
24.	Masc.	63	branco	cec
25.	Masc.	63	branco	cec
26.	Masc.	68	branco	cec
27.	Masc.	73	branco	displasia
28.	Masc.	62	branco	cec
29.	Masc.	82	branco	cec
30.	Masc.	65	branco	displasia
31.	Masc.	73	branco	cec
32.	Masc.	75	branco	cec
33.	Masc.	65	branco	displasia
34.	Masc.	84	branco	displasia
35.	Masc.	84	branco	cec
36.	Masc.	61	branco	cec
37.	Masc.	36	branco	cec
38.	Fem.	76	branco	displasia
39.	Fem.	53	branco	cec
40.	Fem.	43	branco	displasia
41.	Fem.	60	mulato	displasia
42.	Fem.	56	branco	displasia
43.	Masc.	71	branco	cec
44.	Masc.	71	branco	cec
45.	Fem.	61	branco	cec
46.	Masc.	49	branco	cec
47.	Masc.	61	branco	cec
48.	Masc.	79	branco	cec
49.	Masc.	64	branco	cec
50.	Masc.	66	branco	displasia
51.	Masc.	66	branco	cec
52.	Masc.	43	branco	displasia
53.	Masc.	42	branco	cec
54.	Fem.	79	branco	cec
55.	Masc.	58	branco	displasia
56.	Masc.	52	branco	cec
57.	Fem.	65	branco	cec
58.	Masc.	71	branco	displasia
59.	Masc.	58	branco	displasia
60.	Fem.	29	branco	cec
61.	Masc.	87	branco	cec

5.2 Achados clínicos

As características clínicas observadas foram borramento do limite do vermelhão do lábio inferior e a pele, eritema, descamação, atrofia, placas brancas queratósicas, áreas amareladas (elastose), crostas e erosões (Figura 3).

As características clínicas mais frequentes em ambos os grupos foram: borramento do limite entre o vermelhão do lábio e a pele (96,0% no grupo com displasia parcial do epitélio e 97,2% no grupo com CEC) e eritema (76,0% na displasia parcial do epitélio e 94,0% no CEC). Atrofia acometeu 64,0% do grupo displasia parcial do epitélio e 86,0% do grupo CEC. Área amarelada (sugestiva de elastose) ocorreu em 68,0% dos casos diagnosticados como displasia parcial do epitélio e em 72,2% como CEC. Placa branca/ queratósica estava presente em 36,0% dos casos de displasia parcial do epitélio e 69,4% dos casos de CEC como CEC. Descamação afetou 32,0% dos casos de displasia parcial do epitélio e 30,0% dos casos de CEC; erosão /crosta em 16,0% na displasia parcial do epitélio e 33,3% no CEC (Tabela 6).

Tabela 6. Frequência das características clínicas no grupo de casos com diagnóstico histopatológico de displasia parcial epitélio e no grupo com diagnóstico histopatológico de CEC

Características clínicas	Displasia	CEC
	N=25	N=36
	n (%)	n (%)
Borramento do limite do vermelhão	24 (96,0)	35 (97,2)
Eritema	19 (76,0)	34 (94,4)
Atrofia	16 (64,0)	31 (86,1)
Área amarela	17 (68,0)	26 (72,2)
Placa branca queratósica	9 (36,0)	25 (69,4)
Descamação	8 (32,0)	11 (30,6)
Erosão/crosta	4 (16,0)	12 (33,3)

Figura 3. Características clínicas de queilite actínica difusa. a) No lábio inferior notam-se borramento do limite entre o vermelhão e a pele, atrofia, áreas amareladas e erosão. O exame anatomopatológico guiado pela MCR nesse caso revelou CEC superficialmente invasivo. b) No lábio inferior notam-se borramento do limite entre o vermelhão e a pele, áreas eritematosas, descamação, atrofia, áreas amareladas e diminutas erosões. O exame anatomopatológico guiado pela MCR revelou displasia epitelial moderada. c) No lábio inferior notam-se borramento do limite entre o vermelhão e a pele, áreas eritematosas, descamação e atrofia. O exame anatomopatológico guiado pela MCR revelou CEC invasivo. d) No lábio inferior notam-se borramento do limite entre o vermelhão e a pele, descamação e placa branca queratósica. O exame anatomopatológico guiado pela MCR revelou CEC *in situ*

5.3 Achados da MCR

5.3.1 Achados da MCR no lábio normal

Os achados da MCR nos lábios dos voluntários sem alterações clínicas, obtidos com o aparelho vivascope 3000 foram semelhantes aos relatados nos artigos avaliados com vivascope 1500. No estrato espinhoso visualizou-se o

padrão de favo de mel típico. Na região suprapapilar, visualizou-se o padrão em paralelepípedo e no nível da junção da lâmina própria – semimucosa, as papilas foram visualizadas bem delimitadas com vasos no seu interior e distribuição regular, típica do padrão riniforme (Figura 4).

Figura 4 . Achados da MCR obtidos a partir do vivascope 3000 no lábio normal: a) padrão de favo de mel típico no estrato espinhoso; b) padrão em paralelepípedo suprapapilar; c) papilas visualizadas parcialmente; d) nível da junção lâmina própria–semimucosa, papilas bem delimitadas com vasos no seu interior regularmente distribuídas; padrão riniforme - aumento de 500 μm x 500 μm

5.3.2 Achados da MCR da superfície - camada semimucosa

As características da MCR analisadas nas camadas superficiais/semimucosa foram: ruptura do estrato córneo (ou erosão/crosta), hiperqueratose e paraqueratose, padrão atípico do favo de mel ou desarranjo no estrato granuloso, padrão atípico do favo de mel ou desarranjo no estrato espinhoso, apinhamento basal de queratinócitos e células grandes e arredondadas (disqueratóticas/pérolas córneas) no epitélio. A Figura 5 traz exemplos representativos dos achados da MCR da semimucosa.

Os achados mais frequentes em ambos os grupos foram desarranjo epitelial do estrato espinhoso (96,0% no grupo displasia parcial do epitélio e 97,2% no grupo CEC) seguido de apinhamento de queratinócitos (76,0% no grupo displasia parcial do epitélio e 88,9% no grupo CEC). Hiperqueratose/paraqueratose e desarranjo epitelial no estrato granuloso ocorreram com maior frequência no grupo com diagnóstico histopatológico de CEC (frequência de 44,0% no grupo displasia parcial do epitélio x 72,2% no grupo CEC para hiperqueratose/paraqueratose e de 40,0% no grupo displasia parcial do epitélio x 72,2% no grupo CEC para desarranjo epitelial no estrato granuloso). Ruptura do estrato córneo e células epiteliais grandes e arredondadas na semimucosa foram os achados da MCR da superfície que apresentaram menor frequência em ambos os grupos (20,0% em displasia parcial do epitélio e 13,9% em CEC para ruptura do estrato córneo e 32% x 44% para células grandes e arredondadas na semimucosa. A frequência dos achados da MCR de superfície – semimucosa estão resumidos na Tabela 7.

Figura 5. Achados da MCR na superfície semimucosa a) crosta b) hiperqueratose c) padrão de favo de mel atípico na camada espinhosa e apinhamento de queratinócitos (circunferência vermelha) d) padrão de favo de mel atípico no estrato granuloso e célula grande e arredondada (circunferência verde) – aumento de 500 μm x 500 μm

Tabela 7. Frequência dos achados de MCR na camada semimucosa no grupo com diagnóstico histopatológico de displasia parcial do epitélio e no grupo com CEC

	Displasia	CEC
Achados MCR da superfície – camada semimucosa	N=25	N=36
	n (%)	n (%)
Ruptura do estrato córneo	5 (20,0)	5 (13,9)
Hiperqueratose /Paraqueratose	11 (44,0)	26 (72,2)
Desarranjo arquitetural estrato espinhoso	24 (96,0)	35 (97,2)
Desarranjo arquitetural estrato granuloso	10 (40,0)	26 (72,2)
Células grandes e arredondadas semimucosa	8 (32,0)	16 (44,4)
Apinhamento de queratinócitos	19 (76,0)	32 (88,9)

5.3.3 Achados da MCR na junção entre semimucosa e lâmina própria

Em relação ao nível da junção entre semimucosa e lâmina própria, as características da MCR observadas foram papila mal delimitada e papila preenchida por células e inflamação, características que foram muito mais frequentemente encontradas no grupo de CEC (Tabela 8).

Tabela 8. Frequência dos achados da MCR na junção entre semimucosa e lâmina própria no grupo de casos com diagnóstico histopatológico de displasia parcial do epitélio e no grupo com de CEC

	Displasia	CEC
Achados MCR na junção entre semimucosa e lâmina própria	N=25	N=36
	n (%)	n (%)
Papilas mal delimitadas	4 (16,0)	32 (88,9)
Papilas preenchidas por células	2 (8,0)	31 (86,1)
Inflamação	14 (56,0)	31 (86,1)

Figura 6. Achados da MCR entre a semimucosa e a lâmina própria. a) papilas mal delimitadas (estrelas); b) papilas preenchidas por células (circunferência); c) papilas preenchidas por células grandes e nucleadas (seta); d) inflamação na junção lâmina própria-semimucosa (setas)— aumento de 500 μm x 500 μm

5.3.4 Achados da MCR no nível da lâmina própria

As características de MCR avaliadas na lâmina própria foram presença de células grandes e arredondadas (disqueratósicas/pérula córnea) na lâmina própria e ninhos de células na lâmina própria foram características encontradas exclusivamente nos casos de CEC (63,9% para células grandes e arredondadas e 41,7% para ninhos de células na lâmina própria). O grupo CEC também apresentou maior frequência de fibroplasia de colágeno (91,7% no grupo CEC e 60% no grupo displasia). A presença de vasos redondos e dilatados e elastose foram semelhantes entre os dois grupos (Tabela 9) .

Tabela 9. Frequência dos achados da MCR na lâmina própria no grupo com diagnóstico histopatológico de displasia parcial do epitélio e no grupo com CEC

	Displasia	CEC
Achados da MCR no nível da lâmina própria	N=25	N=36
	n (%)	n (%)
Células grandes e arredondadas na lâmina própria	0 (0,0)	23 (63,9)
Ninho de células na lâmina própria	0 (0,0)	15 (41,7)
Fibroplasia do colágeno	15 (60,0)	33 (91,7)
Elastose	17 (68,0)	19 (52,8)
Vasos redondos / dilatados	5 (20,0)	12 (33,3)

Figura 7. Achados da MCR na lâmina própria: a) bloco de células grandes nucleadas na lâmina própria (circunferência); b) fibroplasia do colágeno; c) grumos de elastose (seta) d) vasos dilatados lineares (seta). — aumento de 500 μm x 500 μm

5.4 Análise histopatológica

Os casos diagnosticados como displasia parcial do epitélio foram 25 no total de casos estudados. Os casos diagnosticados como displasia parcial do epitélio foram classificados como displasia epitelial leve em 15 casos (60% dos casos do grupo displasia parcial epitelial), moderada em 5 casos (20% de displasia parcial epitelial) e intensa em 5 casos (20% de displasia parcial epitelial).

Dentre os 36 casos diagnosticados como CEC, 5 foram classificados como *in situ* (14% dos casos de CEC), 24 CEC superficialmente invasivo (67% dos casos de CEC e 7 como invasivo bem diferenciado (19% dos casos de CEC).

Do total de 61 casos estudados, os diagnósticos histopatológicos definitivos foram em ordem decrescente: 24 casos de CEC superficialmente invasivo (39% da casuística total estudada), 15 casos de displasia epitelial leve (25% da casuística total estudada), 7 casos de CEC invasivo (11% da casuística total estudada), 5 casos de CEC *in situ* (8% da casuística total estudada), 5 casos de displasia epitelial moderada (8% da casuística total estudada) e 5 casos de displasia epitelial intensa (8% da casuística total estudada) - Tabela 10.

Tabela 10. Frequência dos diagnósticos histopatológicos definitivos em números absolutos e porcentagem no grupo total avaliado durante o estudo

Diagnóstico histopatológico	Números absolutos	Porcentagem (%)
Displasia epitelial leve	15	25%
Displasia epitelial moderada	5	8%
Displasia epitelial intensa	5	8%
CEC <i>in situ</i>	5	8%
CEC superficialmente invasivo	24	39%
CEC invasivo	7	11%

Durante o estudo 30 pacientes dos 36 diagnosticados histopatologicamente como CEC foram submetidos a excisão cirúrgica do tipo vermelhectomia. A análise histopatológica dos produtos das vermelhectomias revelou múltiplos focos de CEC em 27/30 casos (90%) e foco único excisado na biópsia em 3/30 casos (10%). Dos 36 casos diagnosticados como CEC, 6 pacientes ainda não haviam sido submetidos a excisão cirúrgica do tipo vermelhectomia por motivos diversos como má condição clínica e abandono de tratamento.

A presença de acantólise, separação entre os queratinócitos da espinhosa, foi observada em 3 casos de displasia epitelial e em 2 casos de CEC.

Figura 8. Achados histopatológicos. Diagnóstico de displasia epitelial: a e b) Alterações celulares (hipercromasia nuclear, aumento do número de mitoses e mitoses atípicas) e histomorfológicas (perda de polaridade, apinhamento de células) limitadas a camada basal e espinhosa. Diagnóstico de CEC – c) CEC superficialmente invasivo com presença de células queratinizadas na lâmina própria (pérola córnea); d- carcinoma espinocelular invasivo – bloco de células atípicas invadindo a lâmina própria; nota-se presença de pérola córnea. Ampliação microscopia ótica: a, b e c) aumento de 400x. d) aumento de 100x

5.5 Correlação de MCR e histopatologia

A correlação entre os exames de MCR e histopatologia de todos os casos incluídos mostrou concordância em 57/61 casos (94%).

Do total de 61 casos, quatro casos tiveram resultados de MCR discordantes daqueles encontrados na histopatologia. Nesses quatro casos foram observados os critérios de MCR papilas mal delimitadas, papilas preenchidas por células e ninhos de células na lâmina própria, que sugeriram o diagnóstico de CEC, mas a histopatologia mostrou o diagnóstico inicial de displasia epitelial (de graus variáveis).

Inicialmente, os exames de MCR foram revistos por dois avaliadores independentes. Em dois dos quatro casos onde não houve concordância e no exame de MCR inicial foram visualizadas papilas preenchidas por células, após revisão do dos mesmos, concluiu-se que, nesses casos, as papilas preenchidas por células tratavam-se de papilas preenchidas por fibroplasia colágeno cujas fibras espessas e trabeculadas se assemelhavam a células e que os espaços escuros entre a “parede clara”, supostas células, não apresentavam núcleos. Ou seja, nestes dois casos as papilas não estavam preenchidas por células e, sim, por fibroplasia do colágeno, caracterizando exames de MCR sugestivos de queilite actínica com displasia epitelial, sem evolução para CEC.

Em um terceiro caso, os critérios de MCR encontrados foram: papilas mal delimitadas, papilas preenchidas por células e ninhos de células na lâmina própria. Em um quarto caso, foram descritos inicialmente os achados de papilas preenchidas por células e ninhos de células na lâmina própria.

A revisão do exame de MCR por dois avaliadores independentes não modificou os critérios de MCR encontrados nestes dois últimos casos. Sendo assim, foi solicitada a obtenção de cortes aprofundados em novos níveis do exame de histopatologia e revisão dos mesmos. Após revisão dos novos níveis de histopatologia, o exame histopatológico revelou achados compatíveis com CEC superficialmente invasivo em ambos os casos.

Além da análise dos casos discordantes, foi possível observar correlação de outros achados de MCR e histopatologia com destaque para acantólise (Figura 9) nas queilites actínicas ou CECs acantolíticos e para presença de pérolas córneas, representando células grandes redondas queratinizadas (Figura 10).

Figura 9. Caso de CEC acantolítico. Perda do limite entre o vermelhão labial e a pele, eritema e descamação. MCR e HE mostram fenda intraepitelial e acantólise intraepitelial. Microscopia confocal aumento de 500 μm x 500 μm e microscopia ótica 400x

Figura 10. Caso de CEC superficialmente invasivo com pérolas córneas. Perda do limite entre o vermelhão labial e a pele, eritema, atrofia e queratose. MCR no nível da junção: papilas preenchidas por células grandes redondas queratinizadas (pérolas córneas). No HE, notam-se também as pérolas córneas invadindo a lâmina própria. Microscopia confocal aumento de 500 μm x 500 μm e microscopia ótica 400x

5.6 Análise estatística

5.6.1 Resultados da análise comparativa com o teste de Fisher, *odds ratio* (razão de chances) e valores de significância (p) das características clínicas

Dentre as características clínicas avaliadas apenas placa branca queratósica apresentou diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos sendo mais frequente no grupo diagnosticado como CEC, com *odds ratio* (OR) de 4,04 e valor de *p* de 0,0176. A Tabela 11 traz a frequência da distribuição das características clínicas em cada grupo, os valores de OR com intervalo de confiança de 95% e significância para cada uma das variáveis avaliadas.

Tabela 11. Frequência dos achados clínicos nos dois grupos avaliados (QA e CEC)

Variável	Displasia	CEC	OR (95% IC)	Significância (p)
	N=25	N=36		
	n (%)	n (%)		
Borramento do limite	24 (96,0)	35 (97,2)	1,458	>0,9999
Eritema	19 (76,0)	34 (94,4)	5,368	0,0544
Descamação	8 (32,0)	11 (30,6)	0,935	>0,9999
Atrofia	16 (64,0)	31 (86,1)	3,488	0,0637
Placa branca queratósica	9 (36,0)	25 (69,4)	4,04	0,0176*
Área amarela	17 (68,0)	26 (72,2)	1,224	0,7799
Erosão/crosta	4 (16,0)	12 (33,3)	2,625	0,152

5.6.2 Resultados da análise comparativa com o teste de Fisher, *odds ratio* (razão de chances) e valores de significância (*p*) dos achados da MCR

Dentre os critérios da MCR avaliados na superfície do epitélio hiperqueratose/paraqueratose e desarranjo arquitetural no estrato granuloso apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos, ocorrendo com maior frequência no grupo CEC, com $OR = 3,3$ e $p = 0,0349$ e, $OR = 3,9$ $p = 0,0174$ para hiperqueratose/paraqueratose e desarranjo arquitetural do estrato granuloso respectivamente.

Dentre os critérios avaliados na junção da lâmina própria e semimucosa, papilas mal delimitadas e papilas preenchidas por células apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos, ocorrendo com maior frequência no grupo CEC, com valores de $OR = 42$ e $OR = 71,3$, respectivamente, e, $p < 0,0001$ para ambos critérios. Inflamação também apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos com valor de $OR = 4,8$ e $p = 0,0163$.

E por fim, dentre os critérios avaliados na lâmina própria, a presença de células grandes e arredondadas (disqueratósicas/pérolas córneas) e ninhos na lâmina própria apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos, ocorrendo com maior frequência no grupo CEC com *odds ratio* tendendo ao infinito pra ambos os critérios e $p < 0,0001$. Fibroplasia do colágeno foi outro critério que apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos, ocorrendo com maior frequência no grupo CEC com *odds ratio* de 7,3 e p de 0,0044.

A Tabela 12 traz a frequência da distribuição das alterações de MCR em cada grupo, os valores de *odds ratio* com intervalo de confiança de 95% e significância para cada uma das variáveis avaliadas.

Tabela 12. Frequência dos achados de MCR nos dois grupos avaliados (QA e CEC)

Variável	Displasia	CEC	OR (95% IC)	Significância (p)
	N=25	N=36		
	n (%)	n (%)		
Ruptura do estrato córneo	5 (20,0)	5 (13,9)	0,6	0,7268
Hiperqueratose /Paraqueratose	11 (44,0)	26 (72,2)	3,3	0,0349*
Desarranjo arquitetural no estrato espinhoso	24 (96,0)	35 (97,2)	1,4	>0,9999
Desarranjo arquitetural no estrato granuloso	10 (40,0)	26 (72,2)	3,9	0,0174*
Apinhamento de queratinócitos	19 (76,0)	32 (88,9)	2,5	0,2917
Células epidérmicas redondas nucleadas	8 (32,0)	16 (44,4)	1,7	0,4266
Papilas mal delimitadas	4 (16,0)	32 (88,9)	42,0	<0,0001*
Papilas preenchidas por células	2 (8,0)	31 (86,1)	71,3	<0,0001*
Inflamação	14 (56,0)	31 (86,1)	4,8	0,0163*
Ninhos na lâmina própria	0 (0,0)	15 (41,7)	infinito	0,0001*
Células redondas nucleadas na lâmina própria	0 (0,0)	23 (63,9)	infinito	<0,0001*
Vasos redondos / dilatados	5 (20,0)	12 (33,3)	2,0	0,3845
Elastose	17 (68,0)	19 (52,8)	0,5	0,2944
Fibroplasia do colágeno	15 (60,0)	33 (91,7)	7,3	0,0044*

* estatisticamente significante

5.6.3 Resultados de sensibilidade e especificidade para as variáveis avaliadas no estudo: características clínicas e achados da MCR

A sensibilidade e especificidade para diagnosticar CEC de acordo com características clínicas e com os achados de MCR foram calculadas e são apresentadas nas Tabelas 13 e 14.

Dentre as características clínicas, apenas placa branca queratósica apresentou diferença de apresentação entre os grupos sendo mais frequente no grupo CEC, com sensibilidade de 59% e especificidade de 73%.

Dentre os critérios da MCR avaliados na superfície do epitélio hiperqueratose/paraqueratose e desarranjo arquitetural no estrato granuloso apresentaram sensibilidade e especificidade de 58% e 70%, respectivamente para hiperqueratose/paraqueratose e 60% a 72% para desarranjo epitelial no estrato granuloso.

Dentre os critérios avaliados na junção da lâmina própria e semimucosa, papilas mal delimitadas, papilas preenchidas por células e inflamação apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos, ocorrendo com maior frequência no grupo CEC. A sensibilidade e especificidade para o critério papilas mal delimitadas foi de 84% e 88% respectivamente. Para papilas preenchidas por células, a sensibilidade foi de 82% e especificidade de 93%; já inflamação, apresentou sensibilidade e especificidade ambas de 68%.

E por fim, dentre os critérios avaliados na lâmina própria, a presença de células grandes e arredondadas, ninhos na lâmina própria e fibroplasia do colágneo apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos, ocorrendo com maior frequência no grupo CEC com sensibilidade de 65% e

especificidade de 100% para presença de células grandes e arredondadas na lâmina própria; sensibilidade de 54% e especificidade de 100% para presença de ninhos na lâmina própria; e, sensibilidade de 76% e especificidade de 68% para fibroplasia do colágeno.

Tabela 13. Sensibilidade e especificidade dos achados clínicos nos dois grupos avaliados (QA e CEC)

Variável	Sensibilidade (Wilson-Brown)	Especificidade (Wilson-Brown)	Sign. (p)
Perda do limite	0,50	0,59	>0,9999
Eritema	0,75	0,64	0,0544
Descamação	0,40	0,57	>0,9999
Atrofia	0,64	0,65	0,0637
Placa branca queratósica	0,59	0,73	0,0176*
Elastose	0,44	0,60	0,7799
Erosão	0,46	0,75	0,152

* estatisticamente significante

Tabela 14. Sensibilidade e especificidade dos achados de MCR nos dois grupos avaliados (QA e CEC)

Variável	Sensibilidade (Wilson-Brown)	Especificidade (Wilson-Brown)	Sign. (p)
Ruptura do estrato córneo	0,39	0,50	0,7268
Hiperqueratose /Paraqueratose	0,58	0,70	0,0349*
Desarranjo arquitetural estrato espinhoso	0,50	0,59	>0,9999
Desarranjo arquitetural estrato granuloso	0,60	0,72	0,0174*
Apinhamento de queratinócitos	0,60	0,62	0,2917
Papilas mal delimitadas	0,84	0,88	<0,0001*
Células grandes e arredondadas	0,45	0,66	0,4266
Papilas preenchidas por células	0,82	0,93	<0,0001*
Ninhos na lâmina própria	0,54	1,00	0,0001*
Células grandes e arredondadas na lâmina própria	0,65	1,00	<0,0001*
Vasos redondos / Dilatados	0,45	0,70	0,3845
Elastose	0,32	0,52	0,2944
Inflamação	0,68	0,68	0,0163*
Fibroplasia do colágeno	0,76	0,68	0,0044*

* estatisticamente significante

5.6.4 Resultado do teste de regressão logística binária e análise multivariada considerando as variáveis clínicas e de MCR que apresentaram significância (p) menor ou igual a 5% no teste de Fisher

Depois da aplicação do teste de Fisher foram realizadas a análise multivariada e o teste de regressão logística binária para identificar quais as variáveis do estudo que apresentam a relação de causalidade.

Através dos coeficientes de regressão logística (ponto de intercepção da reta no eixo “y”) e lambda de Wilk (F) e de posse do valor da significância do teste (p) podemos indicar as variáveis que possuem relação independente com o diagnóstico.

Após a aplicação da regressão logística binária, as variáveis que, independentemente se correlacionaram a CEC e apresentaram significância $(p) \leq 0,05$ foram: papilas mal delimitadas; papilas preenchidas por células; ninhos lâmina própria; células na lâmina própria grandes e arredondadas e inflamação.

Tabela 15. Resultado do teste de regressão logística binária** considerando as variáveis que apresentaram significância (p) menor ou igual a 5% no teste de Fisher

Variável	Coefficiente Regressão Logística Displasia	Coefficiente Regressão Logística CEC	Coefficiente (F)	Significância (p)
Placa branca queratósica	0,2836	0,2836	2,472	0,0935
Hiperqueratose /Paraqueratose	0,3	0,3	1,005	0,3726
Desarranjo estrato granuloso	0,3689	0,3689	1,296	0,2815
Papilas mal delimitadas	0,11	0,7769	6,894	0,0021*
Papilas preenchidas por células	0,01	0,6092	7,121	0,0017*
Ninhos na lâmina própria	0	0,6238	3,748	0,0296*
Células grandes e arredondadas lâmina própria	0	0,6781	6,042	0,0042*
Inflamação	0,97	0,2733	7,4	0,0014*
Fibroplasia do colágeno	0,5934	0,5934	2,899	0,0632

**Coeficiente de Regressão Logística corresponde ao valor do intercepto no eixo das ordenadas (y) pela reta de regressão; Coeficiente (F) corresponde ao lambda de Wilk; Significância (p) para o teste de Regressão Logística.

* estatisticamente significante

5.6.5 Critérios diagnósticos de CEC labial através da MCR obtidos a partir dos testes de regressão logística binária e análise multivariada

Aplicamos o teste de regressão logística binária para identificar quais as variáveis do estudo que apresentam a relação independente com o diagnóstico de CEC.

Através dos coeficientes de regressão logística (ponto de interceptação da reta no eixo “y”) e lambda de Wilk (F) e de posse do valor da significância do teste (p) podemos indicar as variáveis que possuem relação de “causa e efeito”. O valor limite mínimo para o coeficiente (F) é 3,84.

Atribuímos um score baseado no coeficiente (F): para valores de $F < 1$ as variáveis recebem o peso de 1 e para as variáveis com valores de $F > 1$, recebem o peso de 2.

As variáveis que apresentaram significância ($p \leq 0,05$), correlação independente com CEC e valores de $F > 1$ com peso de 2 foram: papilas mal delimitadas; papilas preenchidas por células; células redondas nucleadas na lâmina própria e ninhos na lâmina própria. Inflamação apresentou valor de $F < 1$ e score de 1. Quando a soma das variáveis encontradas na MCR em casos de QA for maior que 4, estamos diante de um caso de CEC segundo critérios da MCR.

Tabela 16. Score elaborado a partir dos testes de regressão logística binária e análise multivariada

Score para diagnóstico CEC lábio pela MCR*	Variáveis para diagnóstico de CEC
Papilas mal delimitadas	2
Papilas preenchidas por células	2
Células redondas nucleadas lâmina própria	2
Ninhos lâmina própria	2
Inflamação	1

*Score total >4 - CEC

6 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo principal o uso da MCR como uma ferramenta para mapear e guiar o local de biopsia em casos clínicos difusos de QA e identificar possíveis critérios de MCR que indicassem progressão para CEC. O objeto de estudo foram casos que não apresentavam sinais clínicos óbvios de CEC invasivo como úlcera, pápula infiltrada, nódulo, vegetação ou verrucosidade. Casos clínicos que apresentavam úlcera, pápula infiltrada, nódulo, vegetação ou verrucosidade foram excluídos da análise.

Os achados da MCR na QA e no CEC do lábio inferior e sua correlação com o exame de histopatologia já foram descritos anteriormente^{37,38,39,40}. Já o uso da MCR para guiar biopsia e realizar o diagnóstico precoce da progressão de QA para um caso de CEC superficialmente invasivo como realizado no presente estudo ainda não foi relatado.

Nas duas primeiras publicações que utilizaram a MCR para estudar a queilite actínica, um total de 9 casos de QA difusa foram avaliados e os critérios encontrados ao exame foram: ruptura córnea (do estrato córneo), hiperqueratose/paraqueratose, padrão de favo de mel atípico no estratos espinhoso e granuloso, elastose solar, vasos sanguíneos dilatados arredondados e inflamação^{46,47}.

Na casuística aqui apresentada de 61 casos, foram encontrados todos os achados anteriormente descritos^{46,47} e achados adicionais não descritos previamente. Os achados inéditos para QA foram células grandes e arredondadas no epitélio e na lâmina própria, apinhamento de queratinócitos, papilas preenchidas por células e fibroplasia do colágeno. Tais critérios não haviam sido descritos para QA difusa, mas já haviam sido descritos para CEC

e queratose actínica da pele, patologias análogas à queilite actínica mas de outras topografias que não os lábios. Já os critérios, papilas preenchidas por células e apinhamento de queratinócitos foram critérios nunca antes relatados na técnica de MCR.

Os critérios na MCR descritos anteriormente para CEC invasivo do lábio, com lesões clinicamente detectáveis, foram: desarranjo completo da arquitetura epitelial, papilas mal delimitadas, invasão lâmina própria de células nucleadas, grandes e arredondadas (disqueratósicas) e ninhos de células lâmina própria.

Nessa atual casuística, o uso da MCR para guiar biopsias em lesões difusas e mal delimitadas de QA foi capaz de identificar CEC clinicamente imperceptíveis em 59% dos casos avaliados. Essa prevalência foi maior que a encontrada em 20 casos clínicos de QA difusa que tiveram a biópsia guiada pela clínica e encontrou CEC com biópsia única em 30% dos casos avaliados¹¹. Outros relatos utilizaram critérios adicionais ao exame clínico na tentativa de guiar biópsias e correlacionar o grau de displasia epitelial com esses critérios em casos de QAs difusas. Os estudos realizados utilizaram como critérios características epidemiológicas e exames de imagem *in vivo* como videoroscopia e espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo, porém sem sucesso de obter parâmetros clínicos ou de imagem que indicassem os locais de progressão da QA para CEC^{35,36,37}.

No presente estudo, a única característica clínica que mostrou correlação positiva estatisticamente significativa com grupo de CEC foi a presença de placa branca queratósica. A presença de tal parâmetro apresentou baixa sensibilidade e especificidade, 59% e 73%, respectivamente. A análise dessa característica por regressão binária logística e análise multivariada mostrou que essa variável

não se correlaciona independentemente com CEC, confirmando assim a dificuldade em realizar a distinção de um caso de displasia parcial do epitélio de outro de CEC apenas pelo exame clínico dermatológico. Além disso, é importante citar que a biópsia foi guiada exclusivamente pelo critérios da MCR, dessa maneira o local exato da biópsia não necessariamente coincidiu com a área de placa branca queratósica.

O uso da MCR para diagnosticar CEC em casos de queilite actínica difusa clínica, assim como a identificação de critérios de MCR preditivos para a progressão de CEC ainda não havia sido descrito anteriormente.

A característica de MCR mais frequentemente encontrada nos dois grupos foi a presença de padrão favo de mel atípico (até completo desarranjo) no estrato espinhoso, característica presente em 96% dos casos de QA e 97,2% dos casos de CEC, dado semelhante ao publicado nos 9 casos de QA avaliados pela MCR descritos anteriormente. Nesses 9 casos descritos anteriormente não foi relatada a frequência dos achados em cada um dos casos.

O encontro de apinhamento basal dos queratinócitos também foi observado na maioria dos casos de QA (76%) e CEC (89%) e, embora essa característica ainda não tenha sido descrita na imagem da MCR, seu correspondente histopatológico é um critério bem estabelecido para QA / queratose actínica.

Quando comparamos os dois grupos dessa casuística em relação as características de MCR discriminatórias para CEC, encontramos que, na camada superficial (semimucosa), hiperqueratose e paraqueratose e padrão atípico (desarranjo) do favo de mel no estrato granuloso foram mais frequentes e estatisticamente significantes no grupo com CEC (hiperqueratose/paraqueratose:

77,2% no grupo CEC x 44% no grupo displasia parcial do epitélio com p de 0,0349* e 72,2% x 40% com p de 0,0174*), mas não se correlacionavam independentemente com CEC após análise de tais variáveis pela regressão logística binária.

As características mais notáveis da MCR para distinguir e identificar os casos de CEC foram encontradas no nível da junção lâmina própria-semimucosa e ao nível da lâmina própria. Em relação ao nível da junção lâmina-própria-semimucosa, papila mal delimitada e papila preenchida por células mostraram-se como critérios que se correlacionam independentemente a CEC. O critério papilas mal delimitadas apresentou sensibilidade de 84% e especificidade de 89% (com *odds ratio* de 42 e intervalo de confiança de 95%). Já papila preenchida por células apresentou sensibilidade de 82% e especificidade de 93% (com *odds ratio* de 71,3 e intervalo de confiança de 95%).

Os achados localizados na lâmina própria pela MCR que correlacionam-se independentemente com CEC foram inflamação, células nucleadas grandes e arredondadas (pleomórficas) na lâmina própria e ninhos de células na lâmina própria. Inflamação foi um critério que apresentou baixa sensibilidade e especificidade, 68% e 68%, respectivamente e *odds ratio* de 4,871 (intervalo de confiança de 95%).

Já os achados de MCR da lâmina própria, células grandes e arredondadas (disqueratósicas/pérolas córneas) na lâmina própria e ninhos de células na lâmina própria foram características da MCR exclusivamente encontradas no grupo de CEC, com especificidade de 100% (OR tendendo ao infinito e intervalo de confiança de 95%) e sensibilidade de 65% e 42%, respectivamente. Células nucleadas grandes e arredondadas (pleomórficas) na

lâmina própria e ninhos de células na lâmina própria são achados indicativos da progressão para CEC invasivo.

A sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de queilite actínica com os presentes achados de MCR correlacionados independentemente a CEC do lábio inferior ficou entre 54%-84% e 68%-100% respectivamente, valores semelhantes aos dados já relatados para a avaliação da queratose actínica e CEC através do uso da MCR. Previamente segundo a revisão de Nguyen et al.⁵⁰ a sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de queratose actínica e carcinoma espinocelular com o uso da MCR ficou entre 79-100% e 78-100%, respectivamente.

A avaliação da progressão de displasia parcial do epitélio para um CEC superficialmente invasivo incipiente é um desafio tanto do ponto de vista clínico quanto histopatológico. Uma alteração histopatológica que indica a progressão para um CEC invasivo é a presença de granuloma de queratina nas camadas superficiais da lâmina própria. Tal achado é uma evidência presumida da presença de CEC superficialmente invasivo em casos onde a invasão não está clara²¹. Na presente avaliação de casos de QA com o uso de MCR, a presença de granuloma de queratina na lâmina própria é visualizada como célula grande e arredondada (disqueratósica) na lâmina própria. Tal achado foi 100% específico para diferenciar CEC de displasia parcial do epitélio nessa presente amostra.

A partir das variáveis estudadas que apresentaram diferença estatística entre os grupos e que, após regressão logística binária e análise multivariada mostraram-se ser independentemente correlacionada a CEC, foi possível estabelecer um algoritmo para diferenciar casos de CEC e casos de displasia

epitelial através da MCR. Nesse algoritmo foram incluídas as variáveis papilas mal delimitadas, papilas preenchidas por células, ninhos na lâmina própria, células grandes e arredondadas na lâmina própria e inflamação. Ninhos na lâmina própria recebeu um peso no *score* de 1 e as demais variáveis um peso de 2. Um valor de soma dos pesos das variáveis do *score* maior ou igual a 4 é preditivo de um caso de CEC.

No futuro será interessante utilizar o *score* obtido através das variáveis da MCR em outros casos de queilite actínica difusa para validar o mesmo e calcular a sensibilidade, especificidade e *odds ratio* dessa ferramenta preditora de CEC.

7 CONCLUSÕES

1. O uso da MCR na avaliação de casos de queilite actínica difusa possibilitou o mapeamento de alterações citológicas e arquiteturais em diversos pontos representativos de toda extensão do lábio inferior.
2. A escolha do local de maior alteração epitelial através do uso da MCR demonstrou-se útil para guiar biopsias em casos de queilite actínica difusa com boa correlação entre os achados obtidos nos exames da MCR e os achados dos exames histopatológicos.
3. Os critérios de MCR que se relacionam positivamente com o diagnóstico de CEC são: papilas mal delimitadas, papilas preenchidas por células, ninhos celulares na lâmina própria e presença de células grandes a arredondadas (disqueratósicas) na lâmina própria.

8 ANEXOS

ANEXO A. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - HCFMUSP TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DA PESQUISA

1. Título do protocolo de pesquisa: Uso da microscopia confocal de reflectância na avaliação da queilite actínica

Pesquisador Principal: Prof. Dr. Marcello Menta S. Nico

Cargo/Função: Livre-docente

Unidade do HCFMUSP: Divisão de Dermatologia Do HCFMUSP

De acordo com a resolução 466/2012 os seguintes conteúdos devem fazer parte das explicações sobre a pesquisa

Convite à participação –

Convidamos o(a) Sr(a). para participar desse estudo, que visa utilizar um novo equipamento, o microscópio confocal, para diagnóstico diferencial da queilite e outras patologias.

Justificativa e objetivos do estudo

Trata-se de estudo experimental testando a hipótese de que o microscópio confocal possa auxiliar no diagnóstico queilite actínica, tornando a biopsia desnecessária em alguns casos. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença deste benefício.

Procedimentos que serão realizados e métodos que serão empregados

Inicialmente, será realizado o exame de microscopia confocal nas suas lesões labiais. Este procedimento consiste na avaliação de seu lábio inferior por uma aparelho a laser. Não há necessidade de anestesia local pois o exame é indolor.

Se necessário, será realizado também uma biopsia de suas lesões labiais, procedimento padrão para a diagnosticar a queilite ou outras patologias. A biopsia cirúrgica será realizada com um instrumento punch após realização de anestesia local (injeção no lábio um pouco dolorida).

Explicitação de possíveis desconfortos e riscos decorrentes da participação na pesquisa

O exame de microscopia confocal consiste na avaliação de seu lábio inferior por um aparelho a laser. Não há necessidade de anestesia local pois o exame é indolor.

A biopsia cirúrgica quando necessária será realizada sob anestesia local (injeção local). Depois da anestesia você não sentirá mais dor no local e um pequeno fragmento do lábio será retirado (menor que 0,5 cm) e a abertura levará ponto que cairá sozinho em 7 dias (sutura absorvível), que . Nas 2 (duas) horas seguintes após a biopsia se recomenda não comer alimentos quentes. Após esse período a alimentação pode ser normal. Não é necessário fazer curativo local.

Benefícios esperados para o participante

Os benefícios para o participante é ser submetido a um procedimento menos invasivo de que aquele feito habitualmente e, no caso da presença de algo suspeito, ser realizado o diagnóstico precoce e tratamento completo da lesão.

Esclarecimento sobre a forma de acompanhamento e assistência a que terão direito os participantes da pesquisa

O doente deverá comparecer em uma consulta inicial onde serão realizadas simultaneamente o exame de microscopia confocal e o exame de biopsia quando necessário. Depois deverá retornar em 60 dias para checar resultado de biopsia quando será também informado de quais cuidados ou procedimentos deverá realizar devido a sua lesão no lábio inferior.

Garantias de plena liberdade ao participante de recusar-se a participar ou retirar o seu consentimento em qualquer fase da pesquisa sem penalização alguma, de sigilo e privacidade

É garantida a liberdade da retirada de seu consentimento a qualquer momento e você poderá deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros doentes, não sendo divulgado a identificação de nenhum doente.

**Garantia de que o participante receberá uma via do termo de
consentimento**

**Explicitação das garantias de ressarcimento por despesas decorrentes da
pesquisa e explicitação da garantia de indenização por eventuais danos
decorrentes da pesquisa**

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Temos o compromisso de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de dúvidas. O principal investigador é o Prof. Dr. Marcello Menta S. Nico que pode ser encontrado no endereço Rua Dr. Enéas de Carvalho, 255, 3º andar, telefone Telefone (11) 2661-6050, e-mail: mentanico@hotmail.com. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel.: (11) 2661-7585/2661-1548/2661-1549; e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br.

Fui suficientemente informado a respeito do estudo “Uso da microscopia confocal de reflectância na avaliação da queilite actínica”. Eu discuti as informações acima com o Pesquisador Responsável Prof. Dr. Marcello Menta S. Nico ou pessoa (s) por ele delegada (s) Dra. Paula Silva Ferreira sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos e riscos e as garantias. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo uma via rubricada pelo pesquisador.

.....

Assinatura do participante /representante legal

Data //

.....

Assinatura do responsável pelo estudo

Data //

.....

Assinatura do doente ou responsável

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. Nome:.....

Documento de Identidade Nº : Sexo : .M ☐ F ☐

Data Nascimento:/...../.....

Endereço Nº Apto:.....

Bairro:..... Cidade:.....

CEP:..... Telefone: DDD (.....)

2.Responsável Legal:.....

Natureza (grau de parentesco, tutor, curador etc.):.....

Documento de Identidade :.....Sexo: M ☐ F ☐

Data Nascimento.:/...../.....

Endereço:..... Nº Apto:

Bairro:Cidade:

CEP:Telefone: DDD (.....).....

Avaliação do risco da pesquisa: Risco mínimo - biopsia do lábio

1.**Duração da pesquisa:** 01 ano

ANEXO B. PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

USP - HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: USO DA MICROSCOPIA CONFOCAL DE REFLECTANCIA NA AVALIAÇÃO DO CAMPO DE CANCERIZAÇÃO LABIAL: PADRÕES PAREADOS COM HISTOLOGIA E SINAIS PRECOSES DE EVOLUÇÃO PARA CARCINOMA ESPINOCELULAR

Pesquisador: Marcello MEnta Simonsen Nico **Área Temática:**

Versão: 1

CAAE: 94338518.5.0000.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP **Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.823.298

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo experimental prospectivo visando correlacionar os achados da microscopia confocal reflexiva (MCR) com aspectos clínicos e histopatológicos da queilite actínica e do carcinoma espinocelular labial incipiente. Para tanto serão incluídos pacientes com manifestações clínicas de queilite actínica da Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Após a coleta dos dados iniciais, as lesões labiais de todos os pacientes serão examinadas clinicamente e pelo sistema MCR para realização de imagens in vivo, seguida por biópsia para exame histopatológico.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Correlacionar os achados da MCR com os achados da histopatologia e definir critérios diagnósticos não só da quelite actínica como do carcinoma espinocelular labial incipiente. Objetivo Secundário: Descrever os achados celulares e arquiteturais do campo de cancerização labial observados no exame de microscopia confocal in vivo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há risco. Benefícios estão relacionados com a possibilidade de diagnóstico não invasivo e controle terapêutico dos casos de quelite actínica e carcinoma espinocelular labial.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5o andar

Bairro: Cerqueira Cesar

UF: SP **Município:** **Telefone:** (11)2661-7585

CEP: 05.403-010

Fax: (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto com boa fundamentação teórica, metodologia adequada aos objetivos propostos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE escrito em linguagem clara e compreensível.

Recomendações:

Nenhuma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Adequado para aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS no 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1069946.pdf	24/07/2018 11:24:45		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.docx	24/07/2018 11:24:27	Marcello MEnta Simonsen Nico	Aceito
Cronograma	Cronograma.docx	20/07/2018 17:14:33	Marcello MEnta Simonsen Nico	Aceito
Orçamento	financiamento.docx	20/07/2018 17:14:13	Marcello MEnta Simonsen Nico	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_Menta.pdf	13/03/2018 11:22:50	Marcello MEnta Simonsen Nico	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	08/03/2018 10:52:13	Marcello MEnta Simonsen Nico	Aceito

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5o andar

Bairro: Cerqueira Cesar

UF: SP **Município:** **Telefone:** (11)2661-7585

CEP: 05.403-010

Fax: (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 15 de agosto de 2018

Assinado por:

ALFREDO JOSE MANSUR (Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5o andar

Bairro: Cerqueira Cesar

UF: SP **Município:** **Telefone:** (11)2661-7585

CEP: 05.403-010

Fax: (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

ANEXO C. TABELA ORIGINAL TERMOS USADOS PARA DESCRIÇÃO DA PELE NORMAL

Table II. Terms used for the description of normal skin (presented in alphabetical order)

Blood vessels	Blood vessels are readily visualized in real-time examination. Blood vessels appear as dark structures in the dermis (ie, darker than surrounding stroma) in which movement of bright round cells (white blood cells) is seen. The outline of the blood vessels can be: Canalicular (elongated)—reflecting that the vessel is oriented en-face (parallel to the skin surface). The canalicular vessels can be further described as straight or tortuous. Round—implying the vessel is oriented perpendicularly to the plane of imaging (eg, ascending or descending limbs of the capillary loops in the dermal papilla). The observer can comment on the density (ie, number of vessels in image) and diameter of vessels if different from that of the patient's normal skin at analogous anatomic location.
Collagen	Bright elongated fibrillar structures/bundles with no cellular component, no visible nucleus, and no visible movement, distributed side by side throughout the dermis. Collagen is usually distributed as coils or rings in papillary dermis and parallel bundles in reticular dermis. Collagen fibers have a diameter of 1-5 μm and bundles have a diameter of 5-25 μm . The observer can comment on collagen bundle thickness/density if different than that of normal skin counterparts (eg, thicker collagen bundles can be seen in a scar).
DEJ	First appears at 55-65 μm below the corneal layer, depending on body location. The DEJ can be usually recognized by the presence of dark holes in the epidermis, corresponding to the opening of dermal papillae. Observation of blood flow in the dermal papillae during real-time examination may further facilitate recognition of the DEJ. The DEJ may be less perceptible on RCM in areas where the DEJ is flatter, such as in sun-damaged skin.
Epidermis layers	
Stratum corneum (skin surface)	Top layer of intact skin with greater brightness compared with other epidermal layers, because of the backscatter of light at the air-stratum corneum interface (skin surface); the keratinocytes appear as 10- to 30- μm bright polygonal structures with dark outlines.
Stratum granulosum	Located 15-20 μm below the skin surface, presents 25- to 35- μm keratinocytes with bright, granular cytoplasm and dark oval nuclei; within the cytoplasm 0.5- to 1- μm grainy structures are seen.
Stratum spinosum	Located 20-100 μm below the stratum corneum and composed of 15- to 25- μm cells with bright cytoplasm and dark oval-round nuclei.
Basal layer	Located 50-100 μm below the stratum corneum; it is a single layer of cells arranged as aggregates of refractive cells (corresponding to horizontal optical sectioning at the suprapapillary plates) or in a circular pattern around the dark dermis (corresponding to optical sectioning through the dermal papillae). Its location may depend on epidermis thickness, which varies according to anatomic site.
Hair	
Hair follicle	A structure characterized by cells of different sizes in an ordered pattern consistent with cellular differentiation; the cells vary from small (ovoid or polygonal) basal differentiating cells to central larger (flatter) cells. Follicles are commonly associated with a hair shaft and a central lumen.
Hair shaft	Cylindrical or tubular long structure that has uniform high refractivity with no cellular pattern centrally, although some cellular pattern may be seen at its periphery (circumference). Usually it is seen emanating from a circular nonrefractive area that appears multidimensional, consistent with a hair follicle ostium (lumen).
Honeycomb pattern	This term describes the normal pattern of the epidermis in the spinous and granular layers in which well-demarcated cellular outlines form a grid that resembles a honeycomb. The cells are polygonal with a diameter that diminishes as deeper layers of the suprabasal epidermis are visualized.
Skin fold (dermatoglyph)	Nonrefractile (dark) linear furrows separating "islands" of keratinocytes

DEJ, Dermoepidermal junction.

PowerPoint presentation with 6 RCM images and an intake form with a comprehensive list of published terms used to describe image quality, normal skin morphology, and architecture, structures, and patterns of melanocytic lesions. Reviewers were first

asked to choose terms for general description of the images and then terms for describing selected areas within these images. They were also invited to suggest new unpublished terms, if necessary. All data collected were presented to the group in a

Fonte: Scope A, et al. *In vivo* reflectance confocal microscopy imaging of melanocytic skin lesions: consensus terminology glossary and illustrative images. *J Am Acad Dermatol*. 2007;57:644-58.

Table III. Terms used for the architectural and structural description of melanocytic lesions

Superficial (suprabasal) layers of the epidermis	
Epidermal cell demarcation (visible/poorly visible/nonvisible)	This term describes the presence or absence of the normal honeycomb pattern of the suprabasal epidermis; cell demarcation in the epidermis can be described as "visible" (synonymous with "preserved honeycomb pattern"), "poorly visible" (or "partial loss of honeycomb pattern"), or "not visible" (or "complete loss of honeycomb pattern").
Pagetoid spread (present/absent)	Presence of cells with a dark nucleus and bright cytoplasm, frequently twice the size of keratinocytes, in the superficial layers of the epidermis*
Corneal cysts	Encapsulated refractive structures located in the superficial epidermis
Granule	Small bright refractive particles not associated with or pertaining to any cell type; they are usually dispersed throughout the image. This term can also be used in deeper skin levels.
Basal cell layer of epidermis	
Basal layer pattern	A term used to describe the pattern created by refractive cells in the basal layer of melanocytic lesions
Uniformity (uniform/nonuniform)	Basal cells are described as uniform when there is no variation in brightness or cellular outline between individual cells. Uniform basal cells are often distributed in "cobblestone pattern" or around DP ("edged papillae") (see terms below).
Distribution of refractive cells	Described when basal cells are not uniformly distributed
Aggregated	A group of refractive cells in the basal layer that tends to gather in a cluster
Confluent	Refractive cells in basal layer that tends to join together forming a continuous line demarcating the DP
Scattered	Multiple isolated refractive cells that can be seen in the basal layer, with no specific pattern
Cobblestone pattern	Pattern that consists of aggregates of small polygonal cells with bright cytoplasm (corresponding to normal pigmented keratinocytes) separated by a less refractive outline in the epidermis
DEJ/superficial dermis	
DP attributes	
Aspect (regular/irregular)	Term used to describe the diameter and format (elongated, circular, polygonal) of dermal papillae in a given lesion. If the papillary diameter and format are similar for almost all DP, the aspect is described as regular.
Contour (edged/non-edged)	"Edged papillae" defined as those presenting a demarcated rim of bright basal cells (confluent cells); "non-edged papillae" are defined as dermal papillae without a demarcated rim of bright cells, but separated by a series of large reflecting cells
Distribution (homogeneous/heterogeneous)	Distribution of DP is defined as homogeneous when DP distribution is symmetrically/evenly arranged.
Size (small, medium, large)	Term used to describe diameter of the DP; DP size may be appreciated by comparison with what is expected in normal counterparts in a given tissue (eg, normal skin close to lesion) or by direct measurement: Small—diameter <100 μm Medium—diameter ranging from 100 to 200 μm Large—diameter >200 μm
DEJ disarray (mild/moderate/severe)	General term to designate an image where the normal architecture of the DEJ is partially or completely lost DEJ disarray can be graded as: Mild—lesions in which normal DEJ architecture (eg, aspect, contour, distribution, and size of DP [see "dermal papillary attributes"]) is partially lost Moderate—lesions with areas of partial and total loss of normal DEJ architecture (eg, DP can be identified only focally) Severe—lesions in which normal DEJ architecture of the tissue is completely lost

Continued

Fonte: Scope A, et al. *In vivo* reflectance confocal microscopy imaging of melanocytic skin lesions: consensus terminology glossary and illustrative images. *J Am Acad Dermatol*. 2007;57:644-58.

Table III. Cont'd

Nest (cluster)	Oval to round bright aggregate with well-defined borders, composed of clustered cells, frequently large and highly refractive
Location	Junctional nest (cluster)—nests connected with epidermal basal cell layer and bulge into dermal papillae Dermal nest (cluster)—nests located in dermal papilla/superficial dermis, without connection to the epidermal basal cell layer
Distribution	Focally aggregated—cellular clusters present in limited areas within the lesion Diffusely distributed—numerous clusters of cells present in lesion
Size	Small—clusters with major axis measuring <250 μm Medium—clusters with major axis ranging from 250 to 500 μm Large—clusters with major axis measuring >500 μm
Types	Dense clusters: compact aggregates of large polygonal cells, with hyporefractive nuclei and fine granular cytoplasm, forming polyhedral structures Sparse-cell clusters: roundish nonreflecting structures with a well-demarcated border, containing isolated round to oval cells with dark nucleus and reflecting cytoplasm, sometimes presenting in a multilobate configuration Cerebriform clusters: confluent aggregates of low reflecting polygonal or elongated structures separated by a low reflecting rim, resulting in a cerebriform appearance, in which cellular nuclei and contour cannot be usually distinguished
Dermal component	General term used to describe any bright (refractive) structure present in the dermal layer; it may be present or absent

DEJ, Dermoepidermal junction; DP, dermal papillae.

*See pagetoid cellular descriptors, Table IV.

Fonte: Scope A, et al. *In vivo* reflectance confocal microscopy imaging of melanocytic skin lesions: consensus terminology glossary and illustrative images. *J Am Acad Dermatol*. 2007;57:644-58.

ANEXO D. TABELA ORIGINAL CARACTERÍSTICAS DA MCR MAIS FREQUENTEMENTE DESCRITAS PARA DIAGNÓSTICO DE QUERATOSE ACTÍNICA E CEC

Table 2. Most frequently described diagnostic reflectance confocal microscopic features

Diagnosis	RCM features
Non-pigmented actinic keratosis and actinic cheilitis	Scale Hyperkeratosis Parakeratosis Atypical keratinocytes Normal or atypical honeycomb pattern in SG Architectural disarray in SG Atypical honeycomb pattern or architectural disarray in SS Poorly defined and irregular keratinocyte cell boundaries Exocytosis Dilated blood vessels Dermal solar elastosis
Pigmented actinic keratosis	With addition of: Mottled pigmentation Targetoid cells Epidermal dendritic cells Cords Densely packed, small and bright papillae Ring of pigmented keratinocytes surrounding the hair follicle Dermal plump bright cells
Non-pigmented Bowen disease	Scale Hyperkeratosis Parakeratosis Atypical keratinocytes Atypical honeycomb pattern and/or architectural disarray in SG and SS (Epi)dermal small bright cells
Pigmented Bowen disease	With addition of: Epidermal dendritic cells Dermal plump bright cells
Erythroplasia of Queyrat	Atypical honeycomb pattern and/or architectural disarray in SG and SS Round nucleated cells (Epi)dermal small bright cells Round papillary vessels
Squamous cell carcinoma	Scale Hyperkeratosis Parakeratosis Architectural disarray in SG Atypical honeycomb pattern in SG Atypical honeycomb pattern or architectural disarray in SS Round nucleated cells Dilated blood vessels Increased number of blood vessels Nest-like structures in superficial dermis Pleomorphic nucleated cells in superficial dermis
Keratoacanthoma	Scale Hyperkeratosis Atypical honeycomb pattern and/or architectural disarray in SG and SS Round nucleated cells

RCM: reflectance confocal microscopy; SC: stratum corneum; SG: stratum granulosum; SS: stratum spinosum. Bold: most important RCM features to distinguish between actinic keratosis and squamous cell carcinoma.

Fonte: Nguyen KP, *et al.* 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.

9 REFERÊNCIAS

- 1 de Santana Sarmiento DJ, da Costa Miguel MC, Queiroz LM, Godoy GP, da Silveira EJ. Actinic cheilitis: clinicopathologic profile and association with degree of dysplasia. *Int J Dermatol*. 2014;53(4):466-72.
- 2 Picascia DD, Robinson JR. Actinic cheilitis: a review of the etiology, differential diagnosis and treatment. *J Am Acad Dermatol*. 1987;17:255-64.
- 3 Braakhuis BJ, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, Brakenhoff RH. A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res*. 2003;63:1727-30.
- 4 La Riviere W, Pickett AB. Clinical criteria in diagnosis of early squamous cell carcinoma of the lower lip. *J Am Dent Assoc*. 1979;99:972-7.
- 5 Bernier JL, Reynolds MC. The relationship of senile elastosis to actinic radiation and to squamous cell carcinoma. *Milit Med*. 1955;117:209-21.
- 6 Dancyger A, Heard V, Huang B, Suley C, Tang D, Ariyawardana A. Malignant transformation of actinic cheilitis: a systematic review of observational studies. *J Investig Clin Dent*. 2018 Jun 4:e12343.
- 7 Mello FW, Miguel AFP, Dutra KL, Porporatti AL, Warnakulasuriya S, Guerra ENS, Rivero ERC. Prevalence of oral potentially malignant disorders: a systematic review and meta-analysis. *J Oral Pathol Med*. 2018;47(7):633-40.
- 8 Markopoulos A, Albanidou-Farmaki E, Kayavis I. Actinic cheilitis: clinical and pathologic characteristics in 65 cases. *Oral Dis*. 2004;10:212-216.
- 9 Fernández-Angel I, Rodríguez-Archilla A, Aneiros Cachaza J, Muñoz Medina M, Serrano Ortega S. Markers of metastasis in lip cancer. *Eur J Dermatol*. 2003;13:276-9.
- 10 Kaugars GE, Pillion T, Svirski J, Page DG, Burns JC, Abbey LM. Actinic cheilitis: a review of 152 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1999;88:181-6.

-
- 11 Nico MMS, Rivitti AE, Lourenco SV. Actinic cheilitis: histologic study of the entire vermilion and comparison with previous biopsy. *J Cutan Pathol*. 2007;34:309-14.
 - 12 Que SK, Fraga-Braghiroli N, Grant-Kels JM, Rabinovitz HS, Oliviero M, Scope A. Through the looking glass: basics and principles of reflectance confocal microscopy. *J Am Acad Dermatol*. 2015;73(2):276-84.
 - 13 Nwaneshiudu A, Kuschal C, Sakamoto FH, Anderson RR, Schwarzenberger K, Young RC. Introduction to confocal microscopy. *J Invest Dermatol*. 2012;132:e3.
 - 14 Nagata G, Santana T, Queiroz A, Caraméz RH, Trierveiler M. Evaluation of epithelial dysplasia adjacent to lip squamous cell carcinoma indicates that the degree of dysplasia is not associated with the occurrence of invasive carcinoma in this site. *J Cutan Pathol*. 2018;45(9):647-51.
 - 15 Ayres S. Chronic actinic cheilitis. *JAMA*. 1923;81:1183-6.
 - 16 Cavalcante AS, Anbinder AL, Carvalho YR. Actinic cheilitis: clinical and histological features. *J Oral Maxillofac Surg*. 2008;66:498-503.
 - 17 Lopes ML, Silva Júnior FL, Lima KC, Oliveira PT, Silveira ÉJ. Clinicopathological profile and management of 161 cases of actinic cheilitis. *An Bras Dermatol*. 2015;90(4):505-12.
 - 18 XIV International Cancer Congress, XIV, Budapest, Hungary, 1986. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1986;15:790-8.
 - 19 Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Epithelial pathology in oral maxillofacial pathology*. Philadelphia, PA: WB Saunders; 1995.
 - 20 Wenig BM. Squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: precursors and problematic variants. *Mod Pathol*, v.15, p.229-54, 2002.

-
- 21 Wenig BM. Squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: dysplasia and select variants. *Mod Pathol.* 2017;30(s1):S112-S118.
 - 22 Crissman JD, Zarbo RJ, Drozdowicz S, Jacobs J, Ahmad K, Weaver A. Carcinoma in situ and microinvasive squamous carcinoma of the laryngeal glottis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1988;114:299-307.
 - 23 Choi SH, Kim KH, Song KH. Effect of methyl aminolevulinate photodynamic therapy with and without ablative fractional laser treatment in patients with microinvasive squamous cell carcinoma: a Randomized Clinical Trial. *JAMA Dermatol.* 2017;153(3):289-95.
 - 24 Bilkay U, Kerem H, Ozek C, Gundogan H, Guner U, Gurler T, Akin Y. Management of lower lip cancer: a retrospective analysis of 118 patients and review of the literature. *Ann Plast Surg.* 2003;50:43-50.
 - 25 Brazil. Health Ministry. Cancer National Institute. *2018 Estimate.* Brazilian cancer incidence. Rio de Janeiro, RJ, Brazil: INCA; 2017.
 - 26 Zitcsh R III, Park CW, Renner GJ, Rea JL Jr. Outcome analysis for lip carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1995;113:589-96.
 - 27 Venables ZC, Autier P, Nijsten T, Wong KF, Langan SM, Rous B, et al. Nationwide Incidence of Metastatic Cutaneous Squamous Cell Carcinoma in England. *JAMA Dermatol.* 2018 Nov 28.
 - 28 Biasoli ÉR, Valente VB, Mantovan B, Collado FU, Neto SC, Sundefeld ML, Miyahara GI, Bernabé DG. Lip cancer: a clinicopathological study and treatment outcomes in a 25-year experience. *J Oral Maxillofacial Surg.* 2016;74(7):1360-7.
 - 29 Bucur A, Stefanescu L. (2004). Management of patients with squamous cell carcinoma of the lower lip and N0-neck. *J Cranio-Maxillofacial Surg.* 2004;32(1):16-8.

-
- 30 Ozturk K, Gode S, Erdogan U, Akyildiz S, et al. Squamous cell carcinoma of the lip: survival analysis with long-term follow-up. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2015;272:3545-50.
 - 31 Bhandari K, Wang D, Li S, Jiang BH, et al. Primary cN0 lip squamous cell carcinoma and elective neck dissection: systematic review and meta-analysis. *Head Neck*. 2015;37:1392-400.
 - 32 Gutierrez-Pascual M, Vicente-Martín FJ, Fernández-Álvarez JG, Martín-López R, et al. Squamous cell carcinoma of the lip. A retrospective study of 146 patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2012;26:1116-21.
 - 33 Panwar A, Lindau R 3rd, Wieland A. Management of premalignant lesions of the larynx. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2013;13:1045-51.
 - 34 DeSanto LW. Cancer of the supraglottic larynx: a review of 260 patients. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1985;93:705-11.
 - 35 Cosci A, Nogueira MS, Pratavieira S, Takahama A Jr, Azevedo RS, Kurachi C. Time-resolved fluorescence spectroscopy for clinical diagnosis of actinic cheilitis. *Biomed Opt Express*. 2016;7(10):4210-9.
 - 36 Cosci A, Takahama A Jr, Correr WR, Azevedo RS, Fontes KB, Kurachi C. Automated algorithm for actinic cheilitis diagnosis by wide-field fluorescence imaging. *J Med Imaging (Bellingham)*. 2016;3(4):044004.
 - 37 Miranda AM, Ferrari T, Leite T, Domingos T, Cunha K, Dias E. Value of videoroscopy in the detection of alterations of actinic cheilitis and the selection of biopsy areas. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2015;20(3):e292-7.
 - 38 Ito T, Natsuga K, Tanimura S, Aoyagi S, Shimizu H. Dermoscopic features of plasma cell cheilitis and actinic cheilitis. *Acta Derm Venereol*. 2014;94(5):593-4.
 - 39 Güleç AT. Diagnosing squamous cell carcinoma of the lip using dermoscopy. *J Am Acad Dermatol*. 2017;76(2S1):S82-S83.

-
- 40 Benati E, Persechino F, Piana S, Argenziano G, Lallas A, Moscarella E, Castagnetti F, Longo C. Dermoscopic features of squamous cell carcinoma on the lips. *Br J Dermatol*. 2017;177(3):e41-e43.
 - 41 Minsky M. Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning*. 1987;10:128-38.
 - 42 Rajadhyaksha M, Grossman M, Esterowitz D, Webb RH, Anderson RR. In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin: melanin provides strong contrast. *J Invest Dermatol*. 1995;104:946-52.
 - 43 Rajadhyaksha M, Gonzalez S, Zavislan J, Anderson RR, Webb RH. In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin II: advances in instrumentation and comparison with histology. *J Invest Dermatol*. 1999;113: 293-303.
 - 44 Nehal KS, Gareau D, Rajadhyaksha M. Skin imaging with reflectance confocal microscopy. *Semin Cutan Med Surg*. 2008;27(1):37-43.
 - 45 Gonzalez S, Swindells K, Rajadhyaksha M, Torres A. Changing paradigms in dermatology: confocal microscopy in clinical and surgical dermatology. *Clin Dermatol*. 2003; 21:359-69.
 - 46 Scope A, Benvenuto-Andrade C, Agero AL, Malvehy J, Puig S, Rajadhyaksha M, et al. In vivo reflectance confocal microscopy imaging of melanocytic skin lesions: consensus terminology glossary and illustrative images. *J Am Acad Dermatol*. 2007;57(4):644-58.
 - 47 García-Hernández A, Roldán-Marín R, Iglesias-Garcia P, Malvehy J. In Vivo Noninvasive imaging of healthy lower lip mucosa: a correlation study between high-definition optical coherence tomography, reflectance confocal microscopy, and histology. *Dermatol Res Pract*. 2013;2013:205256.
 - 48 Ulrich M, González S, Lange-Asschenfeldt B, Roewert-Huber J, Sterry W, Stockfleth E, Astner S. Non-invasive diagnosis and monitoring of actinic cheilitis with reflectance confocal microscopy. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2011;25(3):276-84.

-
- 49 Benati E, Pampena R, Bombonato C, Borsari S, Lombardi M, Longo C. Dermoscopy and reflectance confocal microscopy for monitoring the treatment of actinic cheilitis with ingenol mebutate gel: report of three cases. *Dermatol Ther.* 2018 Apr 24:e12613.
 - 50 Bağcı IS, Gürel MS, Aksu AEK, Erdemir AT, Yüksel Eİ, Başaran YK. Reflectance confocal microscopic evaluation of nonmelanocytic lip lesions. *Lasers Med Sci.* 2017;32(7):1497-506.
 - 51 Lupu M, Caruntu A, Caruntu C, Boda D, Moraru L, Voiculescu V, Bastian A. Non-invasive imaging of actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip. *Mol Clin Oncol.* 2018;8(5):640-6.
 - 52 Nguyen KP, Peppelman M, Hoogedoorn L, Van Erp PE, Gerritsen MP. 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.
 - 53 Rishpon A, Kim N, Scope A, Porges L, Oliviero MC, Braun RP, Marghoob AA, Fox CA, Rabinovitz HS. Reflectance confocal microscopy criteria for squamous cell carcinomas and actinic keratoses. *Arch Dermatol.* 2009;145:766-72.
 - 54 Peppelman M, Nguyen KP, Hoogedoorn L, van Erp PE, Gerritsen MJ (2015) Reflectance confocal microscopy: non-invasive distinction between actinic keratosis and squamous cell carcinoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2015;29:1302-9.
 - 55 Blalock, Hubert. Social Statistics. New York, Mcgraw-Hill. 2ª Edição.1973.