SABRINA SISTO ALESSI CESAR

**Microscopia confocal a laser na avaliação *in vivo*
da gengivite descamativa:
padrões no penfigóide das membranas mucosas,
pênfigo vulgar e líquen plano oral**

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

Programa de Dermatologia

Orientador: Prof. Dr. Marcello Menta Simonsen Nico

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Cesar, Sabrina Sisto Alessi

Microscopia confocal a laser na avaliação in vivo da gengivite descamativa :
padrões no penfigóide das membranas mucosas, pênfigo vulgar e líquen plano oral /
Sabrina Sisto Alessi Cesar. -- São Paulo, 2015.

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

Orientador: Marcello Menta Simonsen Nico.

Descritores: 1.Doenças da gengiva 2.Microscopia confocal 3.Penfigóide
mucomembranoso benigno 4.Pênfigo 5.Líquén plano bucal

USP/FM/DBD-043/15

Dedicatória

Ao meu amado pai Odair, meu grande amigo e exemplo de vida. Minha admiração e amor por você serão eternos.

À minha querida mãe Ivani, pelo modelo de mãe e profissional, sempre dedicada e comprometida.

À minha irmã Mariana, cuja paixão pela medicina me inspira.

Ao meu marido César, pelo companheirismo e incentivo constante à minha carreira e pelo seu otimismo e bom humor mesmo nos momentos ruins, tornando mais amena a minha jornada.

À minha amada filha Manuela, por me tornar uma pessoa melhor e mais feliz a cada dia.

À Deus, por ter me acompanhado durante a vida, me concedendo oportunidades e me guiando por bons caminhos.

Agradecimentos

Ao meu querido orientador, Professor Doutor Marcello Menta Simonsen Nico, grande exemplo de dedicação à vida acadêmica, o meu sincero agradecimento pelo incentivo constante à minha carreira. Agradeço sua amizade, a orientação desta tese e a confiança depositada.

À Professora Doutora Sílvia Vanessa Lourenço, pelo apoio decisivo na minha caminhada e pelo auxílio fundamental no manejo com a microscopia confocal.

Ao Professor Doutor Cyro Festa Neto pelo suporte concedido para que esta tese fosse completada e pelas oportunidades criadas.

Ao Professor Doutor José Antônio Sanchez Junior e à Professora Doutora Mirian Nacagami Sotto, pelo apoio e incentivo nos assuntos relacionados à pós-graduação e à minha formação.

Ao Professor Doutor Evandro A. Rivitti, por seus ensinamentos e por ter confiado a mim a preceptorial dos internos e residentes.

À Dona Eli Maria de Freitas (*I.M.*), por seus conselhos e amizade desde a residência médica.

À Márcia e ao Lucas, pela paciência e eficiência em me ajudar nas questões da pós-graduação.

A todos os meus amigos do Departamento de Dermatologia do HC-FMUSP, pela amizade, carinho e estímulo durante esta caminhada.

Aos colegas dentistas do Grupo de Estomatologia, em especial à Dra Sheyla Bologna, pelo auxílio na microscopia confocal e realização das biopsias.

Aos meus novos amigos do Johns Hopkins Hospital, pelo curto porém intenso período de experiências que contribuíram para o meu amadurecimento profissional.

A todos meus mestres, médicos assistentes, preceptores, residentes e alunos com quem convivi na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e no Hospital das Clínicas, em especial no Departamento de Dermatologia, por me proporcionarem aprendizado constante e enriquecimento intelectual diário.

Aos doentes, motivo inicial e final de todo nosso trabalho.

Aos amigos membros da banca de qualificação, Professora Doutora Celina W. Maruta, Professora Doutora Neusa Y. Valente e Professora Doutora Zilda Najjar Prado de Oliveira, pelas valiosas sugestões e conselhos na melhoria deste trabalho.

Aos Professores que compõem a banca examinadora, pela participação na conclusão desta etapa tão importante em 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; 2011.

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

Sumário

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Gengivite descamativa	2
1.2	Microscopia confocal a laser	3
2	OBJETIVOS	5
3	REVISÃO DA LITERATURA	7
3.1	Gengivite descamativa.....	8
3.1.1	Conceito	8
3.1.2	Histórico	8
3.1.3	Dados epidemiológicos	11
3.1.4	Manifestações clínicas	13
3.1.5	Causas e diagnose diferencial	18
3.1.6	Achados histopatológicos	19
3.1.7	Achados de imunofluorescência direta (IFD) e indireta.....	20
3.2	Microscopia confocal a laser	23
3.2.1	Conceito	23
3.2.2	Histórico	29
3.2.3	Correlação com histopatologia e glossário.....	30
4	CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	32
4.1	Casuística.....	33
4.2	Métodos.....	33
4.2.1	Coleta de dados clínicos	33
4.2.2	Microscopia confocal a laser	34

4.2.3	Histopatologia	37
4.2.4	Crêterios empregados na análise histopatológica.....	37
4.2.5	Imunofluorescência direta	38
4.2.6	Aspectos �ticos	39
5	RESULTADOS	40
5.1	Dados gerais e aspectos clínicos dos doentes.....	41
5.2	Achados histopatológicos	45
5.3	Achados de imunofluorescência direta	49
5.4	Achados da microscopia confocal a laser.....	50
6	DISCUSSÃO	60
7	CONCLUSÕES	68
8	REFERÊNCIAS	70
9	ANEXOS.....	77

Apndice

Listas

Abreviaturas, símbolos e siglas

a	- anos
Anti-IgA	- Anticorpo anti-imunoglobulina A
Anti-IgG	- Anticorpo anti-imunoglobulina G
Anti-IgM	- Anticorpo anti-imunoglobulina M
Anti-C3	- Anticorpo anti-complemento
CAPPesq	- Comitê de Ética e Pesquisa
CD	- Compact disc
°C	- Graus Celsius
C3	- Complemento
<i>et al.</i>	- E outros
Fem.	- Feminino
FITC	- Fluorocromo conjugado
GD	- Gengivite descamativa
HC-FMUSP	- Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HE	- Hematoxilina eosina
IFD	- Imunofluorescência direta
IFI	- Imunofluorescência indireta
IgA	- Imunoglobulina A
IgG	- Imunoglobulina G

IgM	- Imunoglobulina M
Inc.	- <i>Incorporated</i>
LE	- Lúpus eritematoso
LP	- Líquen plano
Masc.	- Masculino
MC	- Microscopia confocal
mm	- Milímetros
mW	- Miliwatt
NA	- <i>Numerical aperture</i>
nm	- Nanômetro
NY	- New York
pH	- Potencial hidrogeniônico
PB	- Penfigóide bolhoso
PMM	- Penfigóide das membranas mucosas
PV	- Pênfigo vulgar
TBS	- Tampão trizma base com cloreto de 9dditi
ZMB	- Zona da membrana basal
x	- Vezes
µm	- Micrômetro
%	- Por cento

Figuras

Figura 1 -	Princípio da microscopia confocal	25
Figura 2 -	Aparelho de microscopia confocal utilizado para captura de imagens <i>in vivo</i> (Vivascope 3000, Lucid Inc., Rochester, NY)	28
Figura 3 -	(A) Realização do exame de microscopia confocal na gengiva dos doentes. (B) Aspecto clínico da gengivite descamativa: edema, eritema e erosão nas papilas interdentárias e gengiva marginal.....	36
Figura 4 -	Achados histopatológicos do pênfigo vulgar	46
Figura 5 -	Achados histopatológicos do penfigóide das membranas mucosas	47
Figura 6 -	Achados histopatológicos do líquen plano oral	48
Figura 7 -	Aspecto da gengiva normal à microscopia confocal.....	51
Figura 8 -	Aspecto da gengiva com pênfigo vulgar à microscopia confocal	53
Figura 9 -	Aspecto da gengiva com penfigóide das membranas mucosas à microscopia confocal.....	55
Figura 10 -	Aspecto da gengiva com líquen plano oral à microscopia confocal	58

Tabelas

Tabela 1 -	Dados gerais, exame histopatológico e de imunofluorescência direta dos doentes com gengivite descamativa	42
Tabela 2 -	Achados de microscopia confocal no pênfigo vulgar, comparados à histopatologia.....	52
Tabela 3 -	Achados de microscopia confocal no penfigóide das membranas mucosas, comparados à histopatologia.....	54
Tabela 4 -	Achados de microscopia confocal no líquen plano oral, comparados à histopatologia.....	57
Tabela 5 -	Principais achados de microscopia confocal no penfigóide das membranas mucosas, pênfigo vulgar e líquen plano	59

Resumo

Cesar SSA. *Microscopia confocal a laser na avaliação in vivo da gengivite descamativa: padrões no penfigóide das membranas mucosas, pênfigo vulgar e líquen plano oral* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

Introdução: Gengivite descamativa (GD) se refere a uma manifestação clínica associada com diversas doenças mucocutâneas. Suas causas mais comuns são penfigóide das membranas mucosas (PMM), pênfigo vulgar (PV) e líquen plano oral (LP). A diagnose específica é melhor estabelecida através de avaliação histopatológica e de imunofluorescência. **Objetivos:** Examinar casos de gengivite descamativa utilizando microscopia confocal a laser e comparar os achados com aqueles encontrados na gengiva normal. Além disso, comparar os achados de microscopia confocal da gengivite descamativa com os da histopatologia convencional das lesões biopsiadas a fim de estabelecer critérios para este método diagnóstico não invasivo.

Método: Doentes com manifestações clínicas de gengivite descamativa foram incluídos, totalizando quarenta e três casos. A microscopia confocal foi realizada na gengiva de um indivíduo saudável e nas lesões gengivais. Todas as lesões sem exame histopatológico prévio foram biopsiadas a fim de permitir uma correlação entre a microscopia confocal e a histopatologia.

Resultados: O exame de microscopia confocal das lesões suspeitas de penfigóide das membranas mucosas revelou uma separação ao nível da junção dermo-epidérmica, preenchida por pequenas estruturas brilhantes, interpretadas como hemáceas. Os aspectos histopatológicos e de imunofluorescência confirmaram o diagnose. Para os casos de pênfigo vulgar, os achados da microscopia confocal foram de fenda intraepitelial com células arredondadas interpretadas como queratinócitos acantolíticos. Hiperqueratose e espongiose, associadas com infiltrado inflamatório, caracterizado por células pequenas e brilhantes permeando a estrutura intraepitelial de queratinócitos conhecida como favo de mel foram vistos no líquen plano. Estruturas arredondadas pouco brilhantes, interpretadas como queratinócitos necróticos, e estruturas estelares também pouco brilhantes, interpretadas como melanófagos, foram encontrados na derme.

Conclusões: Propõe-se o uso da microscopia confocal como uma ferramenta adicional no diagnose e avaliação da gengivite descamativa.

Descritores: Doenças da gengiva. Microscopia confocal. Penfigóide mucomembranoso benigno. Pênfigo. Líquen plano bucal.

Summary

Cesar SSA. *Confocal microscopy in the in vivo evaluation of desquamative gingivitis: patterns in mucous membrane pemphigoid, pemphigus vulgaris and oral lichen planus* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015.

Background: Desquamative gingivitis refers to a clinical manifestation associated with several mucocutaneous disorders. The most common are mucous membrane pemphigoid, pemphigus vulgaris and lichen planus. Their specific diagnosis is better established by histopathological and immunofluorescence evaluation. **Objective:** To examine cases of desquamative gingivitis using reflectance confocal microscopy and compare the findings with those of normal gingiva. Moreover, confocal microscopy findings in desquamative gingivitis were compared to conventional histopathology of the biopsied lesions, in order to establish criteria for this non-invasive diagnostic technique. **Methods:** Patients with clinical manifestations of desquamative gingivitis were included, totalizing forty-three cases. Reflectance confocal microscopy was performed the gingival of a healthy person and on gingival lesions. All lesions were biopsied in order to perform a reflectance confocal microscopy- histopathologic correlation. **Results:** Reflectance confocal microscopy exam of the gingival lesions suspected of mucous membrane pemphigoid revealed a separation at the level of dermal-epidermal junction, filled with small bright structures interpreted as blood cells. Histopathological and immunofluorescence aspects confirmed the diagnosis. For pemphigus vulgaris, reflectance confocal microscopy aspects were of intraepithelial cleft with round detached cells interpreted as acantholytic keratinocytes, similar to the histopathological features. Hyperkeratosis and spongiosis associated with infiltration of inflammatory cells, recognized as small bright cells intermingling the honeycomb keratinocyte epithelial structure, were seen in lichen planus. Mild bright round structures interpreted as necrotic keratinocytes and mild bright stellate structures, interpreted as melanophages in the dermis were also seen. These features were present in histopathology, confirming the diagnosis of lichen planus. **Conclusion:** We propose the use of reflectance confocal microscopy as an additional tool in diagnosis and evaluation of desquamative gingivitis.

Descriptors: Gingival diseases. Microscopy, confocal. Pemphigoid, benign mucous membrane. Pemphigus. Lichen planus, oral.

1 Introdução

1.1 GENGIVITE DESCAMATIVA

A gengiva humana é composta por epitélio escamoso estratificado, o qual cobre a lâmina própria que se localiza contiguamente ao osso desta região. Diversas doenças podem afetar o epitélio gengival, incluindo afecções autoimunes, representadas mais comumente pelo penfigóide das membranas mucosas (PMM), líquen plano (LP) e pênfigo vulgar (PV).

O termo gengivite descamativa (GD) designa uma manifestação crônica difusa da gengiva marginal. Trata-se de um aspecto clínico de eritema, descamação, erosão e descolamento epitelial ocasional da gengiva marginal. A GD não é um diagnóstico definitivo em si, mas sim uma manifestação clínica muito peculiar, presente em casos de PMM, LP e PV, doenças que podem compartilhar este aspecto clínico em certas fases de sua evolução clínica, apesar da diferença entre suas patogêneses.

A GD pode acometer desde apenas algumas áreas da gengiva, geralmente em fases iniciais da doença, até comprometer toda a superfície gengival. Por vezes, há lesões típicas das citadas doenças simultaneamente na pele ou em outras áreas da mucosa, facilitando o diagnóstico definitivo da origem do quadro gengival. Entretanto, não raro, as lesões gengivais apresentam-se como a única manifestação destas enfermidades naquele momento da evolução, dificultando a diagnose clínica.

Os exames laboratoriais classicamente realizados para a diagnose das doenças causadoras de GD são o exame histopatológico e de imunofluorescência direta. Dessa forma, é sempre necessária a realização de uma biopsia para a adequada diagnose.

1.2 MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER

Recentemente, a busca pela melhor acurácia diagnóstica inicialmente de tumores cutâneos e posteriormente de dermatoses inflamatórias, levou ao desenvolvimento de técnicas de imagem como a microscopia confocal a laser, que surgiu como um método de exame auxiliar não invasivo para o estudo *in vivo* de condições fisiológicas e patológicas da pele, especialmente nevos melanocíticos, melanoma e outras lesões de difícil diagnose clínica.

A microscopia confocal *in vivo* tem por finalidade fornecer imagens instantâneas, em tempo real, de alta resolução, com uma técnica não invasiva que permite a visualização das estruturas microanatômicas (células, núcleos e arquitetura tecidual) da pele e mucosa em uma resolução muito próxima à histopatologia convencional. As imagens obtidas por este método apresentam-se em planos paralelos à superfície da pele, diferentemente dos cortes histológicos convencionais (longitudinais) e, por isso, a correlação entre os dois métodos exige experiência na obtenção e interpretação das imagens. Esta é baseada na morfologia celular e no reconhecimento de padrões, ainda em estudo, e com a correta correlação desses com os achados à histopatologia convencional.

Tradicionalmente, os microscópios confocais que utilizam marcadores fluorescentes têm sido considerados ferramentas importantes no estudo dos processos biológicos celulares. O microscópio confocal *in vivo*, por sua vez, representa uma oportunidade única no exame não invasivo da pele ou mucosas, sem a necessidade de utilização dos marcadores fluorescentes ou corantes teciduais. O contraste das imagens confocais ocorre devido às variações naturais do índice de refração das organelas e microestruturas nas diferentes camadas da pele.

A maioria dos estudos utiliza o método na avaliação das lesões pigmentares; no entanto, a utilização da microscopia confocal na diagnose de dermatoses inflamatórias é crescente, e seu emprego com esta finalidade tem sido amplamente difundido nos últimos anos.

Nos últimos anos têm sido descritos os achados à microscopia confocal em dermatoses bolhosas e em dermatites de interface, com boa correspondência com os dados da histopatologia convencional. No entanto, não há, até o presente momento, estudos envolvendo a mucosa oral.

Nosso trabalho comparará os aspectos de microscopia confocal aos aspectos histopatológicos em casos de GD, verificando se as imagens obtidas por esse novo método podem ser úteis na obtenção de uma diagnose específica.

2 Objetivos

1. Descrever os achados celulares e arquiteturais observados no exame de microscopia confocal *in vivo* em casos de gengivite descamativa, estabelecendo os padrões diagnósticos para o penfigóide das membranas mucosas, pênfigo vulgar e líquen plano oral.
2. Correlacionar os achados da microscopia confocal *in vivo* com os achados histopatológicos.

3 Revisão da literatura

3.1 GENGIVITE DESCAMATIVA

3.1.1 Conceito

O termo gengivite descamativa (GD) descreve um aspecto clínico de eritema, descamação e, sobretudo, erosão das papilas interdentárias e da gengiva adjacente. De certa forma, o termo GD parece ser por vezes impróprio para designar tal quadro, já que erosões quase sempre são mais frequentes que descamação. Por isso, o termo “gengivite erosiva crônica” é também utilizado na literatura em língua francesa, predominando a designação GD na literatura anglo saxônica (Vaillant *et al.*, 2000; Vaillant *et al.*, 2002).

3.1.2 Histórico

Em 1894, Tomes e Tomes descrevem lesões gengivais dolorosas, caracterizadas pela coloração vermelha e pela superfície lisa e polida em mulheres de meia idade. Goadby (1923) descreve uma gengivo-estomatite crônica caracterizada por gengivas vermelhas e brilhantes em adultos, predominantemente mulheres e em geral associada à anemia. Apesar destas descrições serem muito semelhantes às manifestações clínicas do que é atualmente conhecido como gengivite descamativa, foi Prinz que, em 1932, descreve esta condição em detalhes e a nomeia “gengivite

descamativa cônica e difusa”, a partir da observação de 12 doentes durante 20 anos. Era considerada uma condição rara que consiste na inflamação crônica e difusa da gengiva marginal, caracterizada pela descamação do epitélio da papila e gengiva adjacente, expondo um tecido conjuntivo vermelho e sangrante. Segundo Merritt (1933), a gengivite descamativa, em suas formas mais leves e também menos típicas, seria uma condição mais comum do que previamente relatado por Prinz (1932). Merritt (1933) observa também que, por vezes, a gengivite é precedida por bolhas de conteúdo aquoso e que a gengivite se caracteriza por ser crônica e com exacerbações frequentes.

Devido à sua ocorrência preferencial em mulheres no período da perimenopausa, Prinz (1932) sugere que a síndrome seja uma entidade associada a distúrbios endocrinológicos. Entretanto, Merritt (1933) considera-a de causa indefinida, apesar de todos os seus doentes serem mulheres na pós menopausa. Ziskin e Zegarelli (1947) também creditam a GD a um distúrbio metabólico após estudarem 12 casos com microscopia óptica e tratamento empírico com estrógeno tópico com boa resposta na maioria dos casos. Esta série de casos reveste-se de importância peculiar pois demonstra a presença de bolhas em cinco dos casos, lesões cutâneas nas têmporas e pescoço em um caso e lesões em outros locais da mucosa oral além da gengiva em quatro casos, o que faz sugerir que GD é manifestação gengival de enfermidades que podem ocorrer em outras localizações. Em 1945, Ziskin e Silvers relatam um caso de GD associada ao líquen plano, modificando assim o conceito sobre GD. Older (1955)

sugere que a GD poderia estar associada a fatores psicogênicos e Engel *et al.* (1950), após investigação com técnicas histoquímicas, concluem que a alteração mais característica é uma despolimerização na substância fundamental da gengiva, levando à desintegração das fibras colágenas. Esta teoria é também apresentada por Foss *et al.* (1953) após estudo histopatológico de 18 casos, demonstrando degeneração do epitélio e tecido conjuntivo e desintegração da membrana basal com formação de bolhas subepiteliais.

Como para os primeiros estudiosos aparentava-se tratar de um processo primariamente degenerativo e não inflamatório, Foss *et al.* (1953) preferem o termo “gengivose”, o qual é utilizado inicialmente por Schour e Massler (1947) para descrever uma doença gengival degenerativa encontrada na Itália no pós guerra em crianças desnutridas.

Com este histórico, fica evidente a não concordância entre os autores acerca da natureza da GD e também se ela poderia ser considerada uma entidade clínica específica. Burket (1952) questiona se a GD é um apenas um sintoma ou se ela pode ser considerada uma doença propriamente dita. Após a descrição de três tipos diferentes de GD por Glickman (1953), a possibilidade de que estas lesões gengivais sejam uma manifestação oral não específica de distúrbios metabólicos ou dermatoses bolhosas ganha espaço na literatura.

É apenas em 1960 que Mc Carthy *et al.* aventam a hipótese da síndrome ser na realidade uma manifestação local de doenças bolhosas autoimunes ou de líquen plano. Após o surgimento dos estudos de

imunofluorescência, Nisengard e Neiders (1981) e posteriormente Rogers *et al.* (1982) demonstram definitivamente a relação entre GD com essas doenças.

3.1.3 Dados epidemiológicos

Desde as primeiras observações, viu-se que a GD caracteriza-se por ser uma doença de predomínio no sexo feminino e em pessoas de meia idade; nas séries de casos iniciais o quadro não foi observado em homens nem em indivíduos edêntulos (Prinz, 1932; Merritt, 1933).

Após a descoberta da relação entre GD e penfigóide das membranas mucosas (PMM), pênfigo vulgar (PV) e líquen plano (LP), as publicações demonstram que, em frequência, ocorre o PMM na maioria das vezes, seguido pelo LP e PV. Alguns autores ainda interpretam alguns casos como sendo relacionados à distúrbios hormonais (menopausa, histerectomia e ooforectomia), à fatores irritativos locais ou permaneceram idiopáticos (McCarthy *et al.*, 1960; McCarthy; Shklar, 1964, McCarthy; Shklar, 1980), mas tais conceitos não mais se aplicam.

Em 2008, é realizada uma revisão sistemática de todos os estudos na língua inglesa publicados entre 1990 e 2007 com a palavra chave “gengivite descamativa” (Lo Russo *et al.*, 2008). Os achados mostram que o PMM, LP e PV são mesmo os principais causadores de GD, sendo responsáveis por 88 a 98% dos casos, excluindo-se casos considerados idiopáticos, sendo

que as duas primeiras doenças chegam a ser responsáveis por mais de 80% dos casos.

A maioria das séries publicadas aponta o PMM como a causa mais comum de GD; Sklavounou e Laskaris (1983) e Markopoulos (2006), no entanto, encontram equivalência entre PMM e LP. Leao *et al.* (2008) e Lo Russo *et al.* (2008) encontram predomínio de LP sobre PMM, achado que possivelmente se deu por viés de seleção e encaminhamento (Lo Russo *et al.*, 2008).

A mais recente série de casos publicada (Suresh; Neiders, 2012) conta com 239 doentes, todos submetidos a biopsia para exame histopatológico e de IFD. Cerca de 45% dos doentes tinham LP, com média de idade de 65 anos (21 a 91 anos) e predomínio de mulheres (81%). Vinte e cinco por cento dos casos eram de PMM, com média de idade de 70 anos (30 a 95 anos) e predomínio feminino (73%). O PV correspondeu a apenas 2% dos casos. Outras dermatoses encontradas em percentual baixíssimo, foram dermatite herpetiforme, dermatose por IgA linear, doenças do tecido conjuntivo incluindo lúpus eritematoso, esclerodermia e doença mista. Mais uma vez, observa-se o predomínio da GD em mulheres e em adultos e do LP sobre as demais dermatoses,

Nas diversas séries, predomina o sexo feminino e entre a quarta e sexta década (Lo Russo *et al.* 2008). A média de idade dos doentes varia conforme a doença envolvida na GD, sendo maior nos portadores de PMM ou LP e menor nos casos de PV (Nisengard; Neiders, 1981; Laskaris *et al.*,

1982; Markopoulos *et al.*, 1996; Yih *et al.*, 2000; Vaillant *et al.*, 2000; Leao *et al.*, 2008).

O tempo de duração das lesões é avaliado e relatado em algumas publicações. A duração das lesões varia de 1 mês a 15 anos; na maioria das vezes estando presentes há alguns meses. A maioria dos doentes apresenta lesões exclusivamente gengivais, seguido por aqueles que apresentavam lesões gengivas e orais; uma minoria apresenta lesões orais e extra-orais concomitantemente, sendo que a localização extra-oral mais comum é o lábio. Não raro a manifestação clínica da dermatose se inicia pela cavidade oral, fazendo com que a análise correta da GD e sua causa sejam importantes para a diagnose, especialmente nos casos de PMM, no qual mais da metade dos doentes apresenta GD (Nisengard; Neiders, 1981; Laskaris *et al.*, 1982; Rogers *et al.*, 1982; Sklavounou; Laskaris, 1983).

O tempo para a diagnose definitiva varia de um a 120 meses, sendo de 19 meses em média para PMM, 11 para LP e 3 para PV (Vaillant *et al.*, 2000).

3.1.4 Manifestações clínicas

A primeira descrição da GD a caracteriza como uma inflamação gengival crônica na qual a gengiva se retrai e adquire uma superfície lisa, polida e vermelha, de aspecto moteado, em vez de se tornar mais grossa e irregular (Tomes; Tomes, 1894). Tal afecção pode ocorrer na gengiva marginal, gengiva inserida, palato e mucosa bucal (Goadby, 1923).

Prinz (1932) utiliza pela primeira vez o termo gengivite descamativa difusa crônica, caracterizando o quadro como uma inflamação da gengiva marginal com descamação do epitélio da papila e da gengiva adjacente, expondo um tecido conjuntivo de coloração vermelho-azulada escura que sangra facilmente.

Atualmente, conceitua-se a GD como um quadro clínico que inclui eritema, descamação, erosão e/ou lesões vésico bolhosas na gengiva marginal e inserida (Lo Russo *et al.*, 2009).

Merritt (1933) observa que na descamação gengival o epitélio se descola, deixando uma superfície crua e sensível; ocasionalmente o epitélio pode ser removido em tiras de comprimento considerável. Por vezes, as lesões são precedidas por bolhas pequenas de conteúdo fluido e aquoso que, ao se romperem, desprendem o epitélio e deixam uma superfície dolorosa, que, ao cicatrizar, muitas vezes é sede do mesmo processo novamente. A coloração das lesões varia de um vermelho brilhante a vermelho azulado e a localização mais comum é a região do incisivo maxilar.

A GD pode ser interpretada como o resultado final de uma série de doenças que levam à formação de fendas e que clinicamente se manifestam como vesículas e bolhas; entretanto, na prática, os doentes são examinados apenas quando estas lesões já se romperam deixando descamação e erosão (Scully; Porter, 1997). Assim, a principal característica da GD é o aspecto descamativo e/ ou erosivo que ocorre principalmente no aspecto vestibular da gengiva dos dentes anteriores, num padrão difuso. No entanto,

lesões podem ocorrer em qualquer local da gengiva e em extensões variáveis (Lo Russo *et al.*, 2008; Lo Russo *et al.*, 2009).

Assim como a extensão, o grau de envolvimento gengival também varia; em alguns casos o eritema predomina sobre a descamação e em outros o epitélio pode ser facilmente destacado; em alguns há extensas áreas de desnudamento com exposição do tecido conjuntivo (Neiders; Nisengards, 1981; Sklavounou; Laskaris, 1983; Yih *et al.*, 1998). Ocasionalmente, as lesões se estendem até os rebordos alveolares edêntulos (Scully; Porter, 1997).

A GD é considerada leve quando o doente apresenta apenas eritema e edema e é considerada de moderada a grave quando na gengiva encontra-se descamação, bolhas e erosões ou ulcerações resultantes das mesmas (Rogers *et al.*, 1982).

A superfície lingual da gengiva é menos afetada do que a superfície vestibular (Prinz, 1932; Merritt, 1933), sendo essa sempre acometida; inicialmente as lesões limitam-se à mucosa mastigatória (Rogers *et al.*, 1982).

O quadro de GD pode, ocasionalmente, vir acompanhado das manifestações clínicas da doença envolvida em outras localizações da mucosa oral ou mesmo na pele, como lesões vésicoerosivas nos casos de PV e PMM e lesões reticuladas brancas combinadas com lesões erosivas e atróficas que sugerem LP (Markopoulos *et al.*, 1996; Lo Russo *et al.*, 2008). Em mais da metade dos casos de PV, as lesões se iniciam na mucosa oral,

através de bolhas flácidas que se rompem rapidamente deixando áreas erodidas. Nos casos de PMM a apresentação mais comum é a GD. Nessa doença não é raro se observarem na gengiva bolhas íntegras que posteriormente se rompem, deixando aspecto exulcerado. Na GD por LP, pode-se eventualmente observar, junto às erosões, áreas queratósicas (Sklavounou; Laskaris, 1983).

Não são frequente sinéquias gengivais nos casos de PMM, em alguns doentes o quadro é mesmo restrito à gengiva; no entanto, há possibilidade de progressão para lesões oculares, faríngeas e esofagenas (Mc Carthy *et al.*, 1960; Rogers *et al.*, 1982).

Alguns sinais propedêuticos podem ajudar na caracterização e diagnose diferencial clínica da GD. O teste do probe ou do jato, facilmente realizado por dentistas, é frequentemente positivo nos doentes com GD. Em alguns doentes bolhas intactas podem surgir ou progredir com a pressão dos dedos sob áreas ainda não ulceradas, formando bolhas hemorrágicas (Rogers *et al.*, 1982; Sklavounou; Laskaris, 1983).

O sinal de Nikolsky se caracteriza pelo surgimento ou aumento do tamanho de bolhas após a aplicação de uma pressão horizontal na pele perilesional. Quando positivo, indica fragilidade no mecanismo de adesão celular, sendo sinal característico dos pênfigos. Na mucosa oral, o sinal de Nikolsky pode ser provocado por um instrumento dentário de ponta romba ou por gaze. Uma nova bolha se formará ou uma camada superficial do epitélio se separará e descolará facilmente do tecido conjuntivo.

Mignogna *et al.* (2008) estipulam que, na gengiva, o sinal de Nikolsky, apresente especificidade de 96,3% e a sensibilidade de 46,7% para identificação de doenças bolhosas autoimunes.

Outra manobra propedêutica importante na observação da GD é o denominado “sinal da pinça”, que consiste no destacamento do epitélio com uma pinça na periferia de uma erosão gengival. Se assim procedendo obtém-se um significativo retalho de mucosa, considera-se alta a propabilidade de se tratar de um caso de PMM (especificidade de 100% e sensibilidade de 90%). Nos casos de PV, não ocorre destacamento significativo do epitélio por essa manobra; no LP, em geral, não se obtém nenhum retalho (Vaillant *et al.*, 2002).

A maioria dos doentes queixa-se de queimação e dor (Neiders; Nisengard, 1983; Scully; Porter, 1997; Leao *et al.*, 2008). Tais sintomas podem dificultar a adequada higiene oral; conseqüentemente muitos doentes apresentam também placas dentárias, o que pode comprometer a longo prazo a saúde periodontal (Markopoulos *et al.*, 1996; Lo Russo *et al.* 2008).

A diagnose definitiva de GD é frequentemente retardada por se confundir o quadro com aquele causado por doença periodontal local (Leao *et al.*, 2008).

3.1.5 Causas e diagnose diferencial

Na maioria das séries publicadas, PMM, LP e PV respondem pela quase totalidade dos casos de GD, sendo que as duas primeiras correspondem a mais de 80% dos doentes (Lo Russo *et al.*, 2008).

A primeira classificação da GD considerou como causas algumas dermatoses, que incluíam PMM, PV e LP; influências hormonais, irritação, infecções crônicas e casos idiopáticos (McCarthy *et al.*, 1960).

Muito raramente, outras doenças além do PMM, PV e LP são descritas como causadoras de GD: eritema polimorfo e síndrome de Stevens-Johnson, dermatite herpetiforme, epidermólise bolhosa adquirida, pênfigo paraneoplásico, dermatose por IgA linear, estomatite de contato, lúpus eritematoso, doença do enxerto versus hospedeiro, necrólise epidérmica tóxica, estomatite crônica ulcerativa, psoríase e amiloidose bolhosa (Laskaris *et al.*, 1982; Vaillant *et al.*, 2000; Lo Russo *et al.*, 2008; Lo Russo *et al.*, 2009).

Yih *et al* (2008) ainda consideram como causas raras de GD infecções crônicas bacterianas, virais e fúngicas ou algum outro fator capaz de causar irritação ou inflamação.

Scully e Porter (1997) consideram, ainda, que casos de GD possam ser devido a algum dano químico secundário ao uso de desinfetantes bucais, gomas de mascar, materiais dentários ou resposta alérgica a medicamentos.

3.1.6 Achados histopatológicos

É difícil estabelecer a causa de um caso de GD em bases puramente clínicas, sendo o exame histopatológico o recurso fundamental para a diagnose diferencial (Suresh; Neiders, 2012; Rogers *et al.*, 1982).

A biopsia deve ser realizada em uma área perilesional, entre a erosão e o tecido normal. O espécime deve conter o tecido intacto, com epitélio e tecido conjuntivo, evitando-se assim áreas exulceradas, desprovidas de epitélio, fundamental para a diagnose. O revestimento epitelial tende a romper ou se destacar nas três doenças envolvidas (Suresh; Neiders, 2012).

O achado mais comum no PMM é a fenda subepitelial com ou sem infiltrado inflamatório leucocitário, com tipo celular variável. Eritrócitos em número variável são observados no espaço de clivagem (Laskaris, 1983; Chan *et al.*, 2002; Lo Russo *et al.*, 2008).

O achado histológico que caracteriza o PV é a clivagem do tipo acantolítica supra basal, que representa a separação entre os queratinócitos intraepiteliais devido ao dano desmossomal. Células acantolíticas isoladas ou em grupo encontram-se na fenda (Sklavounou; Laskaris, 1983; Lo Russo *et al.*, 2008; Ruocco *et al.*, 2013).

No LP ocorrem hiper ortoqueratose, hipergranulose, acantose irregular, degeneração hidrópica da camada basal com presença de abundantes corpos citóides (Civatte), variável derrame pigmentar e infiltrado inflamatório linfocitário superficial em faixa na interface entre o epitélio e a lâmina própria. Nas formas erosivas da doença, que são as responsáveis

pelos casos de GD, há destacamento do epitélio pela intensa degeneração hidrópica da camada basal. (Sklavounou; Laskaris, 1983; Lo Russo *et al.*, 2008; Nico *et al.*, 2011).

Além da biopsia convencional realizada por *punch*, pode-se conseguir dados histopatológicos através da citologia esfoliativa, em especial nos casos de PV, quando podemos visualizar queratinócitos acantolíticos, que constituem queratinócitos arredondados e soltos (Lo Russo *et al.*, 2008). Para os casos de PMM, uma técnica de biopsia denominada *peeling*, mais simples e menos invasiva, pode ser realizada tanto para exame histopatológico quanto para IFD. Para este procedimento não se faz necessário o uso de anestesia local, basta induzir o descolamento epitelial com um bastão em uma área eritematosa, próxima a uma erosão, recortando então o retalho (Siegel; Anhalt, 1993; Ricotti *et al.*, 2008).

3.1.7 Achados de imunofluorescência direta (IFD) e indireta

A IFD é método importante na diagnose das dermatoses vesíco bolhosas autoimunes sendo, no entanto, mais valiosa quando somada aos dados clínicos e histológicos no estudo da GD (Nisengard *et al.*, 1978; Suresh; Neiders, 2012).

No PMM a IFD é positiva em 80 % dos casos. Observam-se depósitos lineares de IgG e C3 na zona de membrana basal (ZMB) individualmente ou combinados. O depósito linear de C3, com ou sem deposição de outras imunoglobulinas, apresenta a melhor sensibilidade e especificidade para o

PMM (Nisengard *et al.*, 1978; Helander; Rogers, 1994; Chan *et al.*, 2002; Suresh; Neiders, 2012).

No PV, a IFD apresenta ao menos IgG de padrão epitelial intercelular em praticamente todos os casos; IgM e C3 também são vistos com frequência. Na maior parte dos casos observa-se IgG e C3, individualmente ou combinados; em 9% o depósito é apenas de C3 (Nisengard *et al.*, 1978; Helander; Rogers, 1994; Suresh; Neiders, 2012).

No LP é frequente se encontrar depósitos de imunoglobulina M e complemento na porção papilar da lâmina própria e na junção dermoepidérmica em aglomerados, chamados de corpos citóides ou corpos de Civatte. Tal achado é mais comum em lesões e na pele, quando comparados com pele normal e mucosa, respectivamente. Apesar de não ser específico, o encontro do depósito dos corpos citóides pode ser útil quando a histopatologia é inconclusiva. Sua presença é de 97% nos casos de LP, 75% na dermatomiosite, 70% no lúpus eritematoso, 50% no eritema polimorfo, 50% no PB, 40% no PV e 40% na pele normal. O depósito pode assumir padrões diferentes conforme a doença, assim os corpos citóides tendem a se aglomerar em grupos no LP ao passo que no lúpus apresentam padrão linear. Na pele normal os corpos citóides em geral são menores e encontram-se em menor número.

Nos casos de LP, a IFD pode demonstrar também depósito descontínuo, que varia de linear a fibrilar, de fibrinogênio ao longo da ZMB e se estendendo até a camada superficial da lâmina própria. Este tipo de depósito é o melhor indicador de LP na IFD, especialmente em lesões não

ulceradas, com sensibilidade de 70% e especificidade de 78%. Sua presença é muito mais específica na mucosa do que na pele e a especificidade deste achado varia de 84% para IgM a 99% para IgG. A presença apenas de corpos citóides é bem menos sensível e tem sua maior sensibilidade com o conjugado IgM (41%). Assim, a presença de depósito fibrilar e descontínuo de fibrinogênio na ZMB e lâmina própria, associada ou não a corpos citóides de IgM representa o achado mais característico do LP na IFD, evitando resultados falso positivos (Nisengard *et al.*, 1978; Helander; Rogers, 1994; Jordan *et al.*, 2002; Nico *et al.*, 2011; Suresh; Neiders, 2012).

Helander e Rogers (1994) comparam a sensibilidade e especificidade da IFD com esses mesmos parâmetros das manifestações clínicas e histológicas. No PV, a sensibilidade da IFD chega a 89%, contra 50% e 66% para achados clínicos e histopatológicos, respectivamente. A especificidade da IFD para o PV é de 99%, ao passo que para a clínica é de 96% e para histologia 100%. Nos casos falso positivos de IFD para PV os depósitos são fracamente positivos e vistos com apenas um conjugado. Se estes casos forem excluídos chega-se a uma especificidade de 100%, porém com sensibilidade de 78%. Para os casos de penfigóide, incluindo PMM e PB e com biopsia na gengiva, a IFD apresenta sensibilidade e especificidade de 77% e 100%, respectivamente, contra 74% e 94% para achados histopatológicos e 85% e 70% para achados clínicos. Os casos falso positivos apresentam ausência ou depósito linear fracamente positivo de C3 ao longo da ZMB e a maior parte deles são por reações liquenóides do tecido, como LE e eritema polimorfo. No LP a sensibilidade e especificidade

da IFD na gengiva são 79% e 95%, respectivamente. Os achados clínicos e histopatológicos apresentaram sensibilidade de 58% e 88% e especificidade de 95% e 85%, respectivamente.

3.2 MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER

3.2.1 Conceito

O princípio da microscopia confocal de reflexão 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 (*pinhole*), 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). 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 MC 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 têm 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 obtido (Rajadhyasksha *et al.*, 1995).

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

A versão comercialmente disponível 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 1 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 pele.

Lentes de imersão em água são utilizadas já que o índice de refração da água é próximo do da epiderme e minimiza aberrações esféricas causadas pela passagem da luz através da interface água-tecido. É possível também fazer uso de géis a base de água como meio de imersão, já que eles podem reduzir irregularidades na refração, especialmente se o local examinado não for plano, já que o gel não escorre pela pele da mesma forma que a água. Um dispositivo de contato com a pele composto por um anel de metal que se acopla ao microscópio por magnetismo é utilizado para manter a água ou gel imóveis enquanto captam-se as imagens e assim reduzir possíveis artefatos.

Mudando as lentes objetivas no plano vertical à pele é possível capturar imagens em níveis horizontais, já que o foco muda 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 sanguíneo (Rajadhyaksha *et al.*, 1999; Gonzalez *et al.*, 2003).

No momento existem quatro versões do aparelho de microscopia confocal: 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 (Figura 2).

Figura 2

Aparelho de microscopia confocal utilizado para captura de imagens *in vivo* (Vivascope 3000, Lucid Inc., Rochester, NY)

3.2.2 Histórico

Em 1955, Marvin Minsky, na época um fellow na Universidade de Harvard, cria o sistema de microscopia confocal, o qual foi patenteado em 1957 (Minsky, 1987).

Entretanto, apenas em 1995 o sistema criado por Minsky é utilizado para darmos início ao 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 limitados, 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 imagens (Rajadhyaksha *et al.*, 1995).

Posteriormente, uma série de parâmetros são 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 objetivos com aumento e abertura numérica variáveis, distâncias maiores e tamanhos variáveis de *pinholes*. 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. Além disso, diferentes meios de imersão passam a ser testados; originalmente as

lentes foram desenvolvidas para serem usadas com água, mas alguns tipos de gel feitos a base de água mostram-se superiores pois são viscosos e não escorrem pela pele como a água, especialmente em superfícies convexas. Dessa forma, baseado em resultados experimentais, é criado um microscópio confocal *in vivo* pequeno e portátil, que pode ser facilmente transportado e utilizado para *screening* e diagnose de lesões, tal como o disponível atualmente (Rajadhyaksha *et al.*, 1999).

3.2.3 Correlação com histopatologia e glossário

Desde a criação do primeiro equipamento de MC 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 MC 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 biopsia, fixação no formol, realização dos cortes histológicos e coloração. Por outro lado, as imagens da MC 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 (Rajadhyaksha *et al.*, 1999).

Os queratinócitos da camada córnea apresentam-se sem núcleo, brilhantes e poligonais com contornos escuros e são menores do que os visualizados na histologia devido ao artefato de estiramento vertical e horizontal. Contudo, nas camadas granulosa, espinhosa e basal a

similaridade visual entre imagens confocais e histológicas 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 MC 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 (Rajadhyaksha *et al.*, 1999).

Após cerca de 10 anos de uso da microscopia confocal 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 MC tanto na pele normal quanto em lesões melanocíticas (Scope *et al.*, 2007). Este glossário encontra-se no Anexo C.

4 Casuística e Métodos

4.1 CASUÍSTICA

Foram analisados 43 doentes com manifestações clínicas de GD provenientes do Ambulatório de Estomatologia da Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) no período de agosto de 2011 a março de 2014. Todos os doentes leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A) e o critério de inclusão para participar da pesquisa era ter mais de 18 anos de idade e apresentar quadro clínico de GD.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Coleta de dados clínicos

De acordo com anotações dos prontuários e durante o exame clínico do doente, foram anotados dados gerais como sexo, idade, história clínica, antecedentes pessoais e familiares. Foram revistos os aspectos histopatológicos e de imunofluorescência direta, quando presentes, e foram realizadas novas biopsias por *punch*, nos casos em que a causa da GD ainda não estava estabelecida. Nestes casos, um fragmento foi acondicionado em formol e enviado para exame histopatológico e outro

fragmento foi acondicionado em meio de Michel e enviado para exame de imunofluorescência direta. Naqueles casos em que a biopsia já havia sido realizada e enviada apenas para exame histopatológico, porém com diagnose estabelecida, optamos por não realizar nova biopsia apenas para IFD.

4.2.2 Microscopia confocal a laser

Após a coleta dos dados iniciais, as lesões gengivais de todos os doentes foram examinadas clinicamente e com um sistema disponível comercialmente de microscopia confocal para realização de imagens *in vivo* (Vivascope 3000, Lucid Inc., Rochester, NY), apresentado na figura 2. O exame era realizado como apresentado na figura 3. Este aparelho funciona com uma iluminação próxima ao laser de diodo de 830 nm, operando a uma potência de 14 mW no tecido. A estrutura que entra em contato com a gengiva consiste em um anel de metal com uma cobertura de vidro. Uma lente objetiva de 0,9 de abertura numérica é conectada a este anel após a aplicação de gel de ultrassom entre as lentes e a cobertura de vidro. A microscopia confocal fornece imagens horizontais de 500 µm por 500 µm, equivalentes a cerca de 30x de aumento, com uma resolução de 1000x1000 pixels. Cortes horizontais seriados da mucosa são obtidos, desde a camada córnea até a derme reticular superficial, a intervalos de 4 a 5 µm até 300 µm de profundidade. As imagens foram armazenadas no próprio computador acoplado ao aparelho de microscopia confocal. Posteriormente, estas

imagens foram analisadas por dois examinadores independentes e salvas em um CD.

Os seguintes critérios foram analisados: integridade de todas as camadas do epitélio, presença ou ausência de fendas intraepiteliais ou células acantolíticas, presença ou ausência de clivagem subepitelial, células inflamatórias entre as células epiteliais e na lâmina própria, presença de melanófagos e células dendríticas e presença de vasos dilatados. Os termos utilizados na descrição da microscopia confocal são aqueles já consagrados na histopatologia ou previamente estabelecidos no glossário de microscopia confocal (Scope *et al.*, 2007), descritos no Anexo C.

Figura 3

(A) Realização do exame de microscopia confocal na gengiva dos doentes.

(B) Aspecto clínico da gengivite descamativa: edema, eritema e erosão na gengiva marginal.

4.2.3 Histopatologia

Após a realização da microscopia confocal *in vivo* na área de interesse, a região foi submetida à biopsia por *punch* de 4mm para exame histopatológico. Os doentes com biopsia prévia e exame histopatológico conclusivo não foram submetidos a um novo procedimento. 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 histológica e correlação com os achados de microscopia confocal. Todos os espécimes foram examinados por dois examinadores independentes e analisadas morfologicamente em microscópio óptico (marca Nikon Optiphot) equipado com câmera digital para registro dos resultados em fotomicrografia. Nos casos com biopsia prévia, os espécimes foram reavaliados por dois examinadores independentes e o diagnóstico anteriormente estabelecido foi confirmado.

4.2.4 Critérios empregados na análise histopatológica

A presença ou ausência de fendas intraepiteliais ou células acantolíticas, presença ou ausência de clivagem subepitelial e presença ou ausência de dermatite de interface ou degeneração hidrópica da camada basal foram avaliados em cada espécime, a fim de determinar a diagnose de

pênfigo vulgar, penfigóide das membranas mucosas ou líquen plano oral, respectivamente.

4.2.5 Imunofluorescência direta

Nos doentes que foram submetidos à biopsia para exame histopatológico foi realizado no mesmo tempo cirúrgico uma biopsia por *punch* de 4mm na região perilesional para realização da imunofluorescência direta. As amostras separadas para IFD foram transportadas acondicionadas em meio de Michel, armazenadas com crioprotetor e colocada em freezer a -20 °C. Em criostato, a -20 °C, os fragmentos foram cortados a 4 µm de espessura e colocados em lâmina silanizada (3 cortes por lâmina). Para a reação, os cortes receberam quatro conjugados, que são compostos por uma anti-imunoglobulina humana produzida em animal imunizado e associada a um fluorocromo conjugado (FITC) diluído em Azul de Evans. Os conjugados anti-humanos utilizados foram: anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM e anti-C3. Todos foram adquiridos comercialmente e são da marca Sigma Aldrich.

Os cortes permaneceram com o conjugado por 30 minutos, em câmara úmida, sob temperatura ambiente e no escuro para formação do imunocomplexo. A seguir, as lâminas foram lavadas em tampão trizma base com cloreto de cálcio (TBS) com de pH 7,5 por dois períodos de 10 minutos cada ou um período de 20 minutos.

Em seguida, as lâminas foram montadas com glicerina tamponada (pH 8,5) e lamínula de vidro e mantidas no escuro e sob refrigeração até o momento da leitura.

A leitura foi realizada em microscópio de fluorescência HBO 50w (filtro CB12) marca Carl Zeiss, com oculares de 10x e objetivas de 16x e 40x, acoplado à câmera fotográfica para registro dos resultados.

O resultado foi descrito observando-se o padrão e localização da fluorescência. Nos casos com biopsia prévia, os resultados foram reavaliados.

4.2.6 Aspectos éticos

Esse estudo foi desenvolvido de acordo com os princípios emanados da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. O protocolo foi enviado para a análise do Comitê de Ética em Pesquisa (CAPPesq) do HC-FMUSP e foi aprovado. A carta de aprovação encontra-se em anexo (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 E ACHADOS CLÍNICOS DOS DOENTES

Todos os 43 doentes apresentavam características clínicas de gengivite descamativa. O exame clínico revelava graus variáveis de edema, eritema e múltiplas erosões dolorosas em todos os casos, acompanhados por vezes de descolamento epitelial. Ocasionalmente, bolhas hemorrágicas intactas foram observadas. O indivíduo voluntário que serviu como controle para a análise da gengiva normal através da MC era saudável e apresentava aspecto normal e regular da gengiva.

Dos 43 doentes examinados com GD, 18 foram diagnosticados como PV (41,9%), 13 como PMM (30,2%) e 12 como LP (27,9%), sendo 36 mulheres (83,7%) e sete homens (16,3%). A idade variou de 21 a 80 anos, com média de 49 anos e meio (tabela 1).

Entre os casos de PV, ocorreu o predomínio do sexo feminino, com 72,2% contra 27,8% de doentes do sexo masculino. No PMM, as mulheres representaram 92,3% dos casos e no LP 91,7%.

No PV, a idade dos doentes variou de 21 a 52 anos, com média de 32 anos. No LP, a idade média foi de 50 anos, e variou de 33 a 71 anos. Para os casos de PMM, a idade variou de 46 a 80 anos e a média foi de 63 anos.

Tabela 1 – Dados gerais, exame histopatológico e de imunofluorescência direta dos doentes com gengivite descamativa

Sexo	Idade	Exame histopatológico	IFD
Fem	35a	acantólise suprabasal	IgG e C3 intercelular
Fem	46a	acantólise suprabasal	-
Masc	51a	acantólise suprabasal	IgG e C3 intercelular
Masc	39a	acantólise suprabasal	IgG e C3 intercelular
Fem	27a	acantólise suprabasal	IgG e C3 intercelular
Masc	51a	acantólise suprabasal	IgG e C3 intercelular
Masc	43a	acantólise suprabasal	negativa
Fem	21a	clivagem suprabasal	IgG e C3 intercelular
Masc	48a	acantólise suprabasal	-
Fem	28a	acantólise suprabasal	IgG e C3 intercelular
Fem	21a	acantólise suprabasal	IgG e C3 intercelular
Fem	46a	acantólise suprabas	-
Fem	37a	acantólise suprabasal	negativa
Fem	33a	acantólise suprabasal	IgG e C3 intercelular
Fem	50a	acantólise suprabasal	C3 intercelular
Fem	49a	acantólise suprabasal e infiltrado inflamatório misto na lâmina própria	IgG e IgM intercelular
Fem	33a	acantólise suprabasal e infiltrado inflamatório misto na lâmina própria	IgG e IgM intercelular
Fem	52a	acantólise suprabasal	IgG e C3 intercelular
Fem	74a	fenda subepitelial	C3 na ZMB
Fem	62a	fenda subepitelial	-

continua

Tabela 1 – Dados gerais, exame histopatológico e de imunofluorescência direta dos doentes com gengivite descamativa
(continuação)

Sexo	Idade	Exame histopatológico	IFD
Fem	72a	fenda subepitelial	C3 na ZMB
Fem	47a	fenda subepitelial	negativa
Fem	80a	fenda subepitelial	negativa
Masc	63a	fenda subepitelial	IgG, IgA, C3 na ZM
Fem	47a	fenda subepitelial	-
Fem	66a	fenda subepitelial	negativa
Fem	78a	fenda subepitelial	C3 na ZMB
Fem	51a	fenda subepitelial	negativa
Fem	66a	fenda subepitelial com exsudato hemorrágico	IgG e C3 na ZMB
Fem	46a	fenda subepitelial com exsudato hemorrágico	IgG, IgA, IgM e C3 na ZMB
Fem	67a	fenda subepitelial	-
Fem	42a	mucosite de interface liquenóide com degeneração hidrópica da camada basal e fenda subepitelial	negativa
Fem	45a	mucosite de interface liquenóide com degeneração hidrópica da camada basal e fenda subepitelial	IgM na ZMB
Fem	46a	hiperqueratose, espongiose, exocitose de linfócitos no epitélio, mucosite de interface liquenóide com degeneração hidrópica da camada basal, fenda subepitelial e vasos congestos	negativa

continua

Tabela 1 – Dados gerais, exame histopatológico e de imunofluorescência direta dos doentes com gengivite descamativa (conclusão)

Sexo	Idade	Exame histopatológico	IFD
Fem	57a	fenda subepitelial e degeneração hidrópica da camada basal	IgM em corpos citóides na derme papilar
Fem	53a	mucosite de interface liquenóide com degeneração hidrópica da camada basal	IgG e C3 na ZMB; IgM em corpos citóides na derme papilar
Masc	51a	Exocitose de linfócitos no epitélio, espongiose, mucosite de interface liquenóide com degeneração hidrópica da camada basal e fenda subepitelial	IgM em corpos citóides na derme papilar
Fem	52a	mucosite de interface liquenóide com degeneração hidrópica da camada basal e vasos congestionados	-
Fem	33a	mucosite de interface liquenóide com degeneração hidrópica da camada basal e vasos congestionados	IgM na ZMB
Fem	48a	hiperqueratose, espongiose, exocitose de linfócitos e mucosite de interface liquenóide com degeneração hidrópica da camada basal	C3 na ZMB e IgG, IgM e C3 no núcleo dos queratinócitos
Fem	71a	mucosite de interface liquenóide	negativa
Fem	53a	mucosite de interface liquenóide	IgM em corpos citóides na derme papilar
Fem	50a	espongiose, exocitose de linfócitos, mucosite de interface com degeneração hidrópica da camada basal e fenda subepitelial	-

5.2 ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS

Nos casos de PV, a histopatologia das lesões revelou presença de fenda intraepitelial com presença de queratinócitos acantolíticos em todos os doentes (figura 4). Infiltrado inflamatório misto na lâmina propria foi ocasionalmente observado.

Nos casos de PMM, os aspectos histopatológicos mostraram fenda ao nível da junção dermo-epidérmica nos treze casos, acompanhada de exsudato hemorrágico, além de infiltrado inflamatório na lâmina própria (figura 5).

Nos casos de LP, os achados histopatológicos mostraram mucosite de interface liquenóide, com infiltrado inflamatório linfocitário disposto em faixa na lâmina propria, além de queratinócitos apoptóticos e degeneração vacuolar da camada basal (figura 6). Fenda subepitelial foi encontrada em quatro casos e vasos dilatados em três. Achados epiteliais como hiperqueratose, espongiose e exocitose de linfócitos foram pouco encontrados: dois casos com hiperqueratose, três com espongiose e três com exocitose de linfócitos, sempre em associação com mucosite de interface.

Figura 4

Achados histopatológicos do pênfigo vulgar

(G): Fenda intraepitelial suprabasal com queratinócitos acantolíticos, HE, aumento original 100x.

(H): Fenda intraepitelial suprabasal com queratinócitos acantolíticos, HE, aumento original 400x.

Figura 5

Achados histopatológicos do penfigóide das membranas mucosas

(G): Fenda subepitelial separando o epitélio e o tecido conjuntivo da mucosa, preenchida por exsudato hemorrágico, HE, aumento original 200x.

(H): Fenda subepitelial separando o epitélio e o tecido conjuntivo da mucosa, preenchida por exsudato hemorrágico, HE, aumento original 400x.

Figura 6

Achados histopatológicos do líquen plano oral

(G): Mucosite de interface com infiltrado inflamatório linfocitário em faixa na derme, associado a corpos citóides e melanófagos na lâmina própria, HE, aumento original 100x.

(H1) e (H2): Mucosite de interface com infiltrado inflamatório linfocitário em faixa na derme, associado a corpos citóides e melanófagos na lâmina própria, HE, aumento original 400x.

5.3 ACHADOS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA

Em três casos de PV, a IFD não foi realizada no momento da diagnose e em dois casos ela resultou negativa. Nos 13 doentes em que a IFD foi positiva, ela demonstrou principalmente depósitos intercelulares de IgG (12 casos), que em dez doentes ocorreu em conjunto com C3 e em dois com IgM. Um doente apresentou IFD positiva apenas para depósitos intercelulares de C3.

Em três doentes de PMM, a IFD também não havia sido realizada no momento da diagnose; em quatro casos ela foi negativa. Nos seis casos em que a IFD resultou positiva, a fração C3 encontrava-se depositada de forma linear na ZMB. Em três deles foi o único conjugado visualizado; em um caso o depósito de C3 estava acompanhado de IgG, em outro caso de IgG, IgA e IgM e no último caso de IgG e IgA.

Para os casos de LP, a IFD não foi realizada no momento do diagnóstico em apenas um caso e foi negativa em três doentes. Nos oito doentes em que foi realizada, a IFD revelou depósitos de IgM em corpos citóides no córion papilar em quatro, sendo que em um deles havia também depósito descontínuo de IgG e C3 na ZMB. Em dois doentes foi encontrado depósito descontínuo de IgM na ZMB e em um deles depósito descontínuo de C3 ao longo da ZMB, acompanhado de IgG, IgM e C3 nos núcleos dos queratinócitos.

5.4 ACHADOS DA MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER

O aspecto à MC da gengiva normal consistiu em queratinócitos dispostos em um padrão arquitetural de aspecto em “favo de mel”, circundados por linhas regulares e brilhantes. Queratinócitos regulares e poligonais de tamanho médio foram observados e interpretados como a camada espinhosa do epitélio gengival. Na gengiva normal, a camada granulosa não foi detectada. Áreas mais escuras representativas do tecido conjuntivo apresentavam-se circundadas por queratinócitos basais grandes com aspecto brilhante e de contornos e formato regulares, em formato de anel. Não havia evidência de células inflamatórias brilhantes no córion papilar (figura 7).

Figura 7

Aspecto da gengiva normal à microscopia confocal

(A), (B) e (C): Imagem do epitélio superficial da mucosa com queratinócitos regulares em padrão favo de mel; os espaços entre os queratinócitos são regulares e visualizados como contornos brilhantes ao redor de cada célula. As células basais ao redor das papilas dérmicas são mais refráteis e circundam áreas escuras que representam a lâmina própria, em formato anelar. Não se evidenciam fendas intra ou subepiteliais.

(D) e (E): Imagem da lâmina própria com camada escura de tecido associada a imagens sutis da camada superficial do epitélio.

(F): As camadas mais profundas da derme são mais escuras e não demonstram células brilhantes, que poderiam corresponder a células inflamatórias ou melanófagos.

Nos casos de PV, a MC revelou um desarranjo arquitetural no epitélio com grandes espaços intercelulares. Em todos os casos havia uma fenda intraepitelial, associada a células arredondadas soltas interpretadas como queratinócitos acantolíticos. O aspecto da camada basal encontrava-se preservado bem como o anel de queratinócitos que circunda a papila. Na lâmina própria notou-se a presença de células inflamatórias e vasos horizontalmente orientados em doze casos. Tais achados encontram-se detalhados e comparados aos critérios histopatológicos na tabela 2 e ilustrados na figura 8.

Tabela 2 – Achados de microscopia confocal no pênfigo vulgar, comparados à histopatologia

Microscopia confocal	CrITÉRIOS histopatológicos
Fenda intraepitelial	Acantólise suprabasal
Células arredondadas e destacadas na fenda intraepitelial	Queratinócitos acantolíticos
Estruturas escuras lineares ou arredondadas que aparecem horizontalmente orientados na lâmina própria	Vasos dilatados
Células levemente refráteis com formato arredondado e poligonal, menores do que melanócitos e queratinócitos, no epitélio e/ou lâmina própria	Células inflamatórias no epitélio e/ou lâmina própria

Figura 8

Aspecto da gengiva com pêfigo vulgar à microscopia confocal

(A): Imagem de uma lesão gengival demonstrando o padrão de favo de mel dos queratinócitos infiltrado por algumas estruturas brilhantes, interpretadas como células inflamatórias (setas).

(B) e (C): Desarranjo entre os queratinócitos caracterizados por espaços escuros ou fendas (círculo), associadas a queratinócitos acantolíticos (setas).

(D): Detalhe das células acantolíticas (círculo).

(E): Imagens em níveis mais profundos das fendas intraepiteliais (círculo).

(F): Vasos dilatados horizontalmente orientados na lâmina própria (setas) e imagens em níveis mais profundos das fendas intraepiteliais (círculo).

A MC das lesões gengivais nos treze doentes com PMM revelou uma fenda subepitelial ampla. Esta fenda foi caracterizada pela presença de um espaço escuro preenchido por pequenas estruturas brilhantes, interpretadas como células inflamatórias e exsudato hemorrágico. Em seis casos vasos dilatados foram encontrados na lâmina própria. Tais achados encontram-se detalhados e comparados aos critérios histopatológicos na tabela 3 e ilustrados na figura 9.

Tabela 3 – Achados de microscopia confocal no penfigóide das membranas mucosas, comparados à histopatologia

Microscopia confocal	Crítérios histopatológicos
Fenda subepitelial, representada por espaços escuros, visto nas camadas epiteliais, circundando a lâmina própria	Fenda linear subepitelial
Espaço escuro preenchido por pequenas estruturas brilhantes, com formato arredondado a poligonal, intensamente refráteis, menores do que os melanócitos e queratinócitos	Fenda subepitelial preenchida por exsudato inflamatório e/ou hemorrágico

Figura 9

**Aspecto da gengiva com penfigóide das membranas mucosas à
microscopia confocal**

(A), (B) e (C): Imagens de uma lesão gengival com o padrão de favo de mel dos queratinócitos. Focalmente, observam-se espaços escuros, interpretados como áreas de separação focal do epitélio que recobre as papilas dérmicas (círculos). Note a ausência de queratinócitos acantolíticos.

(D), (E) e (F): Imagens dos espaços escuros nas partes mais profundas do epitélio (região da membrana basal) preenchidos por estruturas arredondadas brilhantes, interpretadas como fendas subepiteliais preenchida por exsudato hemorrágico e inflamatório (setas).

Nos doze casos de LP, a MC evidenciou uma camada córnea anormal que se caracterizou por áreas brilhantes nas camadas superiores do epitélio. Viu-se também um desarranjo arquitetural focal do epitélio, caracterizado por espaços intercelulares maiores entre os queratinócitos. Este aspecto estava associado ao infiltrado inflamatório celular caracterizado por pequenas células brilhantes entremeando os queratinócitos dispostos em “favo de mel”. Estruturas poligonais isoladas e brilhantes, sem núcleo visível, em geral maiores do que os queratinócitos que os circundam foram interpretados como queratinócitos necróticos. A interface epitélio-lâmina própria foi visualizada com dificuldade e suas estruturas em anel formadas pelos queratinócitos basais se demonstraram borradas, sem a formação do padrão anelar clássico. Ao nível da junção dermo-epidérmica detectamos células inflamatórias como pequenas células brilhantes. As papilas estavam distorcidas devido à presença de um aspecto difuso que circundava a junção quase que completamente, interpretados como sendo o infiltrado inflamatório. Os melanófagos, visualizados como células de formato oval a estrelado, intensamente brilhantes, foram encontrados nesta região. Vasos dilatados e horizontalmente orientados também foram visualizados na lâmina própria. Tais achados encontram-se detalhados e comparados aos critérios histopatológicos na tabela 4 e ilustrados na figura 10.

Tabela 4 – Achados de microscopia confocal no líquen plano oral, comparados à histopatologia

Microscopia confocal	Crítérios histopatológicos
Áreas focais brilhantes no epitélio	Hiperqueratose
Perda parcial ou completa do padrão normal de favo de mel	Desarranjo arquitetural do epitélio
Espaços intercelulares entre os queratinócitos maiores que o normal	Espongiose
Estruturas levemente brilhantes, poligonais, maiores que os queratinócitos presentes no epitélio	Queratinócitos necróticos
Estruturas brilhantes, com formato arredondado a poligonal, pequenas, no contexto de desarranjo epidérmico e espongiose	Infiltrado inflamatório celular no epitélio
Presença de células inflamatórias entre o epitélio e a lâmina própria. As papilas dérmicas são obscurecidas pela presença de infiltrado inflamatório difuso, envolvendo a junção dermo-epidérmica, com obliteração parcial ou total das estruturas em formato de anel ao redor das papilas, que se tornam borradas	Mucosite de interface liquenóide
Células intensamente brilhantes, com formato oval a estelar, entre as células inflamatórias na lâmina própria	Melanófagos na lâmina própria
Estruturas escuras lineares ou arredondadas que aparecem horizontalmente orientados na lâmina própria	Vasos dilatados

Figura 10

Aspecto da gengiva com líquen plano oral à microscopia confocal

(A1): Imagens de uma lesão gengival com áreas focais de hiperqueratose representada por áreas de brilho intenso (setas pretas).

(A2): Áreas com aumento dos espaços intercelulares entre os queratinócitos com perda parcial do padrão de favo de mel, interpretado como espongiose e desarranjo arquitetural no epitélio (setas brancas).

(B): Áreas epiteliais de hiperqueratose devido à visualização de áreas brilhantes (círculo).

(C): Perda parcial do padrão de favo de mel e estruturas arredondadas brilhantes (setas) no epitélio, interpretados como desarranjo arquitetural e células inflamatórias intraepiteliais.

(D): Células inflamatórias no epitélio e vasos sanguíneos dilatados nas papilas dérmicas (círculo).

(E): Presença de células dendríticas ao nível da junção dermo-epidérmica (círculo).

(E) e (F): Células inflamatórias e melanófagos na lâmina própria, envolvendo a junção dermo-epidérmica e comprometendo as estruturas em padrão anelar que correspondem à papila dérmica, o que corresponde histopatologicamente ao infiltrado inflamatório em faixa da lâmina própria. Note que os melanófagos são estruturas brilhantes, com formato estelar e maiores do que as células inflamatórias (círculo).

Para melhor entendimento, descrevemos na tabela 5 os principais achados de microscopia confocal em cada uma das três dermatoses.

Tabela 5 – Principais achados de microscopia confocal no penfigóide das membranas mucosas, pênfigo vulgar e líquen plano oral

Dermatose	Principais achados de microscopia confocal
Penfigoide das membranas mucosas	Fenda escura (clivagem) entre epitélio e lâmina própria, contendo células brilhantes, pequenas e redondas (hemácias)
Pênfigo vulgar	Grupos de células acantolíticas em fenda intraepitelial
Líquen plano	Borramento das cristas epiteliais, células inflamatórias e células brilhantes e dendríticas (melanófagos/ células de Langerhans)

6 Discussão

Na presente série de casos, assim como na literatura, as principais causas encontradas para GD foram o PMM, o PV e o LP. Não foi encontrado nenhum caso relacionado às outras doenças raramente relacionadas, na literatura, à GD.

Diferentemente da literatura mundial, que em publicações anteriores aos anos 80 do séc. XX citavam o PMM como causa mais comum de GD, e o LP em artigos a partir dessa época, em nossa série o PV foi a causa mais comum. Tal fato pode se dar por possível viés de nossa casuística, pois o HCFMUSP é referência em dermatoses imuno bolhosas. Ainda, cremos que muitos casos de LP estejam sendo manejados por serviços odontológicos.

Assim como na maioria das séries, houve predomínio de mulheres adultas: 83,7% dos doentes eram do sexo feminino e a idade média foi de 49,5 anos. Seguindo a epidemiologia de cada doença, a média de idade foi superior para os portadores de PMM, seguido pelos doentes com LP e por fim os com PV.

Os achados histopatológicos e de IFD encontrados foram aqueles que se classicamente espera encontrar para cada uma das três doenças. No PV, encontrou-se acantólise suprabasal em todos os dezoito casos. À IFD, o achado mais frequente (dez dos quinze casos realizados) foi positividade para IgG e C3 de padrão intercelular.

No PMM a fenda subepitelial com infiltrado inflamatório agudo foi visualizada em todos os casos; em quase todos havia intenso exsudato hemorrágico. A IFD teve achados positivos em apenas metade dos casos; em três doentes esse exame não havia sido realizado e em quatro foi negativo, o que pode ocorrer em até 20% dos casos (Suresh; Neiders, 2012). O padrão mais encontrado foi de depósito linear e contínuo de C3 na ZMB.

No LP, em todos os casos encontrou-se infiltrado inflamatório linfocitário em faixa, acompanhado de degeneração hidrópica da camada basal e presença de corpos apoptóticos (Civatte). Em cinco casos foi observada fenda subepitelial. O achado de IFD mais comum foi a positividade para IgM nos corpos citóides.

Como sabemos, a diagnose definitiva de doenças que se manifestam como GD baseia-se na correlação clínica- histopatologia- imunofluorescência direta. Nosso estudo foi prospectivo quanto à realização da microscopia confocal; no entanto, ao iniciá-lo, vários dos doentes já estavam diagnosticados e em acompanhamento, com histopatologia e IFD já executadas. Esses exames não foram repetidos com o início do estudo (ou seja, novas biopsias não foram realizadas), o que explica os poucos casos em que não havia IFD.

No presente trabalho, estudamos a microscopia confocal (MC) como método auxiliar na diagnose de GD. Tínhamos como hipótese que esse exame poderia fornecer, ao vivo e *in vivo*, imagens comparáveis às da histopatologia, tão distintas nas três doenças. Por outro lado, faz-se

necessário reconhecer que a MC é ainda um método de diagnose por imagem caro, disponível apenas em alguns serviços e que exige tempo para seu aprendizado no que se refere à captação e interpretação das imagens. Mesmo assim, é, sem dúvida, instigante a possibilidade de se vir a utilizar um método pelo qual se possa diagnosticar microscopicamente as afecções cutâneo-mucosas no exato momento da consulta.

Já foi demonstrado que a MC, técnica não invasiva que gera imagens da pele e mucosa em alta resolução, apresenta uma correlação interessante entre lesões na pele de PV e de LP com os achados da histopatologia convencional (Kurzeja *et al.*, 2011; Moscarella *et al.*, 2011). Contudo, ainda não havia estudos para lesões intra orais e gengivais, situação onde as lesões podem se apresentar clinicamente indistinguíveis.

Observamos que a MC de casos de GD forneceu imagens que se correlacionaram admiravelmente com os aspectos histopatológicos clássicos do PV, PMM e LP; cada uma delas revelou um padrão característico no exame.

No PMM, uma área negra logo abaixo do epitélio, entre o epitélio e a lâmina própria, é observada. Essa área negra, onde se observam múltiplas estruturas brilhantes interpretadas como sendo glóbulos vermelhos, corresponde não só ao aspecto de fenda subepitelial observado no PMM, como ao aspecto clínico de bolhas hemorrágicas frequentemente observado. O achado, à MC, da clivagem entre o epitélio e a lâmina própria, sem as alterações sugestivas de dermatite de interface como se vê no LP (ver a seguir), provavelmente sugere a diagnose de PMM, ou muito mais

raramente, de epidermólise bolhosa; doença raramente descrita como causadora de GD, mas não observada na nossa casuística. Ainda não havia na literatura relatos do uso da MC *in vivo* na diagnose do PMM.

No PV, a presença das células acantolíticas é crucial para a diagnose. Os queratinócitos acantolíticos, isolados ou agrupados (aspecto análogo às chamadas “papas de células acantolíticas” da histopatologia e da citopatologia) são facilmente observáveis à microscopia confocal das lesões de GD relacionadas ao PV, e constituem talvez o achado mais extraordinário visto por essa técnica. São visualizados não somente nas raras vesículas íntegras como também em áreas de transição entre mucosa gengival erodida e aparentemente sã e em espaços situados entre as camadas do epitélio (fendas intraepiteliais). As células acantolíticas já haviam sido observadas por outros autores em lesões cutâneas de PV (Kurzeja *et al.*, 2011).

A fenda intraepitelial e os queratinócitos acantolíticos foram encontrados em todos os nossos casos de PV, ao passo que Kurzeja *et al.* (2011) encontraram tais elementos apenas em 47% dos seus doentes, provavelmente por terem incluído em seu estudo lesões de longa duração, ou mesmo casos em tratamento. Esses autores visualizaram células inflamatórias intraepiteliais em 78% dos casos de PV, e vasos dilatados na derme superficial em 61%. Apesar de termos observado infiltrado inflamatório intraepitelial e vasos dilatados em alguns casos, não valorizamos tais achados na diagnose do PV, sendo suficiente a presença de fenda intraepitelial e/ou queratinócitos acantolíticos.

O método mostrou-se bastante útil na seleção da área a ser biopsiada, pois, na boca, não é raro se efetuarem biopsias em áreas que não fornecem informações diagnósticas específicas ao patologista. Ainda, a MC foi de utilidade na avaliação de lesões resistentes às terapias imunossupressoras; tais lesões podem até ser confundidas clinicamente com aspectos de doença periodontal.

Nos casos de LP, os achados à MC são múltiplos, não tendo sido encontrados em todas as lesões examinadas. O aspecto mais característico e que, em nossa opinião, reveste-se da maior importância diagnóstica foi a presença de orlas de queratinócitos basais circundando as papilas dérmicas, estando a visualização dessas últimas obscurecida pela presença de células inflamatórias e células dendríticas arranjadas em camadas que circundavam a junção lâmina própria- epitélio, levando à perda de sua estrutura anelar característica (lembrar que as papilas, à MC, são visualizadas transversalmente). Tais achados já haviam sido descritos nas lesões cutâneas do LP (Moscarella *et al.*, 2011), e correspondem aos achados histopatológicos de mucosite/ dermatite de interface.

A presença de camada granulosa espessa, aspecto ausente ou sempre muito tênue na mucosa gengival normal, foi comum nos casos de LP. À MC, os queratinócitos da camada granulosa são poligonais, têm citoplasma brilhante, são maiores que seus análogos na camada espinhosa e dispõem-se em padrão em “favo de mel” (Calzavara-Pinton *et al.*, 2008).

Diversos graus de desarranjo entre os queratinócitos mucosos podem estar presentes, assim como espaços escuros entre essas células (edema-

espongiose), além da presença de células inflamatórias permeando o epitélio gengival.

Frequentemente foram observados queratinócitos com limites mal definidos e de aspecto brilhante isolados na camada granulosa e em agregados ocorrendo na camada basal e supra basal, interpretados como sendo correspondentes aos queratinócitos necróticos e corpos de Civatte (apoptóticos), respectivamente, tão característicos à histopatologia. À MC, essas estruturas são maiores que os queratinócitos da proximidade e apresentam um aspecto uniformemente poligonal e brilhante, sem núcleo visível, parecendo repousar sobre o epitélio adjacente. Ao contrário do que ocorre na histopatologia, quando os queratinócitos necróticos são menores do que os queratinócitos normais, na MC estas células são maiores quando comparadas àqueles que as circundam. Acreditamos que esta diferença se deva pelo fato de na MC o material não sofrer nenhum processamento e não apresentar alterações artefatuais. As células inflamatórias têm formato arredondado ou poligonal, apresentam leve refração e são menores que os melanófagos.

Células dendríticas de aspecto brilhante foram comumente observadas, dispersas pela lâmina própria. Outros autores encontraram aspectos semelhantes em lesões cutâneas de LP (Moscarella *et al.*, 2012).

Essas células dendríticas brilhantes podem, nos casos de LP, se tratar tanto de melanófagos quanto de células de Langerhans. A dificuldade à MC em se distinguir melanócitos de células de Langerhans também ocorre quando se estudam as lesões melanocíticas (Hasehemi *et al.*, 2012). Daí se

reforça que a correta diagnose e interpretação das imagens de MC devem sempre estar associadas ao estudo clínico e histopatológico.

Os achados expostos e discutidos acima nos mostram que a MC confocal forneceu imagens de significado comparável às daquelas da histopatologia, permitindo distinguir perfeitamente, e em tempo real, aspectos de gengiva normal, MMP, PV e LP.

Dessa forma, acreditamos ter demonstrado que a MC é capaz de detectar padrões morfológicos específicos e diagnósticos em cada uma dessas condições patológicas, servindo de ferramenta útil em sua diagnose.

Mais estudos tornam-se necessários para que se encontrem critérios diagnósticos adicionais e para que se determine a real utilidade desse novo método em comparação à histopatologia e à IFD, no estudo das enfermidades mucosas gengivais.

Não é nossa intenção indicar a MC como padrão ouro na diagnose da GD, dada a dificuldade de se obter o aparelho. No entanto, mostrou-se método seguro e preciso, comparável à histopatologia clássica, com acurácia diagnóstica.

7 Conclusões

1. As imagens de microscopia confocal das lesões gengivais revelaram alterações morfológicas importantes e suficientes para identificar a causa da gengivite descamativa, sendo que o critério morfológico encontrado no penfigóide das membranas mucosas foi a presença de clivagem subepitelial preenchida por exsudato hemorrágico; no pênfigo vulgar foi a presença de fendas intraepiteliais e/ou células acantolíticas e no líquen plano foram o borramento das cristas epiteliais e presença de células inflamatórias e células brilhantes (melanófagos/ células de Langerhans) na derme papilar.

2. Os achados de MC nos casos de gengivite descamativa são comparáveis e superponíveis aos achados clássicos à histopatologia convencional de penfigóide das membranas mucosas, pênfigo vulgar e líquen plano.

8 Referências

Chan LS, Ahmed AR, Anhalt GJ, Bernauer W, Cooper KD, Elder MJ, Fine JD, Foster CS, Ghohestani R, Hashimoto T, Hoang-Xuan T, Kirtschig G, Korman NJ, Lightman S, Lozada-Nur F, Marinkovich MP, Mondino BJ, Prost-Squarcioni C, Rogers RS 3rd, Setterfield JF, West DP, Wojnarowska F, Woodley DT, Yancey KB, Zillikens D, Zone JJ.. The first international consensus on mucous membrane pemphigoid: definition, diagnostic criteria, pathogenic factors, medical treatment, and prognostic indicators. *Arch Dermatol.* 2002;138 (3):370-379.

Daniels DE, Quadra-White C. Direct immunofluorescence in oral mucosal disease: a diagnostic analysis in 130 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1981; 51: 38-47.

Engel M, Ray HG, Orban B. The pathogenesis of desquamative gingivitis. *J D Res* 1950; 29:410.

Foss CL, Grupe HE, Orban B. Gingivitis. *J Periodontol.* 1953; 24:207.

Gagari E, Damoulis PD. Desquamative gingivitis as a manifestation of chronic mucocutaneous disease. *JDDG* 2011; 3: 184-7.

Glickman I. *Clinical Periodontology*, Philadelphia: WB Saunders Company; 1953. Chap 12.

Glickman I, Smulow J. Chronic desquamative gingivitis: its nature and treatment. *J Periodontol.* 1964; 35: 397-405.

Goadby, K. *Diseases of the gums and oral mucous membrane*. London: Henry Froude and Hodder and Staughton; 1923.

Gonzalez S, Swindells K, Rajadhyaksha M, Torres A. Changing paradigms in dermatology: confocal microscopy in clinical and surgical dermatology. *Clinics in dermatology*. 2003; 21:359-369.

Hashemi P, Pulitzer MP, Scope A, Kovalyshyn I, Halpern AC, Marghoob AA. Langerhans cells and melanocytes share similar morphological features under in vivo reflectance confocal microscopy: a challenge for melanoma diagnosis. *J Am Acad Dermatol*. 2012; 66(3): 452-62.

Helander SD, Rogers RS. The sensitivity and specificity of direct immunofluorescence testing in disorders of mucous membranes. *J Am Acad Dermatol*. 1994; 30 (1): 65-75.

Jadinski JJ, Shklar G. Lichen planus of the gingiva. *J Periodontol*. 1976; 47: 724-33.

Jordan RCK, Daniels TE, Greenspan JS, Regezi JA. Advanced diagnostic methods in oral and maxillofacial pathology. Part II: immunohistochemical and immunofluorescent methods. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology*. 2002; 93 (1): 56-74.

Kurzeja M, Rakowska A, Rudnicka L, Olszewska M. Criteria for diagnosing pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus by reflectance confocal microscopy. *Skin research and technology*. 2011; 339-46.

Lo Russo L, Fedele S, Guiglia R, Ciavarella D, Lo Muzio L, Gallo P, Di Liberto C, Campisi G. Diagnostic pathways and clinical significance of desquamative gingivitis. *J Periodontol*. 2008; 79 (1): 4-24.

Lo Russo L, Fierro G, Guiglia R, Compilato D, Testa NF, Lo Muzio L, Campisi G. Epidemiology of desquamative gingivitis: evaluation of 125 patients and review of literature. *Int J Dermatol*. 2009; 48: 1049-52.

Markopoulos AK, Antoniadis D, Papanayotou P, Trigonidis G. Desquamative gingivitis: a clinical, histopathologic and immunologic study. *Quintessence International Periodontics*. 1996; 27 (11) 763-7.

McCarthy FP, McCarthy PL, Shklar G. Chronic desquamative gingivitis: a reconsideration. *Oral Surg*. 1960; 13 (11):1300-13.

McCarthy PL, Shklar G. *Diseases of the oral mucous: diagnosis, management, therapy*. New York: McGraw Hill Book Co; 1964.

McCarthy PL, Shklar G. *Diseases of the oral mucosa*. 2nd ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1980.

Merritt AH. Chronic desquamative gingivitis. *J Periodontol*. 1933; 4:30.

Minsky M. Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning*. 1987; 10: 128-38.

Moscarella E, Gonzalez S, Agozzino M, Sanchez-Mateos JLS, Panetta C, Contaldo M, Ardigo M. Pilot study on reflectance confocal microscopy imaging of lichen planus: a real-time, non invasive aid for clinical diagnosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2012;26(10):1258-65.

Nehal KS, Gareua D, Rajadhyaksha M. Skin Imaging With Reflectance Confocal Microscopy. *Semin Cutan Med Surg*. 2008; 27: 37-43.

Nico M, Fernandes JD, Lourenço SV. Oral lichen planus. *An Bras Dermatol*. 2011; 86(4):633-43.

Mignogna MD, Fortuna G, Leuci S, Ruoppo E, Marasca F, Matarasso S. Nikolsky's sign on the gingival mucosa: a clinical tool for oral health practitioners. *J Periodontol*. 2008; 79 (12): 2241-6.

Nisengard RJ, Alpert AM, Krestow V. Desquamative gingivitis: immunologic findings. *J Periodontol*. 1978; 49 (1): 27-32.

Nisengard RJ, Neiders ME. Desquamative lesions of the gingiva. *J Periodontol*. 1981; 52 (9): 500-10.

Older LB. Chronic neurogenic desquamative gingivitis with bullous formation. *J Periodontol*. 1955; 26:130.

Prinz H. Chronic diffuse desquamative gingivitis. *Dental Cosmos*. 1932; 74:331-3.

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

Rajadhyaksha M, Gonzalez S, Zavislan 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.

Ricotti C, Kowalczyk J, Fernandez A, Nousari CH. Mucosal “peeling” biopsy technique for the immunopathologic evaluation of desquamative gingivitis-associated mucous membrane pemphigoid. *Arch Dermatol*. 2008; 144 (11): 1538.

Rogers RS, Sheridan PJ, Jordon RE. Desquamative gingivitis: clinical, histopathologic and immunopathologic investigations. *Oral Surg*. 1976; 42: 316-27.

Rogers RS, Jordon RE. Immunopathology of oral mucosal inflammatory diseases. *Clin Exp Dermatol*. 1977; 2: 97-107.

Rogers RS, Sheridan PJ, Nightingale SH. Desquamative gingivitis: clinical, histopathologic, immunopathologic and therapeutic observations. *J Am Acad Dermatol.* 1982; 7: 729-35.

Ruocco V, Ruocco E, Schiavo AL, Brunetti G, Guerrera LP, Wolf R. Pemphigus: Etiology, pathogenesis, and inducing or triggering factors: facts and controversies. *Clinics in dermatology.* 2013; 31: 374-81.

Schour L, Massler M. Gingivla disease in postwar Italy: gingivosis in hospitalized children in Naples. *Am J Orthodontics & Oral Surg.* 1947; 33:756.

Scope A, Benvenuto-Andrade C, Agero AL, Malvey J, Puig S, Rajadhyaksha M, Busam KJ, Marra DE, Torres A, Propperova I, Langley RG, Marghoob AA, Pellacani G, Seidenari S, Halpern AC, Gonzalez S. 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.

Scully C, Porter SR. The clinical spectrum of desquamative gingivitis. *Seminars in cutaneous medicine and surgery.* 1997; 16(4): 308-13.

Sklavounou A, Laskaris G. Frequency of desquamative gingivitis in skin diseases. *Oral Surg* 1983; 56 (2): 141-4.

Siegel MA, Anhalt GJ. Direct immunofluorescence of gingival epithelium for diagnosis of cicatricial pemphigoid. *Oral Surg Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1993;75(3):296-302.

Suresh L, Neiders ME. Definitive and diferential diagnosis of desquamative gingivitis through direct immunofluorescence studies. *J Periodontol.* 2012; 83 (10): 1270-8.

Tomes J, Tomes C. Dental Surgery. 4th ed. London: J. & A. Churchill Ltd; 1894.

Vaillant L, Chauchaix-Barthes S, Huttenberger B, *et al.* Le syndrome, gingivite erosive chronique etude retrospective de 33 cas. Ann Dermatol Venereol. 2000; 127:381-7.

Vaillant L, Fontes V. Gingivite erosive chronique. Ann Dermatol Venereol. 2002; 129: 79-80.

Yih WY, Maier T, Kratochvil FJ, Zieper MB. Analysis of desquamative gingivitis using direct immunofluorescence in conjunction with histology. J Periodontol. 1998; 69 (6): 678-85.

Ziskin D, Silvers HF. Report of a case of desquamative gingivitis and lichen planus. J Periodontol. 1945; 16:7.

Ziskin D, Zegarelli EV. Chronic desquamative gingivitis. Am J Orthodontics & Ora Surg. 1947; 33: 756.

9 Anexos

Anexo A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____ Rubrica do pesquisador _____

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

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: MICROSCOPIA CONFOCAL

A LASER NA AVALIAÇÃO IN VIVO DA GENGIVITE DESCAMATIVA

PESQUISADOR: DRA SABRINA SISTO ALESSI CÉSAR

CARGO/FUNÇÃO: MÉDICA

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº: 125032

UNIDADE DO HCFMUSP: DIVISÃO DE DERMATOLOGIA

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA: RISCO MÍNIMO

3. DURAÇÃO DA PESQUISA: 01 ANO

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____ Rubrica do pesquisador _____

Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária nesta pesquisa, que utiliza um novo equipamento, o microscópio confocal, para descobrir a causa da inflamação da gengiva, conhecida como gengivite. Inicialmente, faremos o exame de microscopia confocal, um aparelho a laser, nas lesões da sua gengiva. Este exame não necessita de anestesia local pois não causa dor, apenas um leve incômodo no local. Se a causa da sua gengivite ainda não tiver sido descoberta, será realizado também uma biopsia de suas lesões gengivais, procedimento padrão para o diagnóstico correto da inflamação da gengiva. As biopsias serão realizadas com anestesia local e não há necessidade de nenhum cuidado especial após o procedimento. Se a causa da inflamação da sua gengiva já for conhecida ou você já tiver feito uma biopsia previamente, utilizaremos os resultados destes exames anteriores em nosso estudo.

Trata-se de estudo experimental, que avalia a possibilidade de que este aparelho novo, o microscópio confocal, possa auxiliar na descoberta das causas de gengivite, tornando a biopsia, procedimento com necessidade de anestesia local, desnecessária em alguns casos. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença deste benefício.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra Sabrina Sisto Alessi Cesar, que pode ser encontrado no endereço Rua Dr Eneas de Carvalho, 255, 3º andar, telefone (11) 2661-6050. 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: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 – e-mail: cappesq@hcnet.usp.br.

É garantida a liberdade da retirada de seu consentimento a qualquer momento e você poderá deixar de participar da pesquisa, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento no Ambulatório de Dermatologia do Hospital das Clínicas. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros doentes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente.

Você tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais da pesquisa. Não há despesas pessoais 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.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER NA AVALIAÇÃO IN VIVO DA GENGIVITE DESCAMATIVA.**

Eu discuti com a Dra Sabrina Sisto Alessi Cesar sobre a minha decisão em participar deste estudo. Ficaram claros para mim quais são os objetivos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante a pesquisa, sem penalidades ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente ou responsável

Anexo B

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER NA AVALIAÇÃO IN VIVO DA GENGIVITE DESCAMATIVA: PADRÕES NO PENFIGÓIDE DAS MEMBRANAS MUCOSAS, PÊNFIGO VULGAR E LÍQUEN PLANO ORAL
Pesquisador Responsável: Marcello Menta Simonsen Nico **Versão:** 3
Pesquisador Executante: Sabrina Sisto Alessi **CAAE:** 11961213.0.0000.0068
Co-autores: Sílvia Vanessa Lourenço
Finalidade Acadêmica: Doutorado
Instituição: HCFMUSP
Departamento: DERMATOLOGIA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 10241

Número do Parecer: 302.931

Data da Relatoria: 13/06/2013 *ad-referendum*

Apresentação do Projeto: Trata-se de um estudo clínico, prospectivo, envolvendo 25 indivíduos com quadro clínico de gengivite descamativa, alteração esta presente nos pacientes com pênfigo vulgar, líquen plano e penfigóide das membranas mucosas. Será realizada uma avaliação com um sistema disponível comercialmente de microscopia confocal para realização de imagens in vivo (Vivascope 3000, Lucid Inc., Rochester, NY) e os achados comparados aos resultados histológicos e de imunofluorescência direta, que atualmente são os métodos convencionais para esses diagnósticos.

Objetivo da Pesquisa: Descrever os achados celulares e arquiteturais das gengivites descamativas observados no exame de microscopia confocal in vivo e estabelecer os padrões diagnósticos para PMM, LP e PV.2. Correlacionar os achados da microscopia confocal in vivo com os achados histopatológicos e de imunofluorescência direta.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Os riscos da avaliação pela microscopia confocal in vivo são mínimos, uma vez que se trata de um procedimento não invasivo, indolor e a biópsia é um procedimento padrão para diagnóstico nos pacientes com essa lesão. Os pacientes com diagnóstico não terão necessidade de repetir o procedimento de biópsia. O sujeito de pesquisa não terá benefício imediato com a participação no estudo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: O projeto é bastante interessante uma vez que se propõe a uma investigação que talvez simplifique o diagnóstico das lesões em questão.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Não há

Recomendações: Não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Não há

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com o item IX.2 da Resolução CNS nº 196/96 – 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.

São Paulo, 13 de Junho de 2013

Prof. Dr. Luiz Eugênio Garcez Leme
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa-CAPPesq

Anexo C

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

Blood vessels	<p>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.</p> <p>The outline of the blood vessels can be:</p> <p>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.</p> <p>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).</p> <p>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.</p>
Collagen	<p>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.</p> <p>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).</p>
DEJ	<p>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.</p>
Epidermis layers	
Stratum corneum (skin surface)	<p>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.</p>
Stratum granulosum	<p>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.</p>
Stratum spinosum	<p>Located 20-100 μm below the stratum corneum and composed of 15- to 25-μm cells with bright cytoplasm and dark oval-round nuclei.</p>
Basal layer	<p>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.</p>
Hair	
Hair follicle	<p>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.</p>
Hair shaft	<p>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).</p>
Honeycomb pattern	<p>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.</p>
Skin fold (dermatoglyph)	<p>Nonrefractile (dark) linear furrows separating "islands" of keratinocytes</p>

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

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 hyporeflective 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.

Apêndice

Reflectance confocal microscopy as a new tool in the *in vivo* evaluation of desquamative gingivitis: patterns in mucous membrane pemphigoid, pemphigus vulgaris and oral lichen planus

S.S. Alessi,¹ M.M.S. Nico,¹ J.D. Fernandes² and S.V. Lourenço³

¹Department of Dermatology, Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

²Department of Dermatology, Medical School, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil

³Department of General Pathology, Dental School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Summary

Correspondence

Marcello Menta Simonsen Nico.
E-mail: mentanico@hotmail.com

Accepted for publication

20 August 2012

Funding sources

The work was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP grant 09/52915-7.

Conflicts of interests

None declared.

DOI 10.1111/bjd.12021

Background Desquamative gingivitis refers to a clinical manifestation associated with several mucocutaneous disorders. The most common are mucous membrane pemphigoid, pemphigus vulgaris and lichen planus. Their specific diagnosis is better established by histopathological and immunofluorescence evaluation.

Objectives To examine cases of desquamative gingivitis using reflectance confocal microscopy (RCM) and compare the findings with those of normal gingiva. To compare RCM findings in desquamative gingivitis with conventional histopathology of the biopsied lesions, in order to establish criteria for this noninvasive diagnostic technique.

Methods A total of 25 cases of suspected mucous membrane pemphigoid, pemphigus vulgaris and lichen planus were included. RCM was performed on the gingiva of a healthy person and on gingival lesions. All lesions were biopsied in order to perform a RCM–histopathological correlation.

Results Reflectance confocal microscopy examination of the gingival lesions suspected to be mucous membrane pemphigoid revealed a separation at the level of the dermal–epidermal junction, filled with small, bright structures interpreted as blood cells. Histopathological and immunofluorescence findings confirmed the diagnosis. For pemphigus vulgaris, RCM features were intraepithelial clefts with round, detached cells interpreted as acantholytic keratinocytes, similar to the histopathological features. Hyperkeratosis and spongiosis associated with infiltration of inflammatory cells, seen as small, bright cells intermingling with the honeycomb keratinocyte epithelial structure, were seen in lichen planus. Mildly bright, round structures interpreted as necrotic keratinocytes and mildly bright, stellate structures, interpreted as melanophages, were also seen in the dermis. These features were present on histopathology, confirming the diagnosis of lichen planus.

Conclusion We propose that RCM is a useful tool to help distinguish between the three most common causes of desquamative gingivitis.

The human gingiva is composed of squamous stratified epithelium covering a lamina propria/dermis attached to the underlying bone. Several diseases can affect the gingival epithelium, including autoimmune diseases, represented most commonly by mucous membrane pemphigoid (MMP), pemphigus vulgaris (PV) and lichen planus (LP). The gold standard procedure for diagnosing these conditions consists of histopathological and immunofluorescence studies.

The term desquamative gingivitis (DG) denotes a clinical condition of erythema, desquamation, erosion and occasional blistering of the attached and marginal gingiva. DG is not a definitive diagnosis, but a manifestation most often of MMP, PV or LP, which can share these clinical features in a certain phase of their clinical evolution, despite their heterogeneous pathogenesis. DG varies from involvement of restricted areas of the gingiva (usually in the early phases of the disease) to

Fig 1. (a) A reflectance confocal microscopy examination. (b) Clinical picture of desquamative gingivitis.

widespread compromise of gingival structures.^{1–5} At times the gingival lesions are the only manifestation of these processes, making clinical differential diagnosis a challenge.^{6–8}

In recent years, reflectance confocal microscopy (RCM) has been employed as a tool for the 'in vivo' characterization of various skin diseases, mostly melanocytic naevi and melanoma.

Table 1 Details of the cases with mucous membrane pemphigoid (MMP), pemphigus vulgaris (PV) and lichen planus (LP)

Case	Sex, age (years)	Main RCM features ^a		
		MMP	PV	LP
1	F, 82	+	–	–
2	F, 66	+	–	–
3	F, 74	+	–	–
4	F, 62	+	–	–
5	F, 72	+	–	–
6	F, 47	+	–	–
7	F, 80	+	–	–
8	M, 63	+	–	–
9	F, 46	–	+	–
10	F, 35	–	+	–
11	F, 46	–	+	–
12	M, 51	–	+	–
13	M, 39	–	+	–
14	F, 27	–	+	–
15	M, 51	–	+	–
16	M, 43	–	+	–
17	F, 21	–	+	–
18	M, 48	–	+	–
19	F, 21	–	+	–
20	F, 28	–	+	–
21	F, 57	–	–	+ ^b
22	F, 43	–	–	+ ^c
23	F, 46	–	–	+ ^c
24	F, 42	–	–	+ ^d
25	F, 45	–	–	+ ^b

RCM, reflectance confocal microscopy; +, positive; –, negative. ^aMain RCM features. MMP: subepithelial cleft formation with haemorrhagic exudate – dark spaces between the epidermis–dermis junction, usually filled with round small bright cells; dilated blood vessels and inflammatory cells – prominent round or linear dark structures within the dermis. Blood flow within these structures could be observed; on images they are filled with highly refractive peripheral blood cells. PV: disconnected pattern of granular and spinous layer (clefts) – dark spaces within the epithelium, corresponding to bullae, filled with acantholytic and inflammatory cells; acantholytic cells – weakly refractive round or ovoid cells with central or eccentric nucleus, often arranged in clusters, forming irregular, polygonal structures; inflammatory cells – highly refractive round cells; dilated blood vessels – prominent round or linear dark structures within the dermis. Blood flow within these structures could be observed; on images they are filled with highly refractive peripheral blood. LP: ^bspinous layer disarray (spongiosis), blurred basal keratinocyte layer and basement membrane zone; bright small cells intermingling with keratinocytes (lymphocytes); bright dendritic cells at epithelial/connective tissue interface; dilated blood vessels; bright large and small cells in the dermis (melanophages and inflammatory cells). ^cBright keratinocytes at the superficial epithelial layers (hyperkeratosis); blurred basal keratinocyte layer and basement membrane zone; bright small cells intermingling with keratinocytes (lymphocytes); bright dendritic cells at epithelial/connective tissue interface; dilated blood vessels; bright large and small cells in the dermis (melanophages and inflammatory cells). ^dBlurred superficial areas associated with a filamentous material (areas of erosion); in the dermis, bright round cells (inflammatory) and dendritic cells were seen; numerous small blood vessels were present.

Reflectance confocal microscopy provides images with resolution at the cellular level using a noninvasive technique that allows visualization of the epidermis/mucosa up to superficial levels of the dermis; these images have a resolution close to conventional histopathology.⁹ More recently, features of several inflammatory skin diseases, especially blistering diseases and interface dermatitis have been described, demonstrating an excellent agreement with conventional histopathology.^{10,11} RCM has not yet been used in the study of DG.

In the present study, we compared the RCM images of normal gingiva with those from 25 cases of DG caused by MMP, PV and LP. We also correlated RCM features with those found on clinical, histopathological and direct immunofluorescence (DIF) examination in order to evaluate if RCM could be an additional alternative method for the specific diagnosis of DG.

Patients and methods

Twenty-five patients with clinical features of DG were prospectively included in the study after signing informed consent. One healthy volunteer with normal gingiva was included in the study for comparison with the RCM images.

The gingival lesions of all the patients were examined using a commercially available RCM system for *in vivo* imaging (Vivascope 3000; Lucid Inc., Rochester, NY, U.S.A.). Briefly,

this instrument operates with near-infrared illumination using a diode laser at 830 nm operating at a power of 14 mW at the tissue level. The gingival contact device consists of a metal tissue ring with a coverglass window. An objective lens of numerical aperture 0.9 is attached to the tissue ring after the application of ultrasound gel between the objective lens and the coverglass window. The RCM acquires horizontal images at a $500 \times 500 \mu\text{m}$ field of view, equivalent to about 30 $\times$ magnification, with a resolution of 1000×1000 pixels. Serial horizontal optical sequential sections of mucosa were obtained, from the corneal layers to the superficial reticular dermis, at intervals of 4–5 μm up to 300 μm deep.¹² An RCM examination is shown in Figure 1.

The RCM images obtained from the examined lesions were analysed by two independent pathologists. The following criteria were evaluated: integrity of all epithelium layers; presence or absence of epithelial clefts or acantholytic cells, and inflammatory cells within the epithelium and in the dermis; presence of melanophages and dendritic cells; presence of dilated blood vessels.

For histopathological examination, a 4-mm punch biopsy was taken from the lesion area previously examined with RCM. Biopsy specimens were fixed in phosphate-buffered neutral formalin, embedded in paraffin and stained with haematoxylin and eosin. An additional fragment of each gingival lesion was kept fresh and processed for DIF examination.

Fig 2. Reflectance confocal microscopy (RCM) images of normal healthy gingiva. (a–c) RCM images of the superficial mucosal epithelium with regular keratinocytes arranged in a honeycomb pattern. The spaces between the keratinocytes are regular, seen as bright contours around each cell. Basal cells around the dermal papillae are more reflective and surround the darker areas representative of the papillary dermis. (d–f) Dermal aspects examined using RCM, showing a dark layer of tissue with faint images of the superficial layers of the epithelium, mainly in (d) and (e). The deeper aspects of the dermis are dark without evidence of inflammatory bright cells.

Results

Details of the 25 patients are given in Table 1. All 25 patients presented clinical characteristics of DG (Fig. 1b). Clinical examination revealed multiple, painful, gingival erosions and some degree of epithelial detachment in all cases. In addition, intact haemorrhagic blisters were occasionally observed in cases 1–7.

The healthy individual was a 30-year-old Afro-Brazilian man with regular, normal gingival tissue. RCM findings of the normal gingival tissue comprised keratinocytes in a honeycomb architecture, surrounded by regular, bright outlines. Regular, polygonal, medium-sized keratinocytes were observed and interpreted as the spinous layer of the gingival epithelium. In the normal gingival epithelium, a granular layer was not detected. Darker areas representative of the connective tissue (dermis) were surrounded by large, basal keratinocytes with a bright aspect and well-defined limits and shape. There was no evidence of bright inflammatory cells in the connective tissue layers (Fig. 2).

Findings of confocal reflectance microscopy, histopathology and direct immunofluorescence

Reflectance confocal microscopy examination of the gingival lesions revealed a wide cleft at the level of the dermal–epider-

mal junction in cases 1–8. This cleft was identified as a dark space filled with small, bright structures interpreted as inflammatory and haemorrhagic exudate. In six cases, dilated blood vessels were seen in the dermis. These features are described in Table 2 and illustrated in Figure 3. Histopathological aspects of the biopsied area showed a linear cleft filled with haemorrhagic exudate at the level of the dermal–epidermal junction area. In the dermis, inflammatory infiltrates with scattered eosinophils were also observed. DIF showed linear deposits of IgG and C3 along the dermal–epidermal junction. These features corresponded to the diagnosis of MMP.

In cases 9–20, RCM examination revealed a disarranged spinous layer with wide intercellular spaces. In all 12 cases, an intraepithelial cleft was present, associated with round, detached cells interpreted as acantholytic keratinocytes. The deep aspect of the epithelium (basal layer) was preserved and a keratinocyte rim could be clearly seen surrounding the dermal papilla. Within the dermis, inflammatory cells and horizontally oriented dilated blood vessels were recognized. These features are detailed in Table 2 and illustrated in Figure 4. Histopathological study of the biopsied lesions revealed suprabasal acantholysis, and DIF demonstrated intercellular deposits of IgG. These features confirmed the diagnosis of PV.

In cases 21–25, RCM analysis showed an abnormal cornified layer and a recognizable granular layer; these features

Table 2 Reflectance confocal microscopy (RCM) and histological features of mucous membrane pemphigoid, pemphigus vulgaris and lichen planus

	RCM features	Histopathological criteria
Mucous membrane pemphigoid	Separation at the level of basement membrane area, represented by dark spaces, seen from the epithelial layers, surrounding papillary dermis	Linear cleft at the level of basement membrane area
	Dark space filled with small bright structures, that are round-to-polygonal, highly refractive cells, smaller in size than melanophages and keratinocytes	Subepithelial cleft filled with haemorrhagic and inflammatory exudate
Pemphigus vulgaris	Intraepithelial cleft	Suprabasal acantholysis
	Round detached cells inside the intraepithelial cleft	Acantholytic keratinocytes
	Prominent round or linear dark canalicular structures that appear horizontally oriented in the upper dermis	Dilated vessels
Lichen planus	Round-to-polygonal, mildly refractive cells, smaller in size than melanophages and keratinocytes, in the dermis	Inflammatory cells in epithelial cover and dermis
	Focal areas of brightness at the epithelial layers	Hyperkeratosis
	Partial to complete loss of the normal honeycombed pattern and broadened intercellular connections	Mucosal disarray
	Darker areas relative to the surrounding epithelium with intercellular spaces between keratinocytes larger than normal	Spongiosis
	Mildly bright, polygonal structures, larger than the surrounding keratinocytes, seen as single cells at the epithelium	Necrotic keratinocytes
	Round-to-polygonal bright structures in the context of epithelial disarray and spongiosis	Mucosal inflammatory cells infiltration
	Presence of inflammatory and bright dendritic cells within the epidermal–dermal junction. Papillary rims are obscured by the presence of a diffuse inflammatory cell infiltrate, almost completely involving the junction, with total or partial obliteration of the ring-like structures around papillae that appear ‘nonedged’ and ‘non-rimmed’	Interface lichenoid infiltrate
	Brightly refractive, plump, oval to stellate-shaped cells recognizable within the inflammatory infiltrates in the lamina propria	Melanophages in dermis
	Round-to-polygonal, mildly refractive cells, smaller in size than melanophages seen at papillary dermis	Inflammatory cell infiltration

Fig 3. Reflectance confocal microscopy (RCM) images and histopathology of desquamative gingivitis due to mucous membrane pemphigoid (MMP). (a–c) RCM images of the superficial mucosal epithelium with keratinocytes arranged in a honeycomb pattern. In focal areas a dark space can be observed, interpreted as a separation of epithelium cover in focal areas close to the dermal papillae (arrows and circle). (d–f) RCM images showing dark spaces at the deep aspect of the epithelial cover (region of basement membrane) filled with mildly bright round structures, interpreted as subepithelial cleft filled with haemorrhagic and inflammatory exudate (arrows). (g, h) Histopathology of MMP showing a wide separation between the mucosal epithelium and dermis (g), filled with haemorrhagic infiltrate (h); haematoxylin and eosin staining; original magnification: (g) $\times 200$; (h) $\times 400$.

were seen as intensely bright areas at a superficial level of the epithelium. A focal spinous layer disarray seen as mildly bright spaces between keratinocytes was observed; this feature was associated with infiltration of inflammatory cells seen as small, bright cells intermingling with the honeycomb keratinocyte epithelial structure. Necrotic keratinocytes were visualized as isolated bright, polygonal structures, usually larger than the surrounding keratinocytes, without a visible nucleus. The epithelial interface with the dermis was difficult to visualize and the ring-like structures around formed by the basal keratinocytes appeared 'non-edged' and 'non-rimmed'. At the level of the dermal–epidermal junction, inflammatory cells

were detected as sheets of bright, small cells. Papillary rims were obscured by the presence of a diffuse inflammatory cell infiltrate, mostly assembled in sheet-like structures that surrounded the junction almost completely. Melanophages, visible as brightly refractive, plump, oval to stellate-shaped cells, were recognizable within the inflammatory infiltrate. Horizontally oriented, dilated vessels were also visualized in the dermis. These features are detailed in Table 2 and illustrated in Figure 5. Histopathological features of the biopsied lesion revealed hyperkeratosis, irregular acanthosis, spongiosis and wide, erosive areas. Apoptotic keratinocytes were frequently observed. In the dermis, a lichenoid inflammatory infiltrate

Fig 4. Reflectance confocal microscopy (RCM) images and histopathology of desquamative gingivitis due to pemphigus vulgaris (PV). (a) RCM image of a gingival lesion showing a superficial honeycombed pattern of keratinocytes infiltrated with rare middle-bright structures, interpreted as inflammatory cells (arrow). In the deeper aspects of the epithelial cover, disarray between keratinocyte layers with dark spaces can be observed (circle). (b–e) RCM image of a gingival lesion showing intraepithelial cleft represented by dark spaces between keratinocyte layers (circle) with a closer aspect of acantholytic keratinocytes (arrows); note in (d) a closer cropped detail of acantholytic cell area (circle). (f) RCM image of a gingival lesion showing dilated vessels horizontally oriented (arrow) in the dermal papillae and deeper aspects of intraepithelial clefts (circle). (g, h) Histopathological features of PV showing an intraepithelial cleft at the suprabasal epithelial layer (g) with acantholytic keratinocytes (g, h); haematoxylin and eosin staining; original magnification: (g) $\times 100$; (h) $\times 400$.

with the presence of melanophages could be observed. DIF examination revealed scattered cells positive for IgM. These features confirmed the diagnosis of LP.

Discussion

Diagnosis of DG-associated disorders requires clinical, laboratory and histopathological procedures.⁶ However, in some instances, a rapid noninvasive, in-office method ancillary to the clinical evaluation may be useful in cases where it is difficult to perform a surgical biopsy, or in cases in which the patient's general condition confers risks with an invasive procedure.

In the present study, RCM, a noninvasive technique that provides high-resolution imaging of the skin and mucosa, delivered images that showed an interesting correlation with the classical histopathological findings of the three main diseases that present as DG, as each type presented characteristic patterns on RCM. Other authors have shown that the RCM method can be useful for diagnosing skin lesions in PV,^{11,12} but, to our knowledge, there are no other studies that have investigated the method in DG for differentiating MMP, PV and LP lesions.

In MMP, a dark area just between the epithelium and the dermal–epidermal junction obscured the interface with the

Fig 5. Reflectance confocal microscopy (RCM) images and histopathological features of desquamative gingivitis (DG) due to lichen planus (LP). (a1, a2) RCM images of DG showing focal superficial areas (parakeratotic layer) of hyperkeratosis represented by intense brightness (black arrows, a1) and areas with bright spaces between keratinocytes with partial loss of honeycomb pattern, interpreted as spongiosis and erosion (white arrows, a2). (b) Epithelial atrophic areas (at 12.6 μm depth) (circle) with dermis visualization at a superficial level of the examination, intermingled with bright acanthotic areas. (c) Bright round structures close to the epidermal–dermal junction, interpreted as inflammatory cells (arrows). (d) Inflammatory cells within the epithelium (arrows) and blood vessels in the dermal papillae (circle). (e, f) Inflammatory cells and melanophages at the epidermal–dermal junction, involving the junction and obliterating the ring-like structure around superficial dermal papillae (circled areas); note in (e) the presence of many dendritic cells at the epidermal–dermal junction (circle). (g, h) Histopathological features of LP showing an interface mucositis with hyperkeratosis, irregular acanthosis and a band-like lymphocytic infiltrate in the dermis (g); numerous apoptotic bodies associated with lymphocytic exocytosis and melanophages in the dermal papillae (h1 and h2); haematoxylin and eosin staining; original magnification: (g) $\times 100$; (h1, h2) $\times 400$.

dermis. This area, filled with a haemorrhagic exudate, corresponded not only with the histopathological features of MMP but also with the clinical aspect of haemorrhagic bullae seen in some of our patients.

In cases of PV, the finding of acantholytic keratinocytes is critical to establishing the diagnosis of the disease using RCM. This is particularly important as the gingival aspects of PV often show widespread erosions without intact blisters. Acan-

tholytic keratinocytes are easy to detect using the RCM technique and may be found not only in PV blisters, but also in areas of the interface between an eroded and apparently intact gingival mucosal. Other authors also found this feature when examining skin lesions of PV.¹² Additionally, RCM examination in cases of PV is useful during the selection of an area to be biopsied, as it is not unusual for specimens to be taken from areas that do not offer enough material for diagnosis of

the condition; the examination is also useful in follow-up of patients, as some resistant lesions, especially in gingival tissue, may persist even after immunosuppressive therapy and may be mistaken for periodontal disease.

In cases of LP, the findings were varied and were not homogeneously found in all cases (see Table 1). The most characteristic criterion was the presence of basal keratinocyte rims around dermal papillae obscured by the presence of inflammatory cells, arranged in sheet-like structures that surrounded the junction. These features have also been described for skin lesions of LP.¹⁰ The RCM images from the superficial mucosal layers showed an increased granular layer; this layer is absent or very discreet in normal gingiva. Granular keratinocytes have been described using RCM as polygonal keratinocytes with bright cytoplasm, larger than spinous cells, arranged in a honeycombed architecture.¹²

In LP, we also found variable degrees of mucosal disarray, as well as intercellular dark, large spaces (spongiosis) and inflammatory cell infiltration of the gingival mucosa. A characteristic feature was the presence of isolated, bright, poorly delimited keratinocytes at the level of the spinous layer, and as aggregates in the suprabasal layer, which corresponds with Civatte bodies on histopathology. When visualized using RCM, they appeared as uniformly bright, polygonal structures, usually larger than the surrounding keratinocytes, without visible nuclei, which seem to lean on the neighbouring epithelium. Mucosal inflammatory cells appeared as round-to-polygonal, mildly refractive cells, smaller in size than melanophages. Scattered, bright dendritic cells were also detected in the dermis. Other authors observed similar features for skin lesions in LP.¹⁰ Bright dendritic cells may be interpreted, in cases of LP, as melanophages or Langerhans cells. However, in melanocytic lesions, these structures cannot be distinguished with certainty between Langerhans cells and melanocytes as reported by other authors.¹³ The lesson from this difficulty is that diagnosis and image interpretation must be associated with clinical and histopathological features of the disease.

In conclusion, RCM revealed features that seemed to parallel histopathology and which allowed differentiation between normal gingiva, MMP, PV and LP. On the basis of our study, there is strong evidence that specific morphological criteria are present in each condition, and that RCM can be a useful tool for detecting these features (see Table 1).

Further research may be required to determine additional RCM criteria for these diseases and to establish if this method will prove useful enough in the diagnosis and follow-up of gingival disease when compared with conventional histopathology.

What's already known about this topic?

- Reflectance confocal microscopy (RCM) is beginning to be studied in inflammatory and blistering skin diseases. However, use of this method has not been studied in the mucosal manifestations of such diseases.

- Desquamative gingivitis is a peculiar clinical manifestation of pemphigus vulgaris, mucous membrane pemphigoid and lichen planus that presents difficulties in diagnosis.

What does this study add?

- This study is the first to show RCM images of gingival lesions.
- Our findings correlated closely with the histopathological findings of pemphigus vulgaris, mucous membrane pemphigoid and lichen planus.

References

- 1 Prinz H. Chronic diffuse desquamative gingivitis. *Dental Cosmos* 1932; **74**:331–3.
- 2 Vaillant L, Chauchaix-Barthes S, Huttenberger B *et al.* Le syndrome, gingivite érosive chronique étude rétrospective de 33 cas. *Ann Dermatol Venerol* 2000; **127**:381–7.
- 3 McCarthy M, McCarthy PL, Shklar G. Chronic desquamative gingivitis: a reconsideration. *Oral Surg* 1960; **13**:1300–13.
- 4 Lo Russo L, Fierro G, Guiglia R *et al.* Epidemiology of desquamative gingivitis: evaluation of 125 patients and review of literature. *Int J Dermatol* 2009; **48**:1049–52.
- 5 Vaillant L, Fontes V. Gingivite érosive chronique. *Ann Dermatol Venerol* 2002; **129**:79–80.
- 6 Lo Russo L, Fedele S, Guiglia R *et al.* Diagnostic pathways and clinical significance of desquamative gingivitis. *J Periodontol* 2008; **79**: 4–24.
- 7 Gagari E, Damoulis PD. Desquamative gingivitis as a manifestation of chronic mucocutaneous disease. *J Dtsch Dermatol Ges* 2011; **3**: 184–7.
- 8 Ricotti C, Kowalczyk J, Fernandez A *et al.* Mucosal 'peeling' biopsy technique for the immunopathologic evaluation of desquamative gingivitis-associated mucous membrane pemphigoid. *Arch Dermatol* 2008; **144**:1538.
- 9 Rajadhyaksha M, Gonzalez S, Zavislan JM *et al.* In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin II: advances in instrumentation and comparison with histology. *J Invest Dermatol* 1999; **113**:293–303.
- 10 Moscarella E, González S, Agozzino M *et al.* Pilot study on reflectance confocal microscopy imaging of lichen planus: a real-time, non-invasive aid for clinical diagnosis. *J Eur Acad Dermatol Venerol* 2012; **26**:1258–65.
- 11 Kurzeja M, Rakowska A, Rudnicka L *et al.* Criteria for diagnosing pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus by reflectance confocal microscopy. *Skin Res Technol* 2012; **18**:339–46.
- 12 Calzavara-Pinton P, Longo C, Venturini M *et al.* Reflectance confocal microscopy for in vivo skin imaging. *Photochem Photobiol* 2008; **84**:1421–30.
- 13 Hasehemi P, Pulitzer MP, Scope A *et al.* Langerhans cells and melanocytes share similar morphologic features under in vivo reflectance confocal microscopy: a challenge for melanoma diagnosis. *J Am Acad Dermatol* 2012; **66**:452–62.