

Contribuição da microscopia confocal *in vivo* para o diagnóstico e *follow-up* de neoplasias conjuntivais intraepiteliais

Luisa Vieira¹, Manuela Martins², Arnaldo Santos³, Rita Anjos³, Vitor Maduro⁴

Serviço de Oftalmologia – Centro Hospitalar Lisboa Central (CHLC)

¹Interno do Complementar de Oftalmologia do CHLC e do HDES

²Assistente Hospitalar Graduada de Anatomia Patológica do CHCL

³Interno do Complementar de Oftalmologia do CHLC

⁴Assistente Hospitalar de Oftalmologia do CHLC

RESUMO

Objectivo: Analisar o contributo da microscopia confocal *in vivo* para o diagnóstico e *follow-up* de neoplasias conjuntivais intraepiteliais.

Métodos: Avaliámos 5 doentes com neoplasia conjuntival intraepitelial unilateral com o *Heidelberg Retina Tomograph II*, *Rostock Cornea Module*. Três doentes foram submetidos a excisão com crioterapia adjuvante, um doente a excisão com crioterapia adjuvante e ciclos de IFN- α 2b e um doente a excisão simples e ciclos de IFN- α 2b. As imagens de microscopia confocal foram comparadas com a histologia das mesmas lesões. O *follow-up* clínico, através de fotografias do segmento anterior, foi comparado com os achados da microscopia confocal.

Resultados: Três dos doentes foram identificados histologicamente como neoplasia intraepitelial de alto grau e dois como carcinoma *in situ*. As características histológicas descritas correlacionam-se bem com as visíveis à microscopia confocal: alteração da estrutura do epitélio com acantose, disqueratose, pleomorfismo celular, aumento da refletibilidade celular e nuclear, com relação núcleo/citoplasma aumentada e por vezes binucleação. A lesão é bem delimitada e os plexos nervosos sob a lesão não são visíveis. A microscopia confocal identificou 1 recidiva e demonstrou-se útil na monitorização da resposta ao tratamento.

Conclusão: A microscopia confocal *in vivo* pode ter um papel importante não só no diagnóstico inicial como também na deteção de recidivas e na avaliação da resposta ao tratamento, de uma forma minimamente invasiva.

INTRODUÇÃO

A neoplasia conjuntival intraepitelial (CIN) traduz uma lesão pavimentosa conjuntival e/ou corneana com características displásicas em parte (neoplasia intraepitelial de baixo e alto graus) ou em toda a espessura do epitélio (carcinoma *in situ*). É o tumor ocular primário mais frequente, estando descritos vários factores de risco: exposição prolongada à luz UV, exposição ao fumo do tabaco e a derivados do petróleo, infeção a papilomavirus (tipo 16 e 18), HIV,

HSV, xeroderma pigmentoso, ser portador de lentes de contato ou ter efetuado transplante de células estaminais^{3,8,9,12}.

O quadro clínico típico^{3,6,12} deste tipo de neoplasias é um doente com mais de 60 anos, do sexo masculino, com queixas de irritação ocular ou de tumefação e com uma lesão de localização interpalpebral e limbar de crescimento progressivo e lento e com um dos 3 padrões morfológicos: gelatinoso, papilomatoso ou leucoplásico. O diagnóstico diferencial destas lesões pré-malignas com lesões benignas e malignas por vezes não é fácil. A histologia é

considerada, por isso, o gold-standard para o diagnóstico^{2,9}. O tratamento clássico desta patologia é a excisão cirúrgica alargada com crioterapia adjuvante^{1,9,12}. A recidiva após a excisão cirúrgica ocorre mais frequentemente nos primeiros dois anos, variando a taxa, entre os estudos publicados, entre 5 a 53%^{8,12}, dependendo da existência ou não de margens livres. Em lesões de grande extensão e em recidivas, a excisão cirúrgica pode induzir insuficiência limbar e lesões cicatriciais da superfície ocular externa^{9,12}. Outras alternativas terapêuticas têm sido desenvolvidas, tanto para o tratamento primário (isolado ou adjuvante) como para o tratamento da recidiva. Recentemente os estudos têm evoluído na direção da terapêutica tópica, nomeadamente com Mitomicina C, 5-Fluorouracilo e Interferão $\alpha 2b$ (INF- $\alpha 2b$)^{1,7,9,11}. O tratamento com INF- $\alpha 2b$ tem-se demonstrado eficaz (taxa de recidiva de 3,7-12%), com efeitos adversos minor e que remetem com a cessação terapêutica^{9,12}. Recentemente foi também publicado um estudo sobre o tratamento primário destas lesões com INF- $\alpha 2b$ + ácido retinóico com resultados promissores⁷.

O seguimento é efetuado clinicamente com fotografias seriadas do segmento anterior.

A microscopia confocal permite a visualização *in vivo* de imagens de alta resolução e ampliação da superfície ocular, obtendo-se imagens *en face* a um nível *quasi*-histológico.

O objetivo deste estudo foi analisar o contributo da microscopia confocal *in vivo* para o diagnóstico e seguimento de neoplasias conjuntivais intraepiteliais.

MATERIAL E MÉTODOS

Realizou-se um estudo observacional de 5 doentes com neoplasia conjuntival intraepitelial unilateral seguidos em Consulta de Córnea e Transplantes do Centro Hospitalar Lisboa Central, Portugal.

A metodologia seguida na condução deste trabalho consistiu na análise demográfica e clínica deste grupo de doentes e ainda na avaliação por microscopia confocal e análise histológica das lesões córneo-conjuntivais.

A nível demográfico foram avaliadas as variáveis: idade, sexo e profissão.

A nível clínico as variáveis estudadas foram: localização anatômica do tumor, meridiano de localização, morfologia clínica e vascularização anómala. As fotografias do segmento anterior foram obtidas com a *Tagaki S10-15 CCD TV camera* adaptada na *Tagaki slitlamp microscopy SM-70*, com as ampliações de 10, 16 e 25X.

Ao nível da microscopia confocal foram estudadas as seguintes variáveis: acantose, paraqueratose, pleomorfismo

e densidade celulares, refletibilidade celular e nuclear, relação núcleo/citoplasma, limites da lesão e a presença de plexos nervosos sob a lesão. A microscopia confocal foi efetuada sempre pelo mesmo operador com o *Heidelberg Retina Tomograph II, Rostock Cornea Module*. O olho foi anestesiado com uma gota de oxibuprocaina a 0,4%. A objetiva foi imersa num gel oftálmico de carbómero 980 a 0,2% colocado num *cap* estéril de PMMA. O doente é sentado, colocando a região frontal e mentoniana nos apoios. O *cap* estéril é aplicado sobre a superfície ocular a analisar e o controlo x-y-z é feito manualmente, ajustando-se a localização do olho através de uma imagem em tempo real proveniente de uma câmara acoplada. As imagens são obtidas com ajuda de um pedal, cobrindo cada imagem 400 μ m x 400 μ m de área, com uma resolução óptica transversal de 2 μ m e longitudinal de 4 μ m. A fonte luminosa é um laser de diodo com comprimento de onda de 670nm.

A excisão cirúrgica foi realizada com margens de 4-5mm, com a técnica "no-touch" com posterior aplicação de crioterapia em todas as margens cirúrgicas. Em dois doentes foi necessário tratamento com INF- $\alpha 2b$ tópico, tendo-se utilizado a concentração de 3.000.000 U/ml, 1 aplicação 4x/dia até 1 mês após resolução clínica documentada por fotografia de segmento anterior e microscopia confocal.

O exame anátomo-patológico foi realizado com coloração hematoxilina-eosina com ampliações de 40x, 100x e 400x. As imagens *in vivo* e *ex vivo* foram comparadas.

O seguimento clínico foi realizado aos 1, 3 e 6 meses, com fotografias do segmento anterior. Os achados clínicos e os obtidos à microscopia confocal foram comparados.

RESULTADOS

Dados demográficos (tabela 1): Quatro doentes eram do sexo masculino (81, 81, 84 e 88 anos) e um do sexo feminino (64 anos). As profissões dos doentes eram: dois professores, um agricultor, um bibliotecário e um engenheiro. Não foi confirmado a presença de outros fatores de risco além da exposição prolongada à luz UV.

Tabela 1 | Dados demográficos dos doentes.

| Doente | Idade (anos) | Sexo | Profissão |
|--------|--------------|------|---------------|
| 1 | 84 | ♂ | Engenheiro |
| 2 | 64 | ♀ | Agricultor |
| 3 | 81 | ♂ | Professor |
| 4 | 88 | ♂ | Professor |
| 5 | 81 | ♂ | Bibliotecário |

Tabela 2 | Dados clínicos dos doentes.

| Doente | Olho | Localização | Meridiano | Aparência | Vascularização anômala | Terapêutica |
|--------|------|-------------|-------------|--------------|------------------------|--|
| 1 | D | CC | 9h | leucoplásico | sim | Cirurgia + crioterapia |
| 2 | D | CC | 7-12h | papilomatoso | sim | Cirurgia + crioterapia |
| 3 | D | CC | 1-5h | gelatinoso | sim | Cirurgia simples + IFN- α 2b (2 ^o tempo) |
| 4 | D | CC | 8-10h | leucoplásico | sim | Cirurgia + crioterapia |
| 5 | D | CC | 1-5h; 8-10h | gelatinoso | sim | Cirurgia + crioterapia + IFN- α 2b |

Dados clínicos (tabela 2): O olho afetado foi o direito e a localização do tumor foi córneo-conjuntival em todos os casos, havendo 2 com aspeto leucoplásico, 2 com aspecto gelatinoso e outro papilomatoso (figura 1). Três estavam localizados no lado temporal, um no lado nasal e um afetava o lado nasal e o lado temporal. Os doentes 1, 2, 4 e 5 foram encaminhados à consulta aquando da suspeita do diagnóstico e o terceiro doente após excisão simples de uma lesão conjuntival aparentemente benigna mas com diagnóstico histológico de CIN. Os doentes 1, 2 e 4 foram submetidos a excisão cirúrgica com crioterapia adjuvante, o terceiro iniciou ciclos de IFN- α 2b e o último doente foi submetido a excisão com crioterapia adjuvante e ciclos de IFN- α 2b.

Dados anátomo-patológicos (figura 2): Três dos doentes foram identificados como neoplasia intraepitelial de alto grau (1,3,4) e dois como carcinoma *in situ* (2,5). O exame anátomo-patológico da primeira lesão identificou alterações

displásicas na metade basal do epitélio, acantose, alteração da maturação, paraqueratose, disqueratose, pleomorfismo celular, mitoses, núcleos hiper cromáticos e irregulares, aumento da relação núcleo-citoplasma e nucléolos proeminentes. A membrana basal estava íntegra. Na terceira e quarta lesões os achados eram semelhantes à primeira, estando a displasia presente nos dois terços inferiores do epitélio, sem e com paraqueratose, respetivamente. Na segunda e quinta lesões as características eram semelhantes mas documentavam-se em toda a espessura do epitélio, com e sem paraqueratose respetivamente.

Dados à microscopia confocal: Nas neoplasias intraepiteliais de alto grau, a microscopia confocal (Figura 3) identificou um aumento da espessura do epitélio com grande desorganização da sua estrutura. Na camada basal, identificou vários pontos hiperrefletivos, dando um aspeto de céu estrelado. Na restante espessura do epitélio identificou

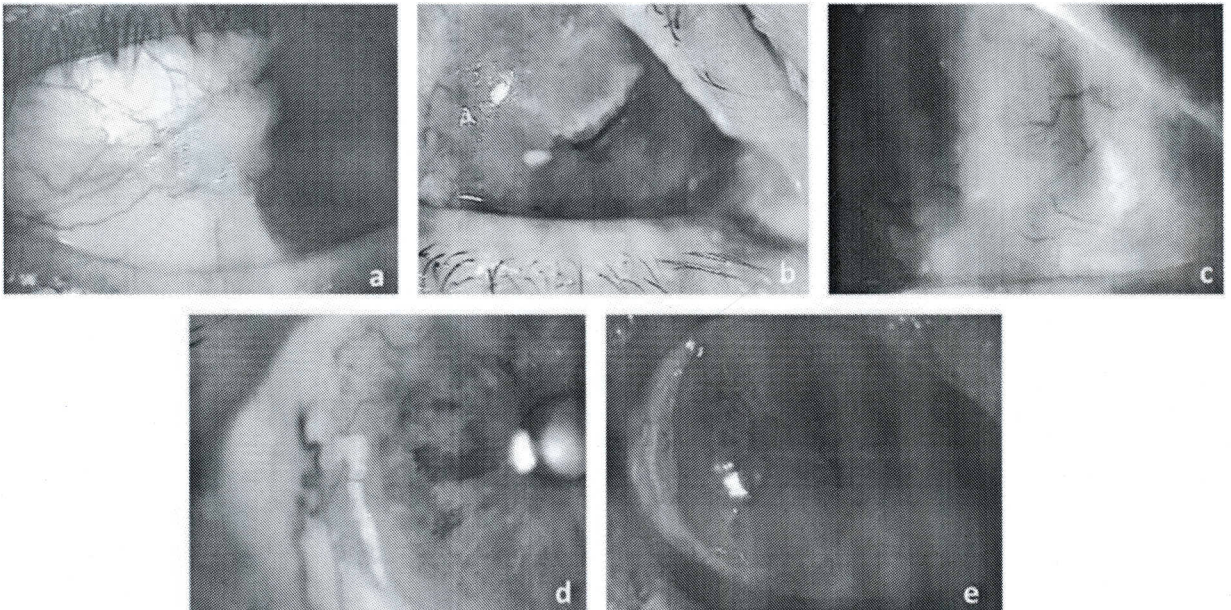


Fig. 1 | Aspeto clínico das lesões neoplásicas a) doente 1 b) doente 2 c) doente 3 d) doente 4 e) doente 5.

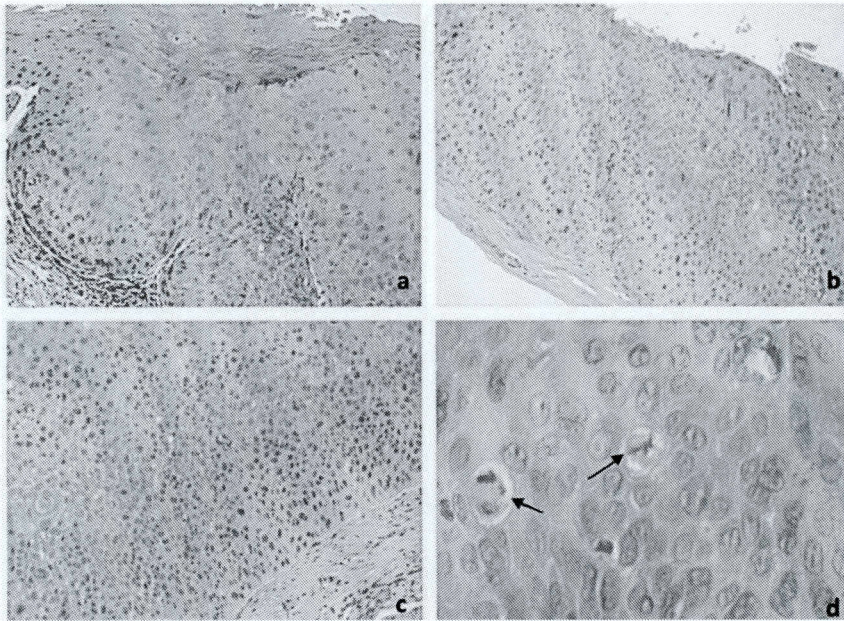


Fig. 2 | Exame anátomo-patológico: **a)** Neoplasia intraepitelial de alto grau (HE, 100X): acantose, atipia celular na metade basal do epitélio, queratose e paraqueratose **b)** Neoplasia intraepitelial de alto grau (HE, 100X): atipia citológica de quase toda a espessura do epitélio, com pleomorfismo celular, relação núcleo/citoplasma aumentada, núcleos hiper Cromáticos e irregulares e disqueratose. **c)** Carcinoma in situ (HE, 100X): observa-se membrana basal íntegra e displasia citológica com aumento da relação núcleo-citoplasma, hiper Cromasia nuclear, anisocariose e alguns nucléolos **d)** Carcinoma in situ (HE, 400X): relação núcleo/citoplasma aumentada, núcleos hiper Cromáticos e irregulares, nucléolos proeminentes e figuras de mitose (setas).

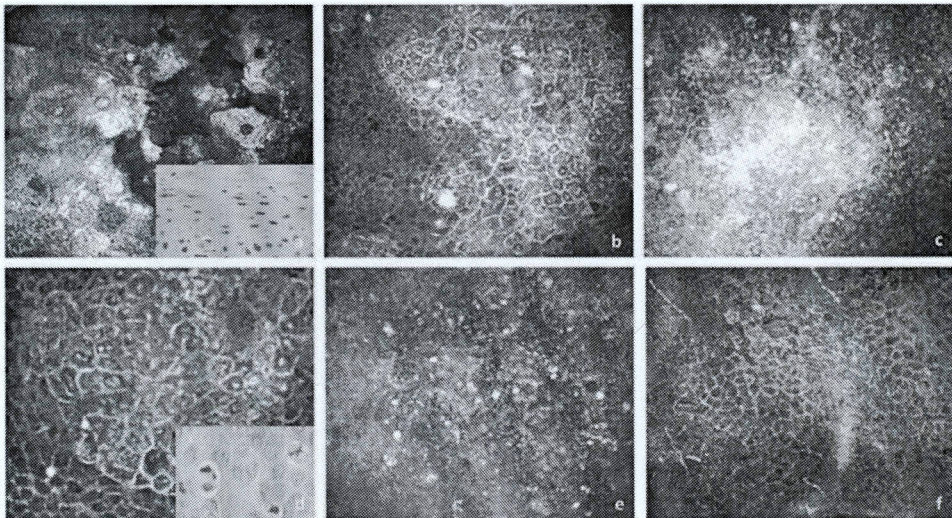


Fig. 3 | Alterações encontradas à microscopia confocal: **a)** placas hiperrefletivas à superfície do epitélio com provável relação com paraqueratose observada ao exame anátomo-patológico. **b)** Porção basal do epitélio: pleomorfismo celular evidente apesar de manterem em geral uma forma poligonal e limites bem definidos, células hiperrefletivas, com relação núcleo/citoplasma aumentada, núcleos hiperrefletivos. **c)** Epitélio mais superficial: alterações displásicas semelhantes a **b)** mas com limites pouco definidos. **d)** Epitélio displásico: núcleos duplos (seta) com provável relação com mitoses visíveis à anatomia patológica. **e)** Camada basal do epitélio (a 104µm da superfície): vários pontos hiperrefletivos, dando um aspeto de céu estrelado. **f)** Plexo nervoso subbasal não visível sob a lesão..

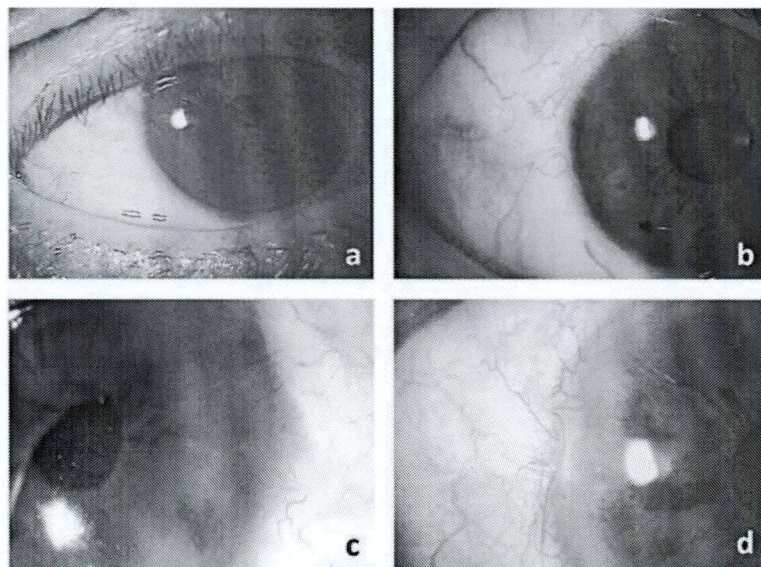


Fig. 4 | Aspecto clínico das lesões neoplásicas após tratamento a) doente 1 b) doente 2 c) doente 3 d) doente 4.

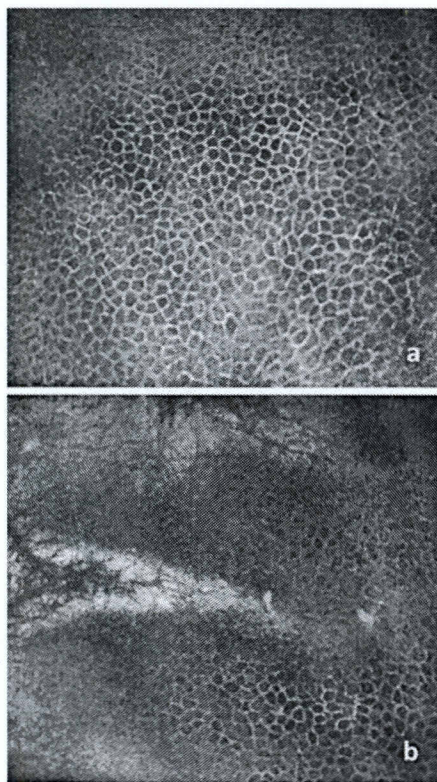


Fig. 5 | Alterações encontradas à microscopia confocal pós início de tratamento: a) reorganização do epitélio com diminuição do pleomorfismo e refletividade celular e nuclear b) aspecto semelhante a a) junto ao limbo.

pleomorfismo celular evidente apesar de manterem em geral uma forma poligonal e limites bem definidos, células hiperrefletivas, com relação núcleo/citoplasma aumentada, núcleos hiperrefletivos e por vezes duplos. Nos doentes limites laterais eram bem visíveis na profundidade da lesão, sendo a transição abrupta para o epitélio normal, ao passo que à superfície esses limites não foram tão evidentes. Os plexos nervosos sob a lesão são pouco visíveis. A densidade celular era de 3217 ± 165 células/mm² versus 6815 ± 284 células/mm² no epitélio normal.

As alterações do carcinoma *in situ* à microscopia confocal (Figura 3) diferiram das acima referidas por a desorganização estrutural ser ainda maior e a displasia estar presente em toda a espessura do epitélio. A densidade celular era de 3217 ± 123 células/mm² versus 5549 ± 261 células/mm² no epitélio normal.

Após o tratamento documentou-se, nos doentes 1 a 4, achados clínicos (Figura 4) sugestivos de remissão e à microscopia confocal, uma reorganização do epitélio

Tabela 3 | Meses de seguimento e estado atual dos doentes.

| Doente | Seguimento (meses) | Estado atual |
|--------|--------------------|---------------|
| 1 | 6 | Remissão |
| 2 | 6 | Recidiva |
| 3 | 9 | Remissão |
| 4 | 6 | Remissão |
| 5 | 2 | Em tratamento |

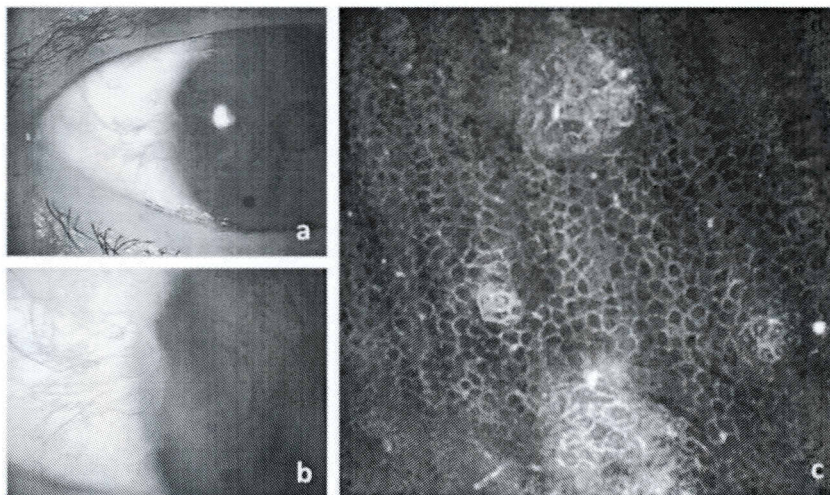


Fig. 6 | Seguimento do doente 2 aos 6 meses: a) e b) Aspecto clínico da lesão a recidivar c) alterações à microscopia confocal demonstrando focos de pleomorfismo e hiperrefletividade celulares, sugestivas de recidiva da neoplasia.

com diminuição do pleomorfismo e refletividade celular e nuclear em todas as camadas do epitélio (Figura 5). O doente 5 ainda se encontra em tratamento.

No seguimento destes doentes (tabela 3), o doente 2 apresentava um crescimento da conjuntiva sobre a córnea às 9h. A microscopia confocal identificou focos de pleomorfismo e hiperrefletividade celulares (Figura 6).

DISCUSSÃO

Relativamente à idade e ao sexo, os doentes deste estudo integram-se, em geral, no quadro clínico típico^{3,6,12} das CIN, doentes idosos e do sexo masculino. A doente 2 é do sexo feminino e é a mais nova, o que poderá estar relacionado com a exposição aumentada à luz UV inerente à sua profissão (agricultora). A localização interpalpebral dos tumores, com um dos 3 padrões morfológicos típicos em todos os doentes, vem também corroborar o descrito na literatura^{6,12}.

Nas características clínicas desta patologia, por vezes, o limite entre a benignidade, lesão pré-maligna e maligna, é ténue. Dada a importância do diagnóstico correto, precoce e de forma o menos invasiva possível das CIN, alguns estudos têm sido efetuados, nomeadamente com citologia de impressão¹³ ou UBM⁴. O mesmo surgiu com a microscopia confocal com a vantagem de ser um exame *quasi*-histológico, minimamente invasivo e com resultados imediatos e portanto com potencial para se correlacionar de forma mais fiável com o gold-standard do diagnóstico, a histologia.

No nosso estudo, os achados à microscopia

correlacionaram-se bem com os anátomo-patológicos, como *Alomar et al*², *Duchateau et al*³ e *Parrozzani et al*⁷ tinham descrito na literatura. A acantose, a alteração da estrutura do epitélio, o pleomorfismo celular, a relação núcleo-citoplasma aumentado são evidentes nas imagens de microscopia, conseguindo-se saber em que nível da espessura do epitélio existe lesão. Foi também visualizado os limites bem definidos da lesão na porção mais basal do epitélio, o que não foi tão evidente à superfície. Os plexos nervosos não visíveis sob a lesão neoplásica vem também ao encontro do descrito na literatura, tendo *Alomar et al*² sugerido a alta refletibilidade celular como a causa que inviabiliza a sua deteção. Todos os doentes cumpriram os 4 critérios diagnósticos de CIN propostos por *Alomar et al*² na microscopia confocal: pleomorfismo e polimegatismo celular associado a hiperrefletividade celular; limites da lesão bem definidos sendo a densidade celular da zona afetada cerca de metade da do epitélio saudável; identificação de vários pontos hiperrefletivos dando um aspeto de céu estrelado, na camada basal do epitélio; não visualização do plexo sub-basal sob a lesão. Apesar do estroma anterior e a camada de Bowman não apresentarem aparentemente alterações, foi difícil de assegurar pelas características inerentes a esta técnica que em toda a extensão da lesão não houvesse microinvasão. Assim, tal como *Duchateau et al*³ e *Hassani et al*⁵, questionamos a fiabilidade do diagnóstico diferencial através da microscopia confocal entre CIN e Carcinoma invasivo. No entanto, *Parrozzani et al*⁷ descreve em 2011, utilizando a microscopia confocal de não contato, uma boa correlação com a anátomo-patologia nos carcinomas pavimento-celulares invasivos.

Comparativamente ao gold-standard do diagnóstico, a contribuição da microscopia confocal nos CIN é limitada por depender da colaboração do doente, ser operador dependente, ter um baixo campo de visão (400x400µm), os cortes serem efetuados paralelamente à lesão e não perpendicularmente como na histologia e por a baixa transparência das lesões dificultar a visualização de estruturas mais profundas. É importante salientar que ainda não foi estudado, a possibilidade deste exame de contato ser veículo de transmissão de células neoplásicas para zonas sem alterações aquando da realização do mesmo.

No que diz respeito ao seguimento o interesse da microscopia confocal ainda se torna mais relevante. Esta permite documentar a resposta ao tratamento a nível *quasi*-histológico e assim realizar um ajuste terapêutico de forma dirigida a cada doente. Quando se pretende o diagnóstico precoce e seguro de recidiva com vista o início atempado do tratamento, a clínica pode não ser suficiente e a microscopia confocal torna-se um importante contributo para a avaliação do doente. No nosso estudo, o seguimento clínico da doente 2 documentou aos 6 meses uma lesão suspeita de recidiva. A microscopia confocal foi importante no diagnóstico diferencial, nomeadamente com a insuficiência limbar iatrogénica, identificando focos de displasia celular e condicionando de forma decisiva a terapêutica da doente.

Em conclusão, a microscopia confocal *in vivo* pode ter um papel importante não só no diagnóstico inicial como também na deteção precoce de recidivas e na avaliação da resposta ao tratamento, de uma forma minimamente invasiva. Estudos com maior amostragem e avanços tecnológicos poderão ser úteis no esclarecimento e melhoria das dificuldades ainda existentes.

BIBLIOGRAFIA

1. Al-Barrag A, Al-Shaer M, Al-Matary N, Al-Hamdani M. 5-Fluorouracil for the treatment of intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma of the conjunctiva, and cornea. *Clin Ophthalmol* 2010;4801-808.
2. Alomar TS, Nubile M, Lowe J, Dua HS. Corneal intraepithelial neoplasia: *in vivo* confocal microscopic study with histopathologic correlation. *Am J Ophthalmol* 2011;151:238-47.
3. Duchateau N, Hugol D, D'Hermies F, Meyer A, Labbé A, Dupas B et al Contribution of *in vivo* confocal microscopy to limbal tumor evaluation. *J Fr Ophthalmol* 2005; 28: 810-816.
4. Finger PT, Tran HV, Turbin RE, Perry HD, Abramson DH, Chin K, et al. High-frequency ultrasonographic evaluation of conjunctival intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. *Arch Ophthalmol* 2003;121:168-72.
5. Hassani RTJ, Brasnu E, Amar N, Gheck L, Labbé A, Sterkers M, et al. Apport de la microscopie confocale *in vivo* dans les formes invasives de néoplasie malpighienne de la surface oculaire: à propos d'un cas. *J Fr Ophtalmol* 2010;33: 163-168
6. Kanski, J. *Clinical ophthalmology: A systematic approach*. 7^a ed. Oxford: Butterworth-Heinemann. 2011
7. Krilis M, Tsang H, Coroneo M. Treatment of conjunctival and corneal epithelial neoplasia with retinoic acid and topical interferon alfa-2b: Long-term follow-up. *Ophthalmology* 2012; (article in press)
8. Parrozzani R, Lazzarini D, Dario A, Midena E. *In vivo* confocal microscopy of ocular surface squamous neoplasia. *Eye* 2011; 25:455-460
9. Peksayar G, Altan- yaycioglu R, Onal S. Excision and cryosurgery in the treatment of conjunctival malignant epithelial tumours. *Eye* 2003; 17: 228-232
10. Pérez de Arcelus M, Aranguren M, Andonegui J. Interferón alfa-2b tópico como primera opción en las neoplasias intraepiteliales corneconjuntivales. *An Sist Sanit Navar* 2012; 35: 137-141
11. Russel HC, Chadha V, Lockington D. Topical mitomycin C chemoerapy in the management of ocular surface neoplasia: a 10-year review of treatment outcomes and complications. *Br J Ophthalmol* 2010;94:1316-1321
12. Schechter BA, Koreishi AF, Karp CL, Feuer W. Long-term follow-up of conjunctival and corneal intraepithelial neoplasia treated with topical interferon alfa-2b. *Ophthalmology* 2008; 115: 1291-1296.
13. Tole DM, Mckelvie PA, Daniell M. Reliability of impression cytology for the diagnosis of ocular surface squamous neoplasia employins the biopore membrane. *Br J Ophthalmol* 2001;85:154-8

Não há conflitos de interesse relacionados com o tema apresentado.

Este artigo é original não tendo sido publicado previamente.

Os autores declaram a cedência dos direitos de autor à revista SPO