

Uso de la microscopia confocal de reflectancia en dermatología

Use of confocal reflectance microscopy in dermatology

Gabriel E. Salerni¹

RESUMEN

La microscopia confocal de reflectancia (MCR) es una herramienta de imágenes no invasiva que permite la visualización *in vivo* y en tiempo real de estructuras microscópicas de la epidermis, unión dermo-epidérmica y dermis superficial con una resolución cuasi histológica. Ha sido utilizada en la evaluación de lesiones benignas y malignas, demostrando un gran potencial para aplicaciones en investigación básica y en dermatología clínica. En el presente trabajo se revisan conceptos acerca del desarrollo y principios básicos del funcionamiento de la MCR, así como de sus aplicaciones en la práctica clínica (*Dermatol. Argent.*, 2011, 17(3): 230-235).

Palabras clave:

microscopia confocal de reflectancia, cáncer de piel, nevus, melanoma, diagnóstico no invasivo.

ABSTRACT

Reflectance confocal microscopy (RCM) is a noninvasive imaging tool that allows in-vivo and real-time visualization of microscopic structures of the epidermis, dermo-epidermal junction and superficial dermis with a quasi-histological resolution. It has been used in the evaluation of benign and malignant lesions, showing a great potential for applications in basic research and clinical dermatology. This paper reviews concepts about the development and basic principles of the RCM and its applications in clinical practice (*Dermatol. Argent.*, 2011, 17(3): 230-235).

Keywords:

reflectance confocal microscopy, skin cancer, nevus, melanoma, non-invasive imaging.

Fecha de recepción: 5/9/2010 | Fecha de aprobación: 21/10/2010

Los avances tecnológicos de las últimas décadas han impulsado la investigación y el desarrollo de herramientas de imagen que provean al médico de información que permita mejorar la capacidad diagnóstica y que sea útil en el manejo de los tumores cutáneos.

Consecuentemente, la dermatoscopia (microscopia de epiluminiscencia) fue introducida con éxito en la exploración rutinaria de la piel.¹ La dermatoscopia es una técnica no invasiva de examen *in vivo* que utiliza un sistema de magnificación con luz incidente, que posibilita el estudio detallado de las estructuras de la epidermis, la unión dermo-epidérmica y la dermis superficial no visibles a la exploración a ojo desnudo.² Actualmente tres metaanálisis reportan un incremento de la sensibilidad y especificidad en el diagnóstico dermatoscópico cercano al 30% respecto de la inspección visual.³⁻⁵

En los últimos años, nuevas tecnologías se han desarrollado con el objeto de mejorar la certeza diagnóstica y la evaluación prequirúrgica de los tumores cutáneos.⁶ Estas nuevas tecnologías incluyen: la microscopia confocal de reflectancia (MCR), la tomografía de coherencia óptica,⁷ la ecografía de alta frecuencia,⁸ la resonancia magnética⁹ y la espectrofotometría.¹⁰

El uso de la MCR como método no invasivo para la evaluación en tiempo real de lesiones cutáneas ofrece el máximo nivel de resolución. Dicha resolución se puede definir como cuasi histológica, y alcanza una resolución lateral inferior a 1 micra y una resolución vertical de 2 a 5 micras, similar a la resolución que se obtiene con la histología convencional.¹¹

¹ Médico dermatólogo

Servicio de Dermatología, Hospital Provincial del Centenario, Rosario, Santa Fe, República Argentina. Unidad de Melanoma, Servicio de Dermatología, Hospital Clínic, Barcelona, España

Correspondencia: Gabriel Salerni, Salta 1217, CP 2000, Rosario, Santa Fe, República Argentina. gabrielsalerni@hotmail.com

La MCR, al igual que la dermatoscopia, visualiza las lesiones en un plano horizontal, por lo tanto permite una correlación directa con las imágenes dermatoscópicas. En la actualidad se cuenta con un número creciente de estudios de correlación de microscopia confocal con dermatoscopia e histología convencional, lo que hace de la MCR una técnica muy útil para el diagnóstico y el manejo de los cánceres de piel.¹²⁻¹⁵

Comienzos y desarrollo

En 1957, Marvin Minsky, considerado uno de los padres de la ciencia de la computación y cofundador del laboratorio de inteligencia artificial del Instituto Tecnológico de Massachusetts, diseñó y patentó lo que sería el primer microscopio confocal.¹⁶ El instrumento inicial de Minsky escaneaba la pieza *ex vivo* a través del microscopio para formar una imagen.

En 1968, Petran diseñó un microscopio confocal en tándem para realizar secciones ópticas de tejido en tiempo real.¹⁷ Los experimentos iniciales en microscopia confocal eran realizados *ex vivo* y se utilizaban lámparas de mercurio.

La tecnología no fue aplicada en tejidos vivos hasta los años 80, con los adelantos en fuentes de luz, escáneres y tecnología computarizada. A comienzos de la década del 90 se inició la investigación en la visualización *in vivo* de la ultraestructura de piel humana.¹⁸

En 1995, Rajadhyaksha y colaboradores¹⁹ diseñaron un microscopio confocal con fuente de luz láser, lo que aportaba un alto poder de iluminación y longitudes de onda de mayor penetración, lo que hizo que se consiguiese una mejor capacidad de imagen. Asimismo, reportaron que la melanina proveía un fuerte contraste, y sugirieron, ya en aquel momento, que la microscopia confocal se presentaba a los dermatólogos como una herramienta diagnóstica instantánea y completamente no invasiva en comparación con la histología convencional.

Hacia finales de los años 90, este mismo grupo de trabajo reportó avances en instrumentación y metodología en microscopia confocal, un rango óptimo de parámetros, imágenes mejoradas de la piel humana normal y correlación de las imágenes de microscopia confocal con histología.¹¹

Principios básicos

La microscopia confocal utiliza un sistema láser de muy baja potencia (longitud de onda cercana al espectro infrarrojo), el cual es enfocado en un determinado punto de la piel o una lesión en estudio. De forma similar a la ecografía, aunque con luz en lugar de ultrasonidos, el microscopio confocal detecta la luz, que es reflejada por un plano microscópico que ocuparía un grosor inferior a 5 micras, y rechaza la luz que proviene de todos los demás planos que no están en foco (foto 1). Este haz es dirigido horizontalmente en una cuadrícula de 2 dimensiones para obtener secciones microscópicas.²⁰

Una limitación de la MCR es su profundidad, debido a la limitada penetración de la luz infrarroja a través de la piel, la que llega a un máximo de 250 a 350 micras; aun así, es suficiente para permitir una correcta evaluación de la epidermis, dermis papilar y dermis reticular superficial. También pueden realizarse ajustes en la distancia focal del haz, lo que permite que el microscopio realice una serie de planos horizontales alineados verticalmente con un grosor axial de 2 a 5 micras. El grosor de esta sección axial *in vivo* se correlaciona estrechamente con el grosor axial de los cortes histológicos en el estudio anatomopatológico.

El contraste en las imágenes de MCR se basa en las diferencias en la refractilidad de las estructuras tisulares. La melanina en el citoplasma o melanosomas es altamente reflectante, volviendo a las lesiones melanocíticas adecuadas para la evaluación con MCR.^{19,21}

A diferencia del estudio histológico, la evaluación con MCR preserva la arquitectura natural de los tejidos, incluyendo la hidratación celular, la tonicidad y el contraste natural de las estructuras, y permite la evaluación detallada en el mismo tejido a través del tiempo. Cuando se visualiza el tejido en tiempo real, se pueden observar procesos fisiológicos dinámicos tales como el flujo sanguíneo, el tráfico leucocitario en los procesos inflamatorios e incluso la trasmigración leucocitaria como respuesta del huésped a la presencia del tumor.²²

Los equipos de última generación han incorporado una cámara de dermatoscopia de alta resolución. Esta cámara permite realizar un registro dermatoscópico de la lesión o área de piel a evaluar y realizar la exploración con microscopia confocal tomando como parámetro la imagen dermatoscópica (foto 2).

Aplicaciones clínicas

El hecho de que la MCR permita obtener información histológica de forma *in vivo* y no invasiva, la vuelve de gran aplicación en la práctica clínica.²³ La MCR ha demostrado ser de ayuda en la evaluación de lesiones melanocíticas, en la guía de la toma de biopsia en lesiones pigmentadas complejas, en la demarcación de tumores con márgenes mal definidos y en la monitorización de la respuesta tumoral al tratamiento no invasivo.²⁴

1. Evaluación secundaria de lesiones melanocíticas:

La melanina provee contraste endógeno en las imágenes de MCR de lesiones melanocíticas delineando la arquitectura de la lesión en los diferentes niveles de la piel e iluminando el citoplasma de las células.¹⁹

Debido a que las características arquitectónicas y citológicas son reconocibles, los tumores benignos y malignos pueden ser contrastados en presencia o ausencia de estas características.²⁵⁻²⁶ De esta forma, pueden reconocerse el grado de desorden arquitectural,²⁷ la presencia de células de distribución pagetoide,²⁸ el tipo de nidos celulares en las lesiones²⁹

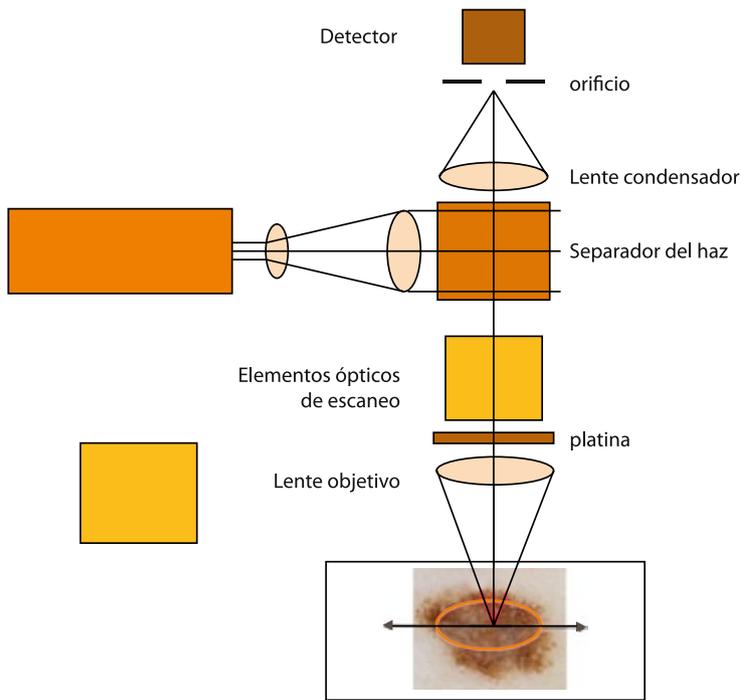


Foto 1. Principios básicos de la microscopía confocal. Un punto de la fuente de luz se proyecta sobre el tejido y el detector recoge la luz que proviene sólo desde el punto luminoso que se encuentra en foco.



Foto 2. Microscopio confocal de última generación (Vivascope® 1500).

y otros criterios, lo que evita la extirpación innecesaria de lesiones benignas.

Brevemente, los nevos melanocíticos se caracterizan por la presencia de células brillantes, refráctiles y monomorfas, con núcleo oscuro, y agrupadas en nidos densos²⁹⁻³⁰ (foto 3). Por otra parte, las características típicas del melanoma en MCR incluyen: desorden arquitectural del estrato espinoso con queratinocitos de bordes mal definidos (de forma focal o difusa).²⁶ Además, la atipia citológica se reconoce por la

presencia de estructuras dendríticas complejas dentro de la epidermis¹⁴ (foto 4).

2. Guía de la toma de biopsia:

En lesiones extensas, la MCR puede localizar las áreas que muestren atipia celular o arquitectural para elegir la zona más adecuada para dirigir la biopsia, lo que permite detectar los cambios histológicos más significativos.³¹

Esto es particularmente importante en lesiones localizadas en áreas cosméticamente sensibles como la cara, en donde el diagnóstico diferencial incluye el lentigo maligno y el lentigo maligno melanoma. El lentigo maligno es una entidad muy heterogénea y puede presentar áreas que incluso histológicamente semejan el lentigo solar, por lo que dirigir la biopsia a la zona correcta es crucial. La MCR podría mejorar la sensibilidad en el diagnóstico de algunos LMM que muestren focos tumorales aislados y focos de invasión.³²

Es importante tener en cuenta que la mayoría de las biopsias son sometidas a cortes limitados antes del examen histológico, y son posibles errores cuando se trata de lesiones pigmentadas grandes y complejas, como en el caso del melanoma desarrollado sobre nevus melanocítico, en el que un pequeño foco de melanoma podría pasar desapercibido.³³

3. Demarcación de los tumores con márgenes mal definidos:

La extensión de proliferaciones melanocíticas atípicas es difícil de valorar por inspección visual solamente. Estos procesos habitualmente tienen límites mal definidos, extendiéndose a piel clínicamente no afectada, pueden presentar proliferación de tipo lentiginosa o incluso carecer de signos de sospecha clínica, lo que constituye un verdadero desafío diagnóstico y terapéutico. Tal es el caso del lentigo maligno, que frecuentemente aparece en la piel de la cara, sobre piel con daño actínico crónico, donde la presencia de importantes estructuras anatómicas limita la posibilidad de conseguir amplios márgenes de extirpación y conlleva secuelas cosméticas y/o funcionales.

Basados en la evidencia acumulada, la MCR podría ser de utilidad para el mapeo de lentigos malignos de gran tamaño o que poseen márgenes difíciles de determinar clínicamente, y de esta forma delinear de forma no invasiva los márgenes tumorales, ayudando a que las lesiones sean extirpadas completamente en una primera cirugía, reduciendo las tasas de recurrencias locales y la necesidad de reintervenciones³⁴⁻³⁵ (foto 5).

Recientemente se ha demostrado que la MCR podría ser de utilidad en el examen *ex vivo* de cánceres cutáneos no melanoma durante la cirugía micrográfica de Mohs sin necesidad de cortes ni congelación.³⁶ La MCR también ha sido utilizada *in vivo* durante la cirugía de Mohs para asistir en la visualización de los márgenes de carcinomas basocelulares y melanomas.

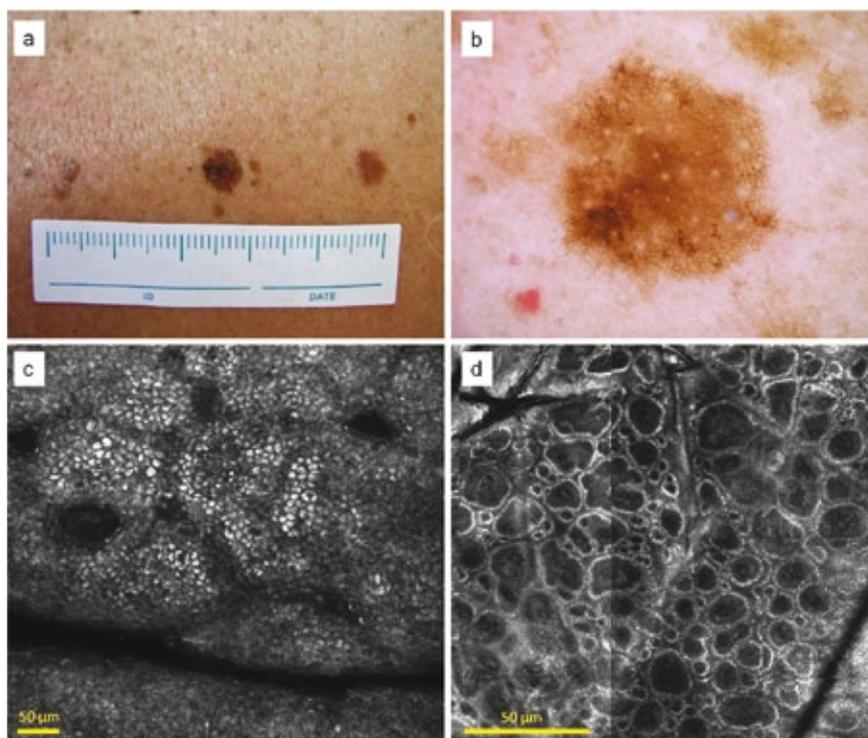


Foto 3. Nevus melanocítico. Imagen clínica (a). La dermatoscopia (b) muestra un patrón reticulado típico, sin criterios de malignidad. La MCR muestra una epidermis conservada con presencia de patrón en empedrado con células monomorfas suprabasales y ausencia de células atípicas en estratos altos (c). A nivel de la unión dermo-epidérmica se observan papilas dérmicas bien delimitadas sin atipia citológica (d).

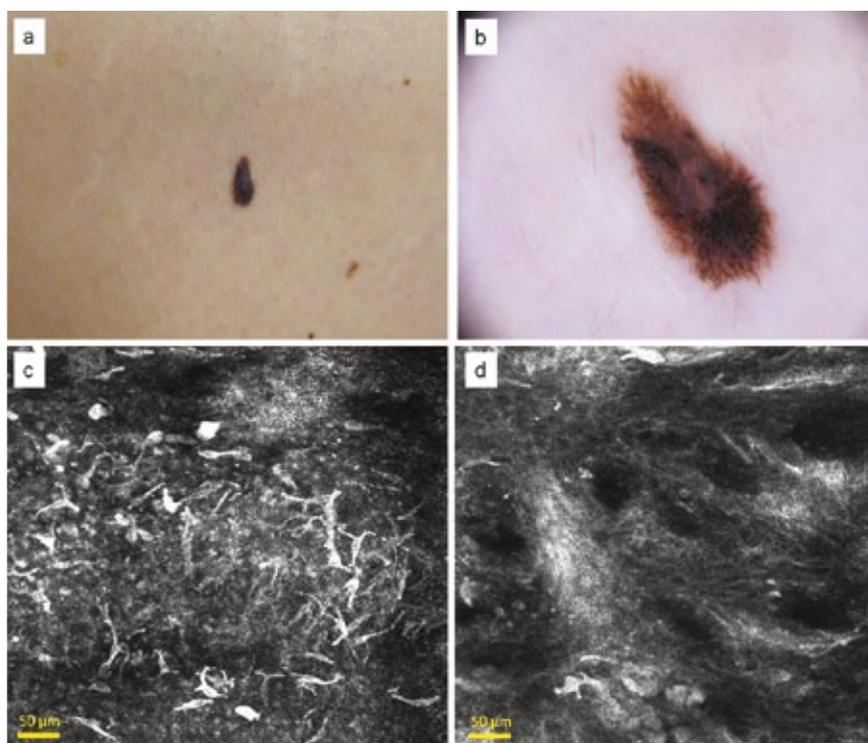


Foto 4. Melanoma de extensión superficial, Clark III, Breslow 0,7 mm. Imagen clínica (a). La dermatoscopia muestra una lesión con patrón reticulado atípico, proyecciones lineales en periferia y regresión (b). La MCR revela una epidermis desestructurada con presencia de células atípicas redondas y dendríticas de diferentes tamaños, compatibles con melanocitos atípicos de distribución pagetoide (c). A nivel de la unión dermo-epidérmica se observa ausencia de papilas dérmicas bien delimitadas y atipia citológica en la capa basal (d).

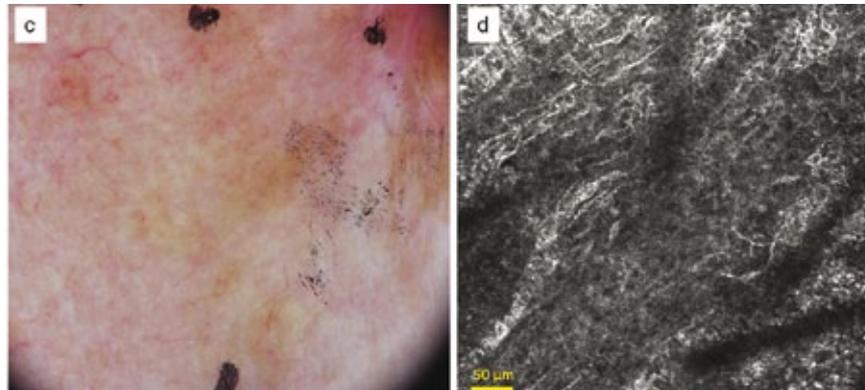


Foto 5. Cicatriz de extirpación de lentigo maligno melanoma. Imagen clínica previa (a) en la que se observa pigmentación del área de la cicatriz. Imagen clínica posterior a la evaluación con MCR (b) con las áreas a practicar biopsia. Imagen dermatoscópica (c) que muestra discreta pigmentación de color marrón claro sin criterios específicos de malignidad. La MCR (d) revela presencia de células dendríticas en estratos superiores sugestivas de malignidad.

4. Monitorización de la respuesta tumoral al tratamiento no invasivo:

El estudio histológico es el *gold standard* a la hora de evaluar cambios durante y después del tratamiento. Con el advenimiento de terapias no invasivas para el tratamiento de los tumores cutáneos –como la terapia fotodinámica y el tratamiento tópico con imiquimod para uso en el tratamiento de queratosis actínicas, enfermedad de Bowen y algunos tipos de carcinomas basocelular–, surge la necesidad del desarrollo de tecnologías no invasivas que permitan confirmar con certeza clínica la resolución del proceso sin necesidad de una biopsia quirúrgica. La MCR ha demostrado ser de utilidad no sólo en la valoración de estos procesos, sino también en la confirmación de su ulterior desaparición tras estas modalidades terapéuticas.^{36,38}

La MCR permite el análisis repetido de la misma lesión o la misma zona, lo que posibilita la evaluación de procesos dinámicos como los cambios de la arquitectura epidérmica o infiltrados inflamatorios.³⁴

En conclusión, la MCR representa el inicio de una nueva era en la dermatología, especialmente en la dermatología oncológica, al permitir la evaluación *in vivo* y en tiempo real de células y estructuras de la piel con resolución cuasi histológica. La creciente evidencia en el uso de la MCR en dermatología, especialmente los estudios de correlación en-

tre MCR e histología, hacen de la MCR una herramienta útil en la evaluación secundaria de lesiones melanocíticas y no melanocíticas, en la guía de la toma de biopsias, en la evaluación de márgenes lesionales pre e intraquirúrgicos y en la evaluación de la respuesta a tratamientos no invasivos. La MCR es actualmente costosa y aún se encuentra en fase de desarrollo. Con mayores avances tecnológicos y la ya encaminada validación clínica requerida, podrá volverse práctica para la evaluación de lesiones pigmentadas.

Bibliografía

1. Menzies S. Cutaneous melanoma: making a clinical diagnosis, present and future, *Dermatologic Therapy*, 2006, 19: 32-39.
2. Argenziano G., Soyer H.P. Dermoscopy of pigmented skin lesions – a valuable tool for early diagnosis of melanoma, *Lancet Oncol.*, 2001, 2: 443-449.
3. Bafounta M.L., Beauchet A., Aegerter P., Saiag P. Is dermoscopy (epiluminescence microscopy) useful for the diagnosis of melanoma? Results of a meta-analysis using techniques adapted to the evaluation of diagnostic tests, *Arch. Dermatol.*, 2001, 137: 1343-1350.
4. Kittler H., Pehamberger H., Wolff K., Binder M. Diagnostic accuracy of dermoscopy, *Lancet Oncol.*, 2002, 3: 159-165.
5. Vestergaard M.E., Macaskill P., Holt P.E., Menzies S.W. Dermoscopy compared with naked eye examination for the diagnosis of primary melanoma: a meta-analysis of studies performed in a clinical setting, *Br. J. Dermatol.*, 2008, 159: 669-676.

6. Esmaeili A., Scope A., Halpern A.C., Marghoob A.A. Imaging techniques for the *in vivo* diagnosis of melanoma, *Semin. Cutan. Med. Surg.*, 2008, 27: 2-10.
7. Welzel J. Optical coherence tomography in dermatology: A review, *Skin Res. Technol.*, 2001, 7: 1-9.
8. Jemec G.B., Gniadecka M., Ulrich J. Ultrasound in dermatology: Part I, high frequency ultrasound, *Eur. J. Dermatol.*, 2000, 6: 492-497.
9. El Gammal S., Hartwig R., Aygen S., Bauermann T. *et al.* Improved resolution of magnetic resonance microscopy in examination of skin tumors, *J. Invest. Dermatol.*, 1996, 106: 1287-1292.
10. Moncrieff M., Cotton S., Claridge E., Hall P. Spectrophotometric intracutaneous analysis: a new technique for imaging pigmented skin lesions, *Br. J. Dermatol.*, 2002, 146: 448-457.
11. Rajadhyaksha M., González S., Zavislan J.M., Anderson R.R. *et al.* In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin II: Advances in instrumentation comparison with histology, *J. Invest. Dermatol.*, 1999, 113: 293-230.
12. Pellacani G., Cesinaro A., Seidenari S. Reflectance-mode confocal microscopy of pigmented skin lesions-improvement in MM diagnostic specificity, *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2005, 53: 979-985.
13. Pellacani G., Cesinaro A.M., Longo C., Grana C. *et al.* Microscopic in vivo description of cellular architecture of dermoscopic pigment network in nevi and MM, *Arch. Dermatol.*, 2005, 141: 147-154.
14. Greger A., Koller S., Weger W., Richtig E. *et al.* Sensitivity and specificity of confocal laser-scanning microscopy for in vivo diagnosis of malignant skin tumors, *Cancer*, 2006, 107: 193-200.
15. Gerger A., Koller S., Kern T., Massone C. *et al.* Diagnostic applicability of in vivo confocal laser scanning microscopy in melanocytic skin tumors, *J. Invest. Dermatol.*, 2005, 124: 493-498.
16. Minsky M. U.S. Patent 3013467, *Microscopy apparatus*, December 19, 1961.
17. Petran M., Hadravsky M., Egger M.D. Tandem scanning reflected light microscope, *J. Opt. Soc. Am.*, 1968, 58: 661-664.
18. Corcuff P., Leveque J.L. In vivo vision of the human skin with the tandem scanning microscope, *Dermatology*, 1993, 186: 50-54.
19. Rajadhyaksha M., Grossman M., Esterowitz D., Webb R.H. *et al.* In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin: melanin provides strong contrast, *J. Invest. Dermatol.*, 1995, 104: 946-952.
20. Nehal K.S., Gareau D., Rajadhyaksha M. Skin imaging with reflectance confocal microscopy, *Semin. Cutan. Med. Surg.*, 2008, 27: 37-43.
21. Rajadhyaksha M., González S., Zavislan J.M. Detectability of contrast agents for confocal reflectance imaging of skin and microcirculation, *J. Biomed. Opt.* 2004, 9: 323-331.
22. Scope A., Benvenuto-Andrade C., Agero A.L., Halpern A.C. *et al.* Correlation of dermoscopic structures of melanocytic lesions to reflectance confocal microscopy, *Arch. Dermatol.*, 2007, 143: 176-185.
23. González S. Aplicaciones clínicas de la microscopia confocal de reflectancia en el manejo de los tumores cutáneos, *Actas Dermosifliogr.*, 2008, 99: 528-531.
24. González S. Confocal reflectance microscopy in dermatology: promise and reality of non-invasive diagnosis and monitoring, *Actas Dermosifliogr.*, 2009, 2: 59-69.
25. Langley R., Rajadhyaksha M., Dwyer P., Sober A. *et al.* Confocal scanning laser microscopy of benign and malignant melanocytic skin lesions in vivo, *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2001, 45: 365-376.
26. Pellacani G., Longo C., Malvehy J., Puig S. *et al.* In vivo confocal microscopic and histopathologic correlations of dermoscopic features in 202 melanocytic lesions, *Arch. Dermatol.*, 2008, 144: 1597-1608.
27. Pellacani G., Cesinaro A.M., Longo C., Grana C. *et al.* Microscopic in vivo description of cellular architecture of dermoscopic pigment network in nevi and melanomas, *Arch. Dermatol.*, 2005, 141: 147-154.
28. Pellacani G., Cesinaro A.M., Seidenari S. Reflectance-mode confocal microscopy for the in vivo characterization of pagetoid melanocytosis in melanomas and nevi, *J. Invest. Dermatol.*, 2005, 125: 532-537.
29. Pellacani G., Cesinaro A.M., Seidenari S. In vivo assessment of melanocytic nests in nevi and melanomas by reflectance confocal microscopy, *Mod. Pathol.*, 2005, 18: 469-474.
30. Pellacani G., Cesinaro A.M., Seidenari S. In vivo confocal reflectance microscopy for the characterization of melanocytic nests and correlation with dermoscopy and histology, *Br. J. Dermatol.*, 2005, 152: 384-386.
31. Tannous Z.S., Mihm M.C., Flotte T.J., González S. In vivo examination of lentigo maligna and malignant melanoma in situ, lentigo maligna type by near-infrared reflectance confocal microscopy: comparison of in vivo confocal images with histologic sections, *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2002, 46: 260-263.
32. Chen C.S., Elias M., Busam K., Rajadhyaksha M. *et al.* Multimodal in vivo optical imaging, including confocal microscopy, facilitates presurgical margin mapping for clinically complex lentigo maligna melanoma, *Br. J. Dermatol.*, 2005, 153: 1031-1036.
33. Marghoob A.A., Charles C.A., Busam K.J., Rajadhyaksha M. *et al.* In vivo confocal scanning laser microscopy of a series of congenital melanocytic nevi suggestive of having developed malignant melanoma, *Arch. Dermatol.*, 2005, 141: 1401-1412.
34. Busam K., Hester K., Charles C., Sachs D. *et al.* Detection of clinically amelanotic malignant melanoma and assessment of its margins by in vivo confocal scanning laser microscopy, *Arch. Dermatol.*, 2001, 137: 923-929.
35. Curiel-Lewandrowski C., Williams C.M., Swindells K.J., Tahan S.R. *et al.* Use of in vivo confocal microscopy in malignant melanoma: an aid in diagnosis and assessment of surgical and nonsurgical therapeutic approaches, *Arch. Dermatol.*, 2004, 140: 1127-1132.
36. Chung V.Q., Dwyer P.J., Nehal K.S., Rajadhyaksha M. *et al.* Use of ex vivo confocal scanning laser microscopy during Mohs surgery for nonmelanoma skin cancers, *Dermatol. Surg.*, 2004, 30: 1470-1478.
37. Ulrich M., Krueger-Corcoran D., Roewert-Huber J., Sterry W. *et al.* Reflectance confocal microscopy for noninvasive monitoring of therapy and detection of subclinical actinic keratoses, *Dermatology*, 2010, 220: 15-24.
38. Astner S., Dietterle S., Otberg N., Röwert-Huber H.J. *et al.* Clinical applicability of in vivo fluorescence confocal microscopy for noninvasive diagnosis and therapeutic monitoring of nonmelanoma skin cancer, *J. Biomed. Opt.*, 2008, 13: 014003.