

NOVEDADES EN DERMATOLOGÍA

Aplicaciones clínicas de la microscopía confocal de reflectancia en el manejo de los tumores cutáneos

S. González

Servicio de Dermatología. Memorial Sloan-Kettering Cancer Center. Nueva York. Estados Unidos. Servicio de Dermatología. Hospital Ramón y Cajal. Madrid. España.

Resumen. La microscopía confocal de reflectancia es una herramienta de imágenes que permite la visualización de células y estructuras de la piel de forma no invasiva y en tiempo real. Ésta se ha usado para la evaluación de lesiones benignas y malignas, demostrando un gran potencial para aplicaciones en investigación básica y en dermatología clínica. Como cabría pensar, esta tecnología tiene un gran potencial en estudios clínicos longitudinales y en la evaluación de procesos dinámicos como los que acontecen tras la exposición a radiación ultravioleta o durante la respuesta de los tumores a terapias no invasivas. Este artículo discute brevemente los fundamentos o principios básicos de la microscopía confocal de reflectancia, sus aplicaciones clínicas, fundamentalmente en el manejo de los tumores cutáneos, y las limitaciones que la técnica presenta asociadas a las propiedades ópticas de la piel, con la instrumentación y con la interpretación de las imágenes.

Palabras clave: microscopía confocal de reflectancia, tumores cutáneos, biopsia virtual, tecnología no invasiva.

CLINICAL APPLICATIONS OF REFLECTANCE CONFOCAL MICROSCOPY IN THE MANAGEMENT OF CUTANEOUS TUMORS

Abstract. Reflectance confocal microscopy is a noninvasive tool that allows skin cells and structure to be imaged in real time. The technique has been used to assess benign and malignant lesions and has shown great potential in basic research and clinical dermatology. As might be expected, it also has great potential in longitudinal clinical studies and in the evaluation of dynamic processes such as those that occur after exposure to UV radiation or during the tumor response to noninvasive therapy. This article briefly describes the fundamental aspects and basic principles of reflectance confocal microscopy and discusses its clinical applications essentially in the management of cutaneous tumors. We also consider the limitations of the technique associated with the optical properties of the skin, with instrumentation, and with interpretation of the images.

Key words: reflectance confocal microscopy, cutaneous tumors, virtual biopsy, noninvasive technology.

Introducción

Durante mucho tiempo, el desarrollo de técnicas diagnósticas de imágenes ha dejado de lado el estudio de la piel, debido a la facilidad de su inspección y de la toma de muestras para estudios histopatológicos. No obstante, los últimos años han sido testigos de un cambio radical, orientado hacia el desarrollo de técnicas no invasivas de alta resolución que faciliten el diagnóstico clínico en nuestra especialidad. Estas nuevas tecnologías incluyen: microscopía con-

focal de reflectancia, tomografía de coherencia óptica y ultrasonografía de alta frecuencia. Mientras las dos últimas presentan serios problemas de aplicación, dado que su resolución es limitada ($> 15 \mu\text{m}$), y aunque obtienen secciones virtuales de la piel que cuentan con una buena correlación arquitectural, son incapaces de obtener imágenes claras de células individuales¹⁻⁴. La microscopía confocal de reflectancia representa un avance tecnológico puntero, alcanzando una resolución microscópica razonable para el diagnóstico. Esta tecnología se encuentra al frente en el área de la bioingeniería cutánea, y posee un enorme potencial en nuestra especialidad, ya que permite obtener un diagnóstico histológico *in vivo* (no invasivo) en la misma clínica y junto al paciente, con una resolución muy cercana a la de la histología convencional. Dicha resolución se puede definir como *quasihistológica*, y alcanza una resolución lateral inferior a 1 micra, y una resolución vertical de 3 a

Correspondencia:
Salvador González.
Servicio de Dermatología.
Memorial Sloan-Kettering Cancer Center.
160 E 53rd Street.
New York, NY-10022 EE.UU.
gonzals6@mskcc.org

Aceptado el 9 de diciembre de 2007.

5 micras, lo que quiere decir que la resolución es similar a la que obtenemos en la histología de rutina, pero con una profundidad limitada de 250-350 micras, lo que es suficiente para visualizar la epidermis, la dermis papilar y la dermis reticular superficial. La calidad de la imagen es excelente, y la aparición de un número creciente de estudios de correlación de ensayos clínicos con histología convencional hace de la microscopía confocal de reflectancia una técnica muy útil para el diagnóstico y el manejo de los cánceres de piel.

Microscopía confocal de reflectancia, conceptos básicos y desarrollo

La microscopía confocal de reflectancia se ha venido desarrollando durante los últimos 15 años. Una de las metas fundamentales ha sido y es desarrollar la microscopía confocal de reflectancia, haciendo posible su paso desde el laboratorio a la práctica clínica. Los primeros trabajos publicados permitieron su aprobación por la FDA (*Food and Drug Administration*), el máximo organismo regulador en los Estados Unidos⁵⁻⁷. El desarrollo posterior ha permitido la definición de criterios diagnósticos de múltiples procesos cutáneos, con especial énfasis en los tumores. Actualmente se encuentra en prensa un atlas editado por nuestro grupo del *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center* que contiene la descripción de las características confocales de los tumores cutáneos⁸, el cual será de gran ayuda para el entrenamiento de los dermatólogos que quieran hacer uso de la técnica. Por otra parte, distintas aproximaciones han demostrado que el diagnóstico y tratamiento de ciertos tumores de piel se pueden llevar a cabo de forma totalmente no invasiva, sin la práctica de una biopsia⁹.

Brevemente, la microscopía confocal *in vivo* utiliza un sistema láser de muy baja potencia para iluminar la lesión objeto de estudio y, de forma similar a la ecografía (luz en lugar de ultrasonidos), detecta la luz que es reflejada por un plano microscópico que ocuparía un grosor inferior a 5 micras, permitiendo su observación, así como la visualización de la morfología de las células cutáneas, incluso de los núcleos, lo que permite discernir la morfología de las células sanas y aquellas con morfología atípica⁶. Cuando se visualiza el tejido en tiempo real se pueden observar incluso 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 de un tumor¹⁰. El contraste presente en las imágenes es consecuencia de la presencia de orgánulos subcelulares y microestructuras del tejido. El mejor agente endógeno de contraste es la melanina por su alto índice de refracción, lo que hace que esta tecnología sea muy prometedora para el diagnóstico de las lesiones melanocíticas (nevus comunes y displásicos y melanomas)^{5,11}.

Aplicación clínica de la microscopía confocal de reflectancia

La alta resolución obtenida por la microscopía confocal al visualizar la piel *in vivo* hace que pueda tener un amplio espectro de aplicaciones clínicas, entre ellas la aplicación al diagnóstico, manejo quirúrgico de procesos, así como la evaluación de la respuesta de determinados tumores a tratamientos no invasivos. Además, tiene un innegable futuro comercial en áreas de interés cosmético. Las aplicaciones potenciales son:

Guía de la toma de biopsia

Algunos trabajos de nuestro grupo de investigación, tanto en la *Harvard Medical School* como más recientemente en el *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center*, han demostrado que ésta es una prometedora herramienta para guiar la toma de biopsias, evitando el no poco frecuente *sampling error*¹²⁻¹⁴. Por ejemplo, recientemente se ha publicado un estudio que describe la aplicación de la microscopía confocal de reflectancia en el diagnóstico de micosis fungoides, una patología cuyo diagnóstico puede ser muy frustrante debido a su diversidad clínica, y a que no existen hallazgos patognomónicos en su histopatología, por lo que con frecuencia son necesarias múltiples biopsias antes de confirmar su diagnóstico¹⁵. Este trabajo presenta evidencias experimentales de que la microscopía confocal de reflectancia puede localizar el área más apropiada para la biopsia dentro de la lesión, porque permite detectar los cambios histológicos más significativos presentes en el compartimento epidérmico y dérmico superficial. Otras lesiones en las que la microscopía confocal puede ser de ayuda son las localizadas en áreas cosméticamente sensibles como la cara, particularmente en las que el diagnóstico diferencial incluye lentigo maligno y lentigo maligno melanoma. Debido a que el lentigo maligno melanoma suele ser clínicamente muy heterogéneo y presenta áreas que histológicamente parecen lentigo solar, la toma de la muestra en el área correcta es fundamental^{16,17}. Además, así se evita la biopsia de lentigo solar. Otra patología importante es el síndrome de nevus atípico, a los pacientes que los presentan se les realizan frecuentemente biopsias innecesarias, ya que algunos nevus resultan ser benignos¹⁸.

Demarcación de tumores con márgenes mal definidos

Los tumores localizados en áreas como la cara o el cuero cabelludo a menudo presentan márgenes mal definidos; el tratamiento ideal es la completa escisión de los mismos con márgenes libres verificados histológicamente. Tal es el caso

de los melanomas con bordes mal definidos como lentigo maligno/lentigo maligno melanoma, melanoma amelanótico, etc. El lentigo maligno/lentigo maligno melanoma es un proceso clínicamente complejo y difícil de tratar, pues aparece en la piel con daño actínico crónico, donde incluso es difícil la demarcación histológica. Además, frecuentemente aparece en la piel de la cara, donde conseguir márgenes amplios conlleva importantes secuelas cosméticas y funcionales. Recientemente, se han publicado trabajos preliminares que demuestran su uso en la demarcación prequirúrgica de melanomas de márgenes no definidos, lentigo maligno y melanoma amelanótico^{16,17,19}. Actualmente, nuestro grupo de investigación en *Sloan-Kettering* está llevando a cabo un estudio clínico a gran escala para confirmar esta aplicación. En estos casos, se realiza un examen clínico convencional de la lesión, posteriormente se delimitan los márgenes con la ayuda de la luz de Wood y la dermatoscopia –que facilita la detección de extensiones subclínicas en ciertos casos–, y finalmente se perfilan los mismos mediante microscopía confocal, para lo que se aplica la microscopía confocal dentro y fuera del margen previamente delineado.

Monitorización de la respuesta de los tumores al tratamiento no invasivo

Dado el interés clínico en la aplicación de tratamientos no invasivos para eliminar cánceres, se hace necesario el desarrollo de tecnologías no invasivas que permitan confirmar con certeza clínica la resolución del proceso sin necesidad de una biopsia quirúrgica. Estos tratamientos, recientemente aprobados por la Agencia del Medicamento, son la terapia fotodinámica y el tratamiento tópico con imiquimod, un modificador de la respuesta inmune. Ambas terapias han sido aprobadas para su uso en el tratamiento de las queratosis actínicas, la enfermedad de Bowen y algunos tipos de epiteloma basocelular, por lo que la confirmación de estos procesos por medio de la microscopía confocal y su ulterior desaparición tras estas modalidades terapéuticas es muy importante. En concreto, trabajos desarrollados por nuestro grupo en el *Harvard Medical School* han demostrado la monitorización y la respuesta de estos tumores tanto a la terapia fotodinámica como al tratamiento con imiquimod²⁰⁻²², así como el potencial de esta herramienta para la detección de tumor residual tras el tratamiento o tras la biopsia con bordes comprometidos²³.

Limitaciones de la técnica

La microscopía confocal de reflectancia tiene limitaciones asociadas con las propiedades ópticas de la piel, con la instrumentación y con la interpretación de las imágenes. Las

propiedades ópticas de la piel hacen que la profundidad de análisis esté limitada a la dermis reticular superficial, lo que supone una importante limitación para el análisis de ciertos procesos como el melanoma. Los instrumentos de microscopía confocal de reflectancia disponibles comercialmente pueden ser aplicados fácilmente a la mayoría de las áreas anatómicas. Incluso, hay en el mercado un microscopio de mano de tamaño algo mayor al de un otoscopio que facilita aún más el acceso a determinadas áreas. Por otro lado, la interpretación de las imágenes es quizá el mayor desafío para la difusión de esta tecnología en la práctica clínica. Para subsanar la limitación de la interpretación de las imágenes se está desarrollando un Servidor de Teledermatología (*DICOM-Digital Imaging and Communications in Medicine*, convencionalmente usado para almacenar, transferir y obtener imágenes médicas) que permite transferir imágenes digitales entre facultativos para su inmediata revisión. De manera semejante a la transmisión de biopsias al dermatopatólogo, esta aplicación de DICOM permitirá el envío de imágenes digitales a expertos en la técnica, que podrán emitir un informe capaz de llegar al dermatólogo incluso antes de que el paciente abandone la clínica.

Conflicto de intereses

Declaro no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Gladkova ND, Petrova GA, Nikulin NK, Radenska-Lopovok SG, Snopova LB, Chumakov YP, et al. In vivo optical coherence tomography imaging of human skin: norm and pathology. *Skin Res Technol*. 2000;6:6-16.
2. Pierce MC, Strasswimmer J, Park BH, Cense B, de Boer JF. Advances in optical coherence tomography imaging for dermatology. *J Invest Dermatol*. 2004;123:458-63.
3. Fornage BD. High-frequency sonography of the skin. *Eur J Ultrasound*. 1995;2:173-82.
4. Bessoud B, Lassau N, Koscielny S, Longvert C, Avril M-F, Duvillard P, et al. High-frequency sonography and color Doppler in the management of pigmented skin lesions. *Ultrasound Med Biol*. 2003;29:875-9.
5. 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.
6. Rajadhyaksha M, González S, Zavislan JM, 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.
7. González S, Swindells K, Rajadhyaksha M, Torres A. Changing paradigms in dermatology: confocal microscopy in clinical and surgical dermatology. *Clin Dermatol*. 2003;21:359-69.
8. González S, Gill M, Halpern A, editors. *Reflectance confocal microscopy of cutaneous tumors: an atlas with clinical, dermoscopic and histological correlations*. London, U.K.: Informa HealthCare; 2007.

9. Rajadhyaksha M. Confocal reflectance microscopy: diagnosis of skin cancer without biopsy? *Frontiers of Engineering*. Washington, DC: National Academies Press; 1999. p. 24-33.
10. González S, Sackstein R, Anderson RR, Rajadhyaksha M. Real-time evidence of in vivo leukocyte trafficking in human skin by reflectance confocal microscopy. *J Invest Dermatol*. 2001;117:384-6.
11. Yamashita T, Kuwahara T, González S, Takahashi M. Non-invasive visualization of melanin and melanocytes by reflectance-mode confocal microscopy. *J Invest Dermatol*. 2005;124:235-40.
12. Curiel-Lewandrowski C, Williams CM, Swindells KJ, Tahan SR, Astner S, Frankenthaler RA, 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;140:1127-32.
13. Huzaira M, Rius F, Rajadhyaksha M, Anderson RR, González S. Topographic variations in normal skin, as viewed by in vivo reflectance confocal microscopy. *J Invest Dermatol*. 2001;116:846-52.
14. Rajadhyaksha M, Menaker G, Flotte T, Dwyer PJ, González S. Confocal examination of nonmelanoma cancers in thick skin excisions to potentially guide Mohs micrographic surgery without frozen histopathology. *J Invest Dermatol*. 2001;117:1137-43.
15. Agero AL, Gill M, Ardigo M, Myskowski P, Halpern AC, González S. In vivo reflectance confocal microscopy of mycosis fungoides: A preliminary study. *J Am Acad Dermatol*. 2007;57:435-41.
16. Chen CS, Elias M, Busam K, Rajadhyaksha M, Marghoob AA. Multimodal in vivo optical imaging, including confocal microscopy, facilitates presurgical margin mapping for clinically complex lentigo maligna melanoma. *Br J Dermatol*. 2005;153:1031-6.
17. Tannous ZS, Mihm MC, Flotte TJ, 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;46:260-3.
18. Pellacani G, Cesinaro AM, Seidenari S. In vivo assessment of melanocytic nests in nevi and melanomas by reflectance confocal microscopy. *Mod Pathol*. 2005;18:469-74.
19. Busam KJ, Hester K, Charles C, Sachs DL, Antonescu CR, González S, et al. Detection of clinically amelanotic malignant melanoma and assessment of its margins by in vivo confocal scanning laser microscopy. *Arch Dermatol*. 2001;137:923-9.
20. Trehan M, Swindells K, Taylor CR, Racette AL, González S. Confocal microscopy imaging of actinic keratoses post-photodynamic therapy with 5-ALA. Paper presented at: 20th World Congress of Dermatology. Paris, 2002.
21. Torres A, Niemeyer A, Berkes B, Marra D, Schanbacher C, González S, et al. 5 % imiquimod cream and reflectance-mode confocal microscopy as adjunct modalities to Mohs micrographic surgery for treatment of basal cell carcinoma. *Dermatol Surg*. 2004;30:1462-9.
22. Goldgeier M, Fox CA, Zavislan JM, Harris D, González S. Noninvasive imaging, treatment, and microscopic confirmation of clearance of basal cell carcinoma. *Dermatol Surg*. 2003;29:205-10.
23. Marra DE, Torres A, Schanbacher CF, González S. Detection of residual basal cell carcinoma by in vivo confocal microscopy. *Dermatol Surg*. 2005;31:538-41.