

La microscopia confocal de reflectancia como herramienta diagnóstica en Dermatología

RESUMEN

La microscopia confocal de reflectancia es un método diagnóstico innovador por medio del que puede hacerse una evaluación *in vivo*, con resolución cuasihistológica de los estratos más superficiales de la piel. Este procedimiento nos permite obtener imágenes en tiempo real incluso de procesos dinámicos, como el flujo de eritrocitos en capilares cutáneos. Su mayor importancia la ha tomado en la diferenciación de lesiones melanocíticas con alto potencial de malignidad y en el ámbito de la investigación.

Palabras clave: microscopia confocal de reflectancia, diagnóstico, tiempo real, lesiones melanocíticas.

Sergio Mercado-Ceja

Dermatólogo. Clínica Dermatológica Distrito Derma, México, DF, San Luis Potosí. Servicio de Dermatología, Hospital General Dr. Manuel Gea González, México, DF.

Reflectance confocal microscopy as a diagnostic tool in Dermatology

ABSTRACT

Reflectance confocal microscopy is an innovative diagnostic method by which it is possible to make an in vivo evaluation of the most superficial layers of the skin with quasi histological resolution. This procedure allows obtaining real-time imaging of dynamic processes, such as erythrocytes flux in cutaneous capillaries. Its greatest importance has been taken in the differentiation of melanocytic lesions with high malignant potential and in the field of research.

Key words: *reflectance confocal microscopy, diagnosis, real time, melanocytic lesions.*

Recibido: 22 de julio 2014

Aceptado: 29 de septiembre 2014

Correspondencia: Dr. Sergio Mercado Ceja
Jaime Balmes 11, Torre B, int. 112-C
Planta comercial
11510 México, DF
drsergiomercado@gmail.com

Este artículo debe citarse como

Mercado-Ceja S. La microscopia confocal de reflectancia como herramienta diagnóstica en Dermatología. *Dermatol Rev Mex* 2015;59:150-155.



INNOVACIÓN ANTI-EDAD

ACTIVE C [10]

VITAMINA C PURA + VITAMINA E + PRO-CISTEÍNA

INNOVACIÓN ANTI-EDAD

ACTIVE C [10]

VITAMINA C PURA + VITAMINA E + PRO-CISTEÍNA

CONCENTRADO ANTIARRUGAS - INTENSIVO

10% vitamina C pura estabilizada.

Vitamina E + Pro-cisteína

Complejo antioxidante

ACCIÓN ANTIARRUGAS

-30% Líneas finas

MEJORA LA LUMINOSIDAD

-23% Tez apagada

-32% Tono de piel irregular

Uso:

Mañana o noche sobre el rostro.

Emulsión fluida, no grasa.

SALUD ES BELLEZA

No.: 123300EL950585

Protocolo: medición clínica, escala del 0-9, 39 mujeres, 50% con piel sensible, 4 semanas, evaluación dermatológica, Francia.



ANTECEDENTES

En los últimos años el diagnóstico en Dermatología ha tenido un impulso importante. El desarrollo de los sistemas de dermatoscopia ha permitido diferenciar enfermedades que antes no era posible sin una biopsia de piel. En la actualidad, por medio de la microscopia confocal de reflectancia, la tecnología permite realizar lo que hasta el momento se ha nombrado "biopsia virtual",¹ debido a que pueden obtenerse imágenes en tiempo real, mediante un procedimiento no invasivo de la epidermis y la dermis superficial con una resolución muy parecida a la de la histología convencional, sólo que en escala de grises.

Historia de la microscopia confocal

En 1957, Marvin Minsky,² científico estadounidense, conocido como el padre de la inteligencia artificial y por sus estudios en las redes neuronales, desarrolló y patentó un microscopio que le permitía ver diferentes capas de tejido, inicialmente conocido como microscopio de barrido confocal, y fue útil solamente para evaluar muestras *ex vivo*. En 1968, el científico ruso Mojmir Petran y colaboradores publicaron sus estudios del microscopio confocal en tándem, utilizado para estudiar el cerebro y la retina aun *ex vivo*.^{3,4}

En los siguientes 20 años esta técnica no fue muy apreciada debido a que los sistemas de cómputo de la época que se usaban para la visualización de las imágenes no tenían la resolución tridimensional ni el tamaño compacto como las que tenemos ahora.

A principios del decenio de 1990, con la introducción del láser como fuente de luz, comenzaron a registrarse las primeras imágenes ultraestructurales de la piel. En 1995, Rajadhyaksha y su grupo realizaron los primeros estudios

combinando longitudes de onda diferentes, logrando imágenes a diferentes niveles de la epidermis y la dermis; también describieron a la melanina con alta capacidad de refracción que genera un fuerte contraste de las estructuras que la contienen.⁵ En un segundo trabajo se evidenció la alta correlación entre la histología normal y las imágenes encontradas por la microscopia confocal.⁶

Principios básicos de la microscopia confocal de reflectancia

En la microscopia convencional se ilumina y se visualiza una sección de tejido completa. Aunque la parte focal del objetivo recibe la iluminación más intensa, también hay iluminación de otras partes fuera del plano de foco que generan un velo de visión borrosa.

La microscopia confocal utiliza un láser diodo como fuente de luz coherente y monocromática que penetra la piel y es enfocada por el objetivo del microscopio en un pequeño punto dentro del tejido, que puede ser tan pequeño como el mismo diámetro del haz de luz, cercano a las 5 micras.

El mismo objetivo condensa la luz reflejada (reflectancia) por el tejido y la proyecta a través de un pequeño agujero o ranura "pinhole" sin ninguna pérdida. En cambio, la luz dispersada por los puntos que se encuentran fuera del plano de la imagen es atenuada o bloqueada completamente. De esta manera se obtiene una imagen de alto contraste y definición de un punto en el plano focal a la vez, sin que haya una contribución significativa de las regiones que se encuentran fuera del plano de foco.

El contraste en las imágenes de la microscopia confocal de reflectancia se basa en el índice de refracción de los tejidos, que a su vez depende de sus estructuras químicas y moleculares. Las

estructuras con mayor índice de refracción son las que se observan más brillantes en la microscopia confocal de reflectancia.

Para crear una imagen de la pieza se realiza un escaneo rápido y seriado en los planos X-Y, por lo que los microscopios confocales dan una imagen en un plano virtual horizontal. A medida que avanza el escaneo de la pieza, se colecta la información para hacer la reconstrucción de una imagen punto por punto (un bloque o mosaico está constituido por 256 imágenes secuenciales). De la misma manera, pueden hacerse imágenes secuenciales en el mismo plano horizontal (X-Y), pero a diferente profundidad (Z), con lo que puede definirse la distancia entre cortes desde 5 hasta 120 micras (pila o montón, del inglés *stack*).⁷⁻¹⁰

Si se visualiza el tejido en tiempo real, pueden observarse procesos fisiológicos dinámicos, como el flujo sanguíneo o el tránsito leucocitario.^{5,11} Los equipos de última generación han adaptado una cámara de dermatoscopia de alta resolución que permite tener 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.¹⁰

Características de la piel normal

Se ha demostrado la correlación histológica de las imágenes de microscopia confocal de reflectancia con la histología convencional. Al realizar un estudio de la piel intacta en tiempo real, la primera capa de la epidermis que observamos es el estrato córneo.⁶

El estrato córneo, que se encuentra de 0 a 15 micras desde la superficie de la piel, se distingue por una imagen refractiva muy brillante debido a la retrodispersión de la luz generada por la diferencia entre el medio de inmersión y la piel.

En esta capa observamos a los corneocitos como estructuras poligonales, grandes (10 a 30 micras) y anucleadas, rodeadas de los dermatoglifos, que se observan como surcos lineales oscuros.⁶

El estrato granuloso se localiza entre 15 y 20 micras bajo la superficie cutánea, aquí observamos las mismas estructuras poligonales, pero ahora con estructuras granulares brillantes de aproximadamente 0.5 a 1 micra en su interior.⁶

El estrato espinoso se distingue por tener una organización que semeja un panal de abejas, se extiende de 15 a 100 micras y observamos a los queratinocitos como células de menor tamaño, 15-20 micras, con citoplasma blanco brillante y estructura opaca, central y ovalada que corresponde al núcleo.⁶

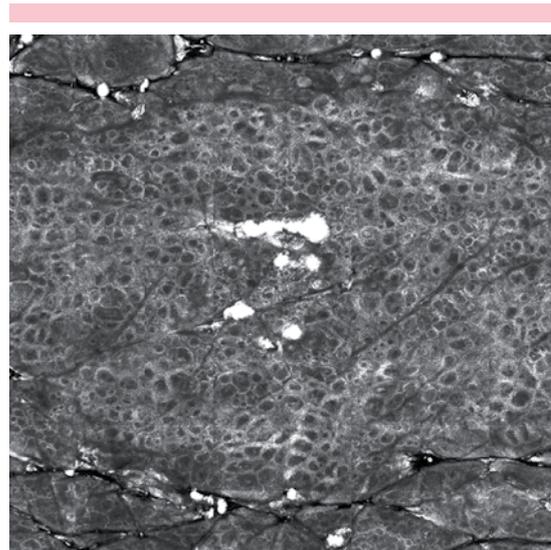


Figura 1. Imagen de "mosaico" (reconstrucción virtual de una imagen panorámica mediante la unión de imágenes básicas secuenciales) con microscopia confocal de reflectancia, donde se observa la unión dermoepidérmica con estructuras oscuras semiovaladas (papila dérmica), que están muy bien delimitadas por una hilera de células basales brillantes que se disponen en forma de anillo (*edged papillae*). En conjunto, las papilas dan un aspecto "en panal de abejas". Cortesía de los doctores Puig, Malveyh y Carrera.

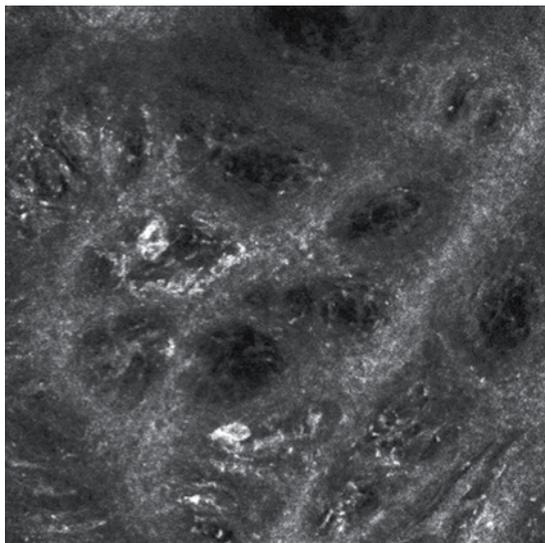


Figura 2. Imagen de la unión dermoepidérmica en la que se observan las estructuras oscuras semiovaladas, pero en este caso las estructuras brillantes que las rodean no están bien definidas (unión dermoepidérmica desestructurada). Se observan dos estructuras brillantes redondeadas que corresponden a células atípicas. Cortesía de los doctores Puig, Malvehy y Carrera.

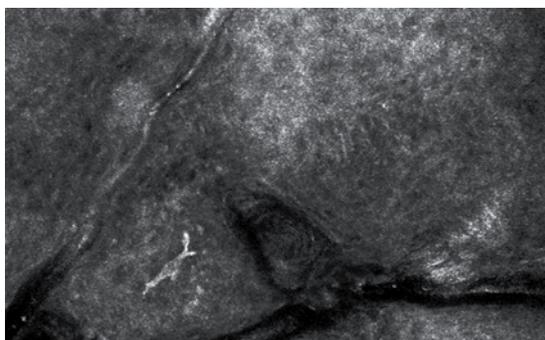


Figura 3. Célula dendrítica, célula atípica, alargada, brillante con proyecciones arborizantes. Cortesía de los doctores Puig, Malvehy y Carrera.

La capa basal, la más profunda de la epidermis, se encuentra entre 50 y 100 micras de la superficie de la piel; se distingue por células aún

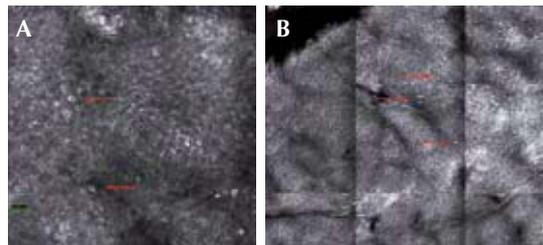


Figura 4. Células pagetoides. Imagen de epidermis con células grandes redondeadas, con citoplasma brillante y núcleo excéntrico oscuro (flechas). **A.** Mosaico (imagen panorámica, 1.5 x 1.5 mm). **B.** Imagen básica (imagen a detalle, 500 x 500 μm). Cortesía de los doctores Puig, Malvehy y Carrera.

más pequeñas, de aproximadamente 7 micras, pero de manera uniforme. Por la existencia de gran cantidad de melanina en su interior, es la capa con mayor índice refractivo. Aquí inicia la unión dermoepidérmica que se distingue por estructuras oscuras semiovaladas (papila dérmica) que pueden tener un capilar central y están muy bien delimitadas por una hilera de células basales brillantes que se disponen en forma de anillo (*edged papillae*).¹²

La dermis papilar y reticular se encuentra a profundidades de 100 a 350 micras y se distingue por estructuras fibrilares elongadas, brillantes y sin componente celular que corresponden a fibras de colágeno; asimismo, se pueden ver pequeños vasos sanguíneos, folículos pilosos y acrosiringios.¹²

Aplicaciones clínicas

La microscopia confocal de reflectancia representa el principio de una nueva era para la Dermatología. Numerosos estudios han señalado las principales características confocales que se observan en distintas enfermedades cutáneas, ya sea tumorales o inflamatorias, con buena correlación con ciertos patrones dermatoscópicos, así como con el examen histológico.¹³⁻¹⁵

Delimitación de márgenes tumorales

En el ámbito de la enfermedad oncológica, la importancia de la microscopia confocal de reflectancia radica en la determinación de los márgenes quirúrgicos. Los límites tumorales se determinan antes de la intervención quirúrgica en lesiones con márgenes clínicos escasamente definidos, en los que el tratamiento ideal es la escisión de los mismos con márgenes libres verificados histológicamente; es el caso del lentigo maligno, melanoma amelanico o ciertos carcinomas mal definidos localizados en la cara cercanos a estructuras vitales.¹⁶⁻¹⁸

La detección temprana de tumor residual y la distinción entre cicatriz y tumor residual son otras aplicaciones de esta tecnología en oncología cutánea.¹⁹

Evaluación secundaria de lesiones melanocíticas

Sin lugar a duda, aquí es donde la microscopia confocal de reflectancia ha tenido un mayor efecto; debido a que la melanina produce un fuerte contraste, los melanocitos son fácilmente identificables. La dermatoscopia permite clasificar de manera más precisa las lesiones melanocíticas²⁰⁻²² y la microscopia confocal de reflectancia corrobora las características normales y la existencia de enfermedad de las lesiones pigmentadas.

Los melanomas típicamente se distinguen por tener células atípicas, polimorfas con proyecciones arborizantes y "estructuras dendriformes". Las células con atipia se pueden encontrar en las capas más superficiales de la epidermis, representando migración pagetoide. En la unión dermoepidérmica encontramos a estas células atípicas formando nidos. Otras de las características importantes son: alteración de la arquitectura normal (pérdida del patrón "en panal de abejas" o empedrado de los queratinocitos) y pérdida

de la definición de las papilas dérmicas (*non edged-papillae*). De acuerdo con las alteraciones encontradas en cada lesión, se han generado algoritmos para aumentar la precisión en lesiones que representan un reto diagnóstico.^{8,23-26}

Respuesta al tratamiento

Asimismo, el uso creciente de tratamientos no invasivos contra el cáncer cutáneo no melanoma ha provocado mayor interés en la aplicación de la microscopia confocal de reflectancia. Es el caso de los nuevos esquemas de tratamiento con terapia fotodinámica o con imiquimod que ya fueron aprobados por la Dirección de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos; otros aún están en investigación, como la ablación del carcinoma basocelular nodular en etapas tempranas con láser Er:YAG, en los que también hacía falta un método de comprobación no invasivo de la efectividad del tratamiento.^{27,28}

Sin duda, la microscopia confocal de reflectancia es una herramienta que está ayudando a evolucionar el proceso diagnóstico en la Dermatología y se vislumbra que será una herramienta diaria de trabajo, por lo menos en los principales hospitales o servicios de atención dermatológica integral. Se espera que durante el curso del año 2015 se tenga el primer microscopio confocal de reflectancia en México, destinado al diagnóstico e investigación en Dermatología.

REFERENCIAS

1. Bahadoran P. *In vivo* confocal reflectance microscopy (CRM) and the prospect of virtual cutaneous biopsy. *Ann Dermatol Venereol* 2013;140:675-677.
2. Minsky M, Hillis D, Rudisch G. Artificial intelligence. *N Engl J Med* 1980;302:1482.
3. Petran M, Hadravsky M. Tandem scanning microscope--a new tool for three-dimensional microanatomy. *Prog Clin Biol Res* 1989;295:551-558.
4. Petran M, Hadravsky M, Benes J, Boyde A. *In vivo* microscopy using the tandem scanning microscope. *Ann NY Acad Sci* 1986;483:440-447.

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;104:946-952.
6. Rajadhyaksha M, Gonzalez 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. Nehal KS, Gareau D, Rajadhyaksha M. Skin imaging with reflectance confocal microscopy. *Semin Cutan Med Surg* 2008;27:37-43.
8. Carrera C, Puig S, Malveyh J. *In vivo* confocal reflectance microscopy in melanoma. *Dermatol Ther* 2012;25:410-422.
9. Selkin B, Rajadhyaksha M, Gonzalez S, Langley RG. *In vivo* confocal microscopy in dermatology. *Dermatol Clin* 2001;19:369-377, ix-x.
10. Salerni GE. Uso de la microscopia confocal de reflectancia en dermatología. Use of confocal reflectance microscopy in dermatology. *Dermatología Argentina* 2011;17:230-235.
11. Gonzalez 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;117:384-386.
12. Nwaneshiudu A, Kuschal C, Sakamoto FH, Anderson RR, et al. Introduction to confocal microscopy. *J Invest Dermatol* 2012;132:3.
13. Lallas A, Zalaudek I, Argenziano G, Longo C, et al. Dermoscopy in general dermatology. *Dermatol Clin* 2013;31:679-694, x.
14. Gill M, Longo C, Farnetani F, Cesinaro AM, et al. Non-invasive *in vivo* dermatopathology: identification of reflectance confocal microscopic correlates to specific histological features seen in melanocytic neoplasms. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2014;28:1069-1078.
15. Goncharova Y, Attia EAS, Souid K, Protzenko O, Koktishev I. Dermoscopic features of clinically inflammatory dermatoses and their correlation with histopathologic reaction patterns. *Arch Dermatol Res* 2015;307:23-30.
16. Gonzalez S, Swindells K, Rajadhyaksha M, Torres A. Changing paradigms in dermatology: confocal microscopy in clinical and surgical dermatology. *Clin Dermatol* 2003;21:359-369.
17. Pan ZY, Lin JR, Cheng TT, Wu JQ, Wu WY. *In vivo* reflectance confocal microscopy of basal cell carcinoma: feasibility of preoperative mapping of cancer margins. *Dermatol Surg* 2012;38:1945-1950.
18. Debarbieux S, Hospod V, Depaape L, Balme B, et al. Perioperative confocal microscopy of the nail matrix in the management of *in situ* or minimally invasive subungual melanomas. *Br J Dermatol* 2012;167:828-836.
19. Alarcon I, Carrera C, Turegano P, Malveyh J, Puig S. Basal cell carcinoma with spontaneous regression: added value of reflectance confocal microscopy when the dermoscopic diagnosis is uncertain. *J Am Acad Dermatol* 2014;71:7-9.
20. Argenziano G, Soyer HP. Dermoscopy of pigmented skin lesions--a valuable tool for early diagnosis of melanoma. *Lancet Oncol* 2001;2:443-449.
21. Argenziano G, Soyer HP, Chimenti S, Talamini R, et al. Dermoscopy of pigmented skin lesions: results of a consensus meeting via the Internet. *J Am Acad Dermatol* 2003;48:679-693.
22. Zalaudek I, Docimo G, Argenziano G. Using dermoscopic criteria and patient-related factors for the management of pigmented melanocytic nevi. *Arch Dermatol* 2009;145:816-826.
23. Alarcon I, Carrera C, Palou J, Alos L, et al. Impact of *in vivo* reflectance confocal microscopy on the number needed to treat melanoma in doubtful lesions. *Br J Dermatol* 2014;170:802-808.
24. Segura S, Puig S, Carrera C, Palou J, Malveyh J. Development of a two-step method for the diagnosis of melanoma by reflectance confocal microscopy. *J Am Acad Dermatol*. Elsevier 2009;61:216-229.
25. Chernoff KA, Marghoob AA, Lacouture ME, Deng L, et al. Dermoscopic findings in cutaneous metastases. *JAMA Dermatology* 2014;150:429-433.
26. De Carvalho N, Farnetani F, Ciardo S, Ruini C, et al. Reflectance confocal microscopy correlates of dermoscopic patterns of facial lesions helps to discriminate lentigo maligna from pigmented non-melanocytic macules. *Br J Dermatol* 2014. Doi: 10.1111/bjd.13546.
27. Alarcon I, Carrera C, Alos L, Palou J, et al. *In vivo* reflectance confocal microscopy to monitor the response of lentigo maligna to imiquimod. *J Am Acad Dermatol* 2014;71:49-55.
28. Chen C-SJ, Sierra H, Cordova M, Rajadhyaksha M. Confocal microscopy-guided laser ablation for superficial and early nodular Basal cell carcinoma: a promising surgical alternative for superficial skin cancers. *JAMA Dermatology* 2014;150:994-998.