



Detecció de carcinoma basocel·lular residual en seccions de cirurgia de Mohs mitjançant microscòpia confocal de fluorescència *ex vivo*. Descripció de criteris i aplicabilitat clínica

Antoni Bennàsar Vicens

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

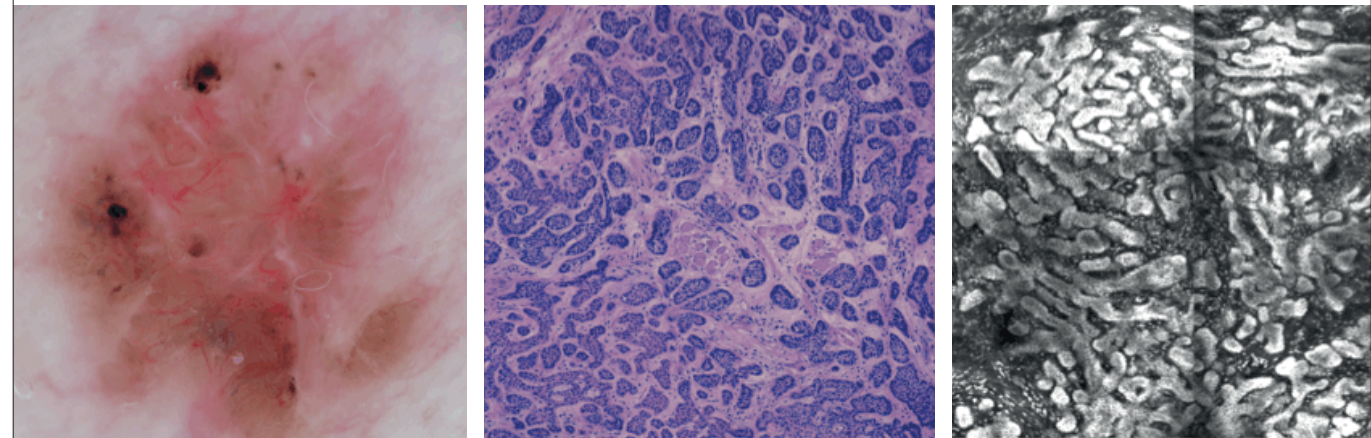
ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Tesi Doctoral / Antoni Bennàssar Vicens

DETECCIÓ DE **CARCINOMA BASOCEL·LULAR** RESIDUAL
EN SECCIONS DE **CIRURGIA DE MOHS** MITJANÇANT
MICROSCÒPIA CONFOCAL DE FLUORESCÈNCIA EX VIVO.
DESCRIPCIÓ DE CRITERIS I APLICABILITAT CLÍNICA

Directors: Dra. Susana Puig Sardà / Dr. Josep Malvehy Guilera



DOCTORAT EN MEDICINA. FACULTAT DE MEDICINA



BARCELONA DESEMBRE 2014

Tesi Doctoral / [Antoni Bennàssar Vicens](#)

DETECCIÓ DE CARCINOMA BASOCEL·LULAR RESIDUAL EN SECCIONS DE CIRURGIA
DE MOHS MITJANÇANT MICROSCÒPIA CONFOCAL DE FLUORESCÈNCIA EX VIVO.
DESCRIPCIÓ DE CRITERIS I APLICABILITAT CLÍNICA

CLÍNIC
BARCELONA
Hospital Universitari

U 
B Universitat de Barcelona

IDIBAPS
Institut
d'Investigacions
Biomèdiques
August Pi i Sunyer

Als meus pares,
els meus primers mestres

Eppur si muove
-Galileu Galilei-

PRESENTACIÓ

La present Tesi Doctoral és el resultat del treball de recerca iniciat gràcies al Premi Final de Residència “Emili Letang” de l’Hospital Clínic de Barcelona i posterior Beca Predoctoral de l’ Institut d’Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) en el marc de la línia d’investigació de “Melanoma: Imatge, Genètica i immunologia”.

El treball ha estat concebut i desenvolupat en el si de la Unitat de Melanoma del Servei de Dermatologia de l’Hospital Clínic de Barcelona i és el resultat del treball en equip involucrant les diferent àrees de coneixement: clínica, diagnòstic per la imatge, cirurgia i anatomia patològica.

El carcinoma basocel·lular és el tumor maligne més freqüent en humans. És una neoplàsia d’origen epidèrmic que, encara que de poc potencial de disseminació a distància, pot ésser localment molt agressiu. El diagnòstic precoç i l’extirpació quirúrgica amb marges negatius tenen una importància cabdal en l’èxit del tractament. La cirurgia oncològica cutània amb microcontrol intraoperatori dels marges (tècnica de Mohs i Trovovich) garanteix la negativitat dels marges quirúrgics al final de la intervenció amb el mínim malbaratament de pell sana perilesional. Tanmateix, aquesta tècnica té menor taxa de recurrència tumoral als 5 anys comparada amb la cirurgia convencional, especialment en aquell grup de pacients d’alt risc.

Es tracta, emperò, d’una tècnica que troba moltes barreres en els hospitals en la seva configuració actual consumint recursos materials i humans així com retardant el temps fins al diagnòstic. Per això es necessiten noves eines de diagnòstic que ens permetin millorar l’eficiència de la tècnica de Mohs.

La microscòpia confocal de fluorescència (MCF) ex vivo permet visualitzar la pell humana amb resolució cel·lular, en temps real i sense processament previ, mitjançant escombratge làser de la superfície a estudiar.

L’objectiu d’aquesta tesi doctoral és demostrar l’aplicabilitat de la MCF ex vivo en la cirurgia del carcinoma basocel·lular amb control intraoperatori de marges mitjançant la tècnica de Mohs.

La tesi es presenta en format de tres articles científics publicats en revistes d'abast internacional i factor d'impacte dins del primer quartil de l'especialitat de Dermatologia (els dos primers).

En el primer article es descriuen i validen vuit criteris per al diagnòstic del carcinoma basocel·lular a les imatges de MCF. Es reconeixen 69 tumors on s'avalua la presència i freqüència dels criteris i es compara amb les estructures de la pell normal (epidermis, dermis i estructures annexials) així com es fa l'estudi de concordança interobservador. A més, s'avalua la concordança entre la MCF i la histopatologia convencional per a classificar els diferents subtipus de carcinoma basocel·lular. Es conclou que els criteris de MCF són vàlids i reproduïbles amb observadors independents, que 4 d'ells són definitoris del carcinoma basocel·lular i que hi ha una alta concordança morfològica amb la histologia convencional.

Al segon treball, s'utilitzen els criteris prèviament descrits per avaluar la sensibilitat, especificitat, valor predictiu positiu i valor predictiu negatiu de la MCF per a l'avaluació intraoperatòria dels marges quirúrgics durant la cirurgia de Mohs del carcinoma basocel·lular. Així mateix, també es mesuren i comparen els temps emprats amb la MCF i amb el processament habitual en congelat de les mostres.

El tercer article explora les aplicacions clíniques pràctiques de la MCF en el maneig de pacients d'alt risc en tumors de difícil diagnòstic. Es descriuen dos casos clínics de dos pacients que presenten lesions clínicament i dermatoscòpicament molt similars als dors nasal en les quals no es pot descartar la presència de carcinoma basocel·lular. Mitjançant la MCF en poc més de 3 minuts tenim un resultat conclouent per a seguir el tractament més adient en cada cas.

Es conclou que la MCF és una eina vàlida per al diagnòstic intraoperatori en temps real del marges quirúrgics a la cirurgia oncològica cutània amb la tècnica de Mohs. Utilitzant els criteris descrits i validats s'obté una alta sensibilitat i especificitat per a la detecció de restes de carcinoma basocel·lular als marges quirúrgics en un menor temps que amb la tècnica convencional. La MCF podria suposar un augment en l'eficiència de la cirurgia de Mohs.

CONTINGUTS

INTRODUCCIÓ.....	13
I. RELLEVÀNCIA CLÍNICA DEL CARCINOMA BASOCEL·LULAR.....	13
1. HISTÒRIA.....	13
2. EPIDEMIOLOGIA.....	14
3. CLASSIFICACIÓ.....	14
4. PATOGÈNESI.....	18
1. FOTOCARCINOGENÈSI.....	19
2. QUIMIOCARCINOGENÈSI.....	20
3. GENÈTICA.....	21
II. CIRURGIA ONCOLÒGICA CUTÀNIA.....	25
1. LA TÈCNICA DE MOHS-TROMOVICH.....	25
1. QUIMIO-MICRO CIRURGIA DE MOHS.....	25
2. TÈCNICA CLÀSSICA.....	28
3. CONTROL TRIDIMENSIONAL DELS MARGES.....	31
III. MICROSCÒPIA CONFOCAL DE FLUORESCÈNCIA.....	35
HIPÒTESIS DE TREBALL.....	39
OBJECTIUS.....	41
MATERIAL I MÈTODES, RESULTATS, PUBLICACIONS.....	43
TREBALL 1. FAST EVALUATION OF 69 BASAL CELL CARCINOMAS WITH EX VIVO CONFOCAL MICROSCOPY: CRITERIA DESCRIPTION, HISTOPATHOLOGICAL CORRELATION AND INTEROBSERVER AGREEMENT.....	45

TREBALL 2. EX VIVO FLUORESCENCE CONFOCAL MICROSCOPY FOR FAST EVALUATION OF TUMOUR MARGINS DURING MOHS SURGERY.....	56
TREBALL 3. RAPID DIAGNOSIS OF TWO FACIAL PAPULES USING EX VIVO CONFOCAL MICROSCOPY: TOWARD A RAPID BEDSIDE PATHOLOGY.....	64
DISCUSSIÓ.....	71
I. VISUALITZACIÓ DEL CARCINOMA BASOCEL·LULAR SOTA LA MICROSCÒPIA CONFOCAL DE FLUORESCÈNCIA.....	73
1. MICROSCÒPIA CONFOCAL DE FLUORESCÈNCIA: CAP A UNA PATOLOGIA DIGITAL EN TEMPS REAL.....	73
2. DESCRIPCIÓ DE CRITERIS DEFINITORIS DE CBC EN ELS MOSAICS DE MCF.....	77
3. VALIDACIÓ INTEROBSERVADORS DEL CRITERIS DE CBC.....	87
4. CAPACITAT DE LA MCF PER A CLASSIFICAR ELS CBC EN ELS PRINCIPALS SUBTIPUS DE CBC.....	88
5. DIFERÈNCIES ENTRE ELS SUBTIPUS DE CBC QUANT AL CRITERIS.....	89
II. APLICACIÓ DE LA MCF EN LA DETECCIÓ DE CARCINOMA BASOCEL·LULAR ALS MARGES QUIRÚRGICS PER LA TÈCNICA DE MOHS-TROMOVICH.....	97
1. CAPACITAT DE LA MCF PER A LA DETECCIÓ DE CBC RESIDUAL.....	99
2. CÀLCUL DEL TEMPS INVERTIT PER AL PROCESSAMENT DE LES MOSTRES.....	105
III. APLICACIONS CLÍNiques: PRESENT I FUTUR DE LA MCF EN LA CIRURGIA ONCOLÒGICA CUTÀNIA.....	109
CONCLUSIONS.....	113
BIBLIOGRAFIA.....	115
ANNEXOS. Taules complementàries. Aspectes ètics.....	125
AGRAÏMENTS.....	131

INTRODUCCIÓ

I. RELLEVÀNCIA CLÍNICA DEL CARCINOMA BASOCEL·LULAR

1. HISTÒRIA

El carcinoma basocel·lular (CBC) és el tumor que s'origina a partir de les cèl·lules epitelials basals (1) i afecta principalment a pacients d'ètnia caucàsica a les àrees fotoexposades (2). Encara que les metàstasis limfàtiques o hematògenes són molt poc freqüents (< 0.01%) (3) i, per tant, rarament és causa directa de mort, pot ésser localment molt agressiu i derivar en una morbiditat important (4). Això és especialment cert en aquells subtipus histològics més agressius i en aquells pacients que han estat tractats de forma incorrecta (5).

La primera descripció científica que es té del CBC data de l'any 1827 (6), quan Arthur Jacob descriu una sèrie d'úlceres de localització facial amb un comportament "peculiar" i de tòrpida evolució que anomenà genèricament *ulcus rodens*. Al 1903, Krompecher, atenent a principis de classificació histopatològics utilitza per primer cop el terme "Basalzellenkrebs" per indicar l'origen a les cèl·lules de la capa basal de l'epidermis (7). Per altra banda, Mallory al 1910 (8) utilitza el terme "tumor de la matriu fol·licular" iniciant així el llarg debat per l'origen cel·lular del CBC.

Ja des de les primeres descripcions es fa èmfasi en què el CBC és un tumor que pot ser localment molt agressiu i destructiu, encara que la freqüència de metàstasi a distància i la mortalitat són molt baixes (5).

Al 1974 (9), l'OMS en la seva classificació de les neoplàsies malignes de la pell reafirma el terme de "carcinoma basocel·lular" que ha romàs fins als nostres dies.

2. EPIDEMIOLOGIA

Hom sap que el CBC és la neoplàsia maligna més freqüent a l'espècie humana (10,11). Representa aproximadament la meitat del total de càncers diagnosticats i el 75-80% dels casos de càncer de pell en pacient de raça caucàsica (12).

La incidència absoluta de CBC és difícil de calcular, ja que el CBC està exclòs de les estadístiques dels registres de càncer i també a causa de la seva gran variabilitat geogràfica. Es calcula que als EUA la incidència estimada en la població caucàsica seria d'uns 407 casos per cada 10⁵ habitants pels homes i d'uns 212 casos per 10⁵ habitants en el cas de les dones (12). Emperò, a zones com Austràlia, la seva incidència anual és tan alta com 726 nous casos per 105 habitants (13).

Encara que a totes les estadístiques s'ha demostrat una incidència més alta de CBC en el sexe masculí (12,13), s'ha demostrat en els darrers anys que en la població de manco de 55 anys la incidència és més alta entre les dones (14).

Amb l'envelliment progressiu de les societats occidentals i els canvis en l'exposició recreativa a la radiació ultraviolada s'ha demostrat un augment exponencial de la seva incidència a Europa (15), EUA (16) i Austràlia (17,13). Altres factors que contribueixen a aquest notori increment de la incidència i que han fet que el CBC no sigui una patologia rara en pacients joves són l'exposició a la radiació ultraviolada (RUV) artificial i l'aprimament de la capa d'ozó que filtra els rajos més carcinogènics (RUV-B i RUV-C) (18).

A més s'espera que la seva incidència segueixi augmentant per la qual cosa representa una important amenaça per a la salut pública a la qual s'hauran d'invertir esforços i recursos en la seva prevenció i tractament (12).

3. CLASSIFICACIÓ

CLÍNICA

La presentació clínica més habitual del CBC és en forma de pàpula o placa color pell de vores perlades i amb telangiectàsies a la seva superfície. Les lesions poden ser eritematoses o inclús translúcides i poden anar acompanyades d'ulceració i sagnat espontani. Alguns subtipus agressius de llarga evolució cursen en forma d'úlceres tòrpides amb important destrucció tissular d'estructures com el nas, les orelles o parpelles (19).

Les lesions són asimptomàtiques en pràcticament tots els CBC. En les rares ocasions en les quals la lesió es presenta amb dolor neuropàtic o impotència funcional d'algun grup muscular indica que es tracta d'una variant agressiva amb infiltració perineural. Aquesta última, s'ha descrit principalment en lesions de localització preauricular (20).

En línies generals, cada subgrup histològic té una presentació clínica similar. Els tres principals subtipus clínics de CBC són el superficial, els nodulars i els infiltrants amb la variant esclerodermiforme (12).

Així, els CBC superficials es presenten com una màcula o placa eritematosa, a vegades descamativa amb una vora perlada que obliga a fer un ampli diagnòstic diferencial en què entrarien la malaltia de Bowen, l'èczema nummular, les queratosis actíniques o les micosis superficials (fig.1A).

Per altra banda, els CBC nodulars solen presentar-se com una pàpula perlada, ben delimitada amb vora abrupta i telangiectàsies en superfície (fig.1B). La presència d'ulceracions o crostes centrals no és infreqüent. Alguns CBC nodulars presenten gran quantitat de pigment fent a vegades difícil el diagnòstic diferencial amb el melanoma.

Finalment, els CBC infiltrants i morfeiformes solen veure's clínicament com a plaques color pell (a vegades deprimides) amb ulceracions puntiformes en superfície (fig.1C). Encara que aquests últims poden ésser molt agressius i destructius localment, la presentació clínica pot ser molt subtil. És el cas de les variants esclerodermiformes o morfeiformes que solen presentar-se com una placa endurada molt mal delimitada, lleument deprimida d'un color habitualment nacarat.

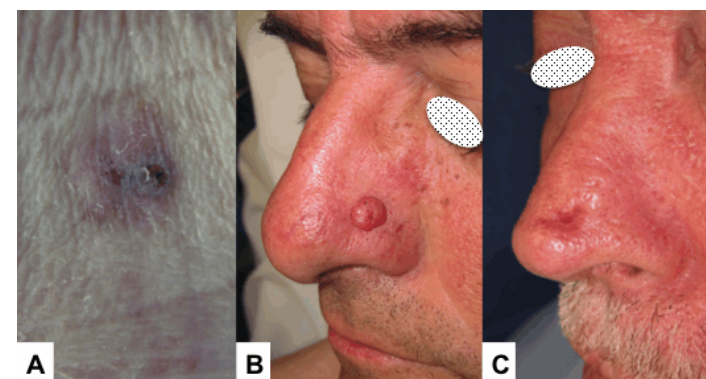


Figura 1. Subtipus clínics de carcinoma basocel·lular. A, superficial. B, nodular. C, infiltrant.

En els darrers anys, les tècniques d'imatge no invasives han fet el diagnòstic del CBC més acurat sense necessitat d'exploracions invasives com la biòpsia. La microscòpia d'epiluminiscència (dermatoscòpia) utilitza un sistema òptic que magnifica i polaritza la imatge evitant la refracció de la capa còrnia observant estructures tumorals no visibles a l'ull humà ni amb la magnificació simple (lupa). La dermatoscòpia ja és una tècnica d'exploració rutinària en la dermatologia d'avui dia (**fig.2**).

Per altra banda, la microscòpia confocal de reflectància (MCR) és un microscopi làser d'escombratge que ens permet veure in vivo la pell o tumors en temps real i amb resolució cèl·lular. Obté les imatges a partir de la diferent capacitat de les estructures cutànies de refractar la llum al ser travessades pel feix de llum làser (**fig.3**). Ambdues tècniques han demostrat augmentar la precisió diagnòstica en el melanoma (21,22) i altres tumors cutanis com el CBC (23,24).

Les metàstasis a distància són molt poc freqüents i se les ha relacionat més amb la mida i la profunditat d'infiltració del CBC que amb el subtipus histològic (25,26).

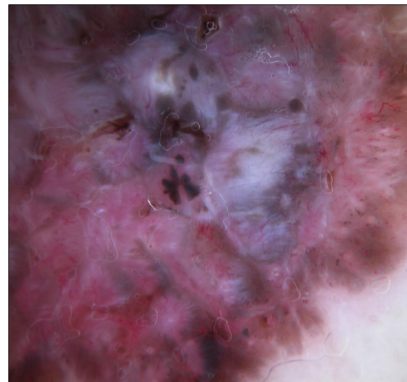


Figura 2. Dermatoscòpia de llum polaritzada . Carcinoma basocel·lular. Absència de reticle pigmentat amb zones en "fulla de faig" perifèriques, nius i glòbuls blau-gris, zones en "roda radiada", erosions i telangiectàsies ramificades

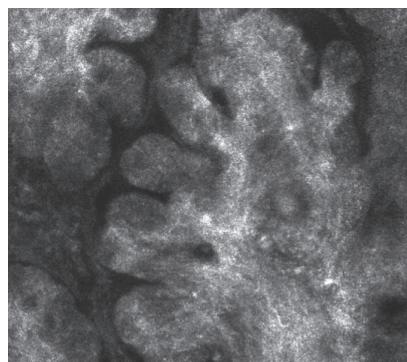


Figura 3. Microscòpia confocal de reflectància in vivo. Carcinoma basocel·lular. S'observa imatge hiper-refràctil (blanc) amb projeccions bulboses que corresponen als nius i cordons tumorals. A més, s'observa un espai perifèric hiporefràctil (negre) que correspon a la imatge in vivo de la fenestra típica de la histologia del carcinoma basocel·lular.

HISTOPATOLÒGICA

Tradicionalment i des del punt de vista histològic, els CBC s'han classificat en sòlids o indiferenciats i aquells que mostren alguna característica específica de diferenciació (ecrina, sebàcia, microglandular...). Emperò, hom sap que l'únic indicador histològic del comportament tumoral, i per això, determinat del tractament més adequat, és el patró arquitectural del seu creixement. Per altra banda, encara que la diferenciació histològica no sigui un factor clau en el seu comportament clínic és fonamental un diagnòstic acurat, car entraria dins del diagnòstic diferencial d'altres neoplàsies cutànies amb una alta capacitat per a produir metàstasis com són els carcinomes sebàcics o el carcinoma de Merkel amb el conseqüent risc d'infractament (18).

S'ha de saber, que les biòpsies parcials dels CBC (per afaitat o mitjançant punch) tenen un error intrínsec a l'hora de subclassificar els CBCs en els tipus histològics. De fet, només en un escàs 20% les biòpsies parcials prediuen el subtipus quan es compara amb l'estudi de la totalitat de la peça un cop ressecada quirúrgicament. L'explicació vindria donada pel fet que la transformació biològica dels CBC tendeix a ocórrer al marge profund i a les vores (24).

CBC indiferenciats

En relació al seu comportament clínic i biològic, els CBC indiferenciats es poden classificar en els de creixement indolent (superficials i nodulars) i aquells amb un creixement agressiu (infiltrants, micronodulars, morfeiformes i basoescatós o metatípic) (27).

En un estudi retrospectiu en el qual es varen recollir 1039 CBCs consecutius es va demostrar que el 21% eren nodulars, el 17.4% superficials, el 14.5% micronodulars, el 7.4% infiltrants i l'1.1% morfeiformes. A més, un de cada tres tumors mostrava alguna combinació dels esmenats subtipus (28).

CBC amb diferenciació específica

Aquests subtipus de CBC mostren característiques histològiques distintives per la diferenciació de les cèl·lules basaloïdes en altres tipus tissulars. Així, segons l'estirp cel·lular, s'inclouen dins aquest grup els següents (27):

1. Queratòsics: són proliferacions de cèl·lules basaloides nodulars que mostren cornificació central pseudoquística sense presència de capa granular.
2. Fol·liculars: presenten diferenciació que recorda la matriu fol·licular amb presència de cèl·lules "fantasma" i zones de calcificació semblant un pilomatricoma.
3. Infundíbuloquístics: les cèl·lules basaloides proliferen en continuïtat de l'epidermis suprajacent formant niu de queratina envoltats d'epiteli corni estratificat amb presència de capa granulosa.
4. Pleomòrfics: solen tenir una arquitectura nodular amb presència de cèl·lules amb un nucli hiper cromàtic gegant amb citoplasma amorf (monster cells).
5. Adenoides: mostren diferenciació glandular; tant glàndules sudorípares (ecrines i apocrines) com sebàcies.
6. Fibroepitelioma de Pinkus: forma bandes elongades de cèl·lules basaloides que formen una xarxa dins d'un estroma mixoide amb abundant col·làgena i cèl·lules fusiformes.

4. PATOGÈNESI

Hi ha dades que demostren que el CBC s'origina a partir de les cèl·lules epitelials basals del promontori fol·licular, del bulb i la matriu anagènica i de l'epidermis interfol·licular (29, 30). A més, es creu que aquestes són cèl·lules epitelials germinals pluripotencials car poden evolucionar a molt diverses formes clínicopatològiques amb comportament i evolució molt diferent (19).

Encara que l'aparició del CBC s'ha relacionat amb multitud de condicions i agents nosològics (immunodepressió, genodermatosis, exposició a arsènic, a quitrà o a la radiació ionitzant), és l'exposició a la RUV en persones amb fototipus baix (Fitzpatrick I i II) el principal factor de risc per a l'aparició i desenvolupament del CBC (2).

Altres factors de risc que s'han associat al desenvolupament de CBC són el consum d'alcohol o l'antecedent mèdic de transplantament d'òrgans sòlids, artritis reumatoide o malaltia inflamàtoria intestinal. Per altra banda, l'hàbit tabàquic tendria un efecte protector (14).

FOTOCARCINOGENESI

L'exposició a la RUV és el factor més implicat en la carcinogènesi del CBC. S'ha demostrat que les poblacions que viuen més a prop de l'Equador terrestre tenen més risc de desenvolupar CBC al llarg de la seva vida (31). Així existeix una relació inversa entre la latitud i la incidència de CBC. Quan la RUV incideix a la pell humana és absorbida per diferents estructures o substàncies (cromòfors). El DNA de les cèl·lules de la capa basal (melanòcits i queratinòcits) és el principal diana a la fotocarcinogènesi cutània (32).

La RUV provoca les seves accions nocives sobre les cèl·lules mitjançant dany agut i acumulatiu, immunodepressió cutània i dany tant directe com indirecte del DNA a través de l'estrès oxidatiu i la formació de radicals d'oxigen (superòxid) (33).

Encara que la RUV-B suposa només el 5% de la RUV que arriba a la superfície terrestre, ja que és majoritàriament filtrada per la capa d'ozó, és responsable de la major part del dany biològic directe a les cèl·lules epidèrmiques mitjançant la generació de dímers de pirimidina (fig. 4). Per altra banda, la RUV-A suposa el 95% de la RUV que arriba a la superfície terrestre. La RUV-A és la responsable de la inducció de la producció de melanoma, de la immunosupressió cutània i del dany oxidatiu cel·lular a través de la formació de radicals superòxid. A més, en els darrers anys s'ha demostrat que la RUV-A és capaç per sí sola de produir dany genètic directe, generant també dímers de pirimidina (34).

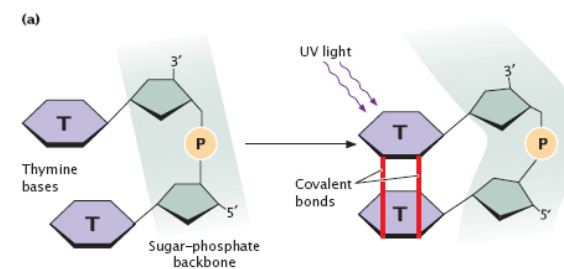


Figura 4. Dímer de pirimidina. Estructura química.

Encara que l'exposició a RUV acumulada a llarg termini sembla que augmenta el risc de CBC, hi ha estudis que suggereixen que l'exposició intermitent durant la infància que provoca cremades solars seria un factor de risc independent com passa amb el melanoma (35). Així, la distribució del carcinoma espinocel·lular i de les queratosis actíniques són un reflex del fotodany acumulat molt més acurat del que representa el CBC. Un 30% dels casos de CBC es donen en zones amb poc o gens dany solar (36).

Per altra banda, s'ha documentat que fins al 40% dels CBC esporàdics es poden documentar mutacions de l'oncogen p53, el 72% de les quals porten la signatura de la RUV (37). S'ha demostrat que aquesta mutació de p53 es dona en especial en aquells CBC de creixement agressiu (38,39) i se l'ha relacionat amb la fibroplàsia estromal que acompanya aquest tipus de CBC. Aquesta dependència de l'estroma tumoral és ben coneguda i és la responsable a través de l'alliberament de citocines i metal·loproteïnases de la digestió de la membrana basal i el potencial invasiu del tumor (19). Una altra via important en la carcinogènesi és la via hedgehog, important en el desenvolupament embrionari, com vorem en el següent apartat (40).

Per aquest motiu les variants de CBC poc agressives (nodulars i superficials) les podem trobar distribuïdes per tota la superfície corporal, tant a les zones fotoexposades com a les no exposades a la RUV. Emperò, les variants amb un comportament agressiu i alt potencial invasor (morfeiformes i microcordonals) són més freqüents a les zones fotoexposades com el cap i el coll (41).

Per tot això és que la RUV està inclosa des de l'any 2003 com a carcinogen demostrat a la llista del National Institute of Environmental Health Sciences dels EUA i recentment ha donat lloc a la prohibició de les cabines de RUV-A a Austràlia (2013) (42).

L'exposició acumulada a la radiació ionitzant (rajos X) també és una causa ben documentada d'inducció de CBC. En dècades passades s'havia utilitzat la radiació ionitzant per a condicions benignes (tinea capitis, acne, hirsutisme, hemangiomes) i, a dia d'avui, es continua utilitzant en oncologia radioteràpica. El rati estimat d'incidència és del 2% amb un temps de latència que sol ser llarg i la dosi acumulada necessària variable (43).

QUIMIOCARCINOGENÈSI

L'exposició a arsènic, en especial arsènic inorgànic, s'ha associat al desenvolupament de múltiples tipus de càncer de pell no melanoma, incloent el CBC (44). La forma més freqüent d'exposició avui dia és per la ingesta d'aigua contaminada (insecticides, mineria, indústria tèxtil...) o bé ocupacional a les indústries que ho manipulen. Abans de la dècada del 1950s, l'ús de la solució de Fowler (KAsO₂) per a diverses malalties (leucèmia, sífilis) era una font habitual d'exposició. A la literatura, els CBC induïts per arsènic es descriuen com a lesions múltiples juntament amb queratosis i de localització preferent al tronc (45).

Fins fa poc, les bases moleculars del CBC mediats per arsènic eren desconegudes. Recentment s'ha demostrat que l'exposició subcrònica a l'arsènic o derivats per part de l'epidermis indueix l'oncogènesi del CBC. De forma independent, l'arsènic activa les cinases intracel·lulars dependents de Yap, la qual es trasllada a l'interior del nucli promovent la transcripció de gens diana com Gli1, que podria estar involucrat en la proliferació cel·lular i per tant en l'oncogènesi del CBC (46).

Per altra banda, l'aplicació tòpica de mostassa nitrogenada augmenta la fotocarcinogènesi i s'ha associat amb una incidència de càncer de pell no melanoma, incloent el CBC, del 14% afectant tant la pell fotoexposada com no. La pell genital sembla que n'és especialment susceptible (44).

GENÈTICA

Com en molts tumors, la major part del avenços en la comprensió dels mecanismes moleculars i genètics que porten a la oncogènesi del CBC provenen dels estudis de pacients amb predisposició hereditària al desenvolupament dels mateixos. Encara que s'han descrit multitud de síndromes genètics que s'han associat a un alt risc de desenvolupar CBC com el Sd. Bazex-Dupré-Christol, el Sd. Rombo, la hipoplàsia catílag-pèl o el xeroderma pigmentós, és el Sd. De Gorlin-Goltz el més important en freqüència i el que més llum ha aportat a l'estudi dels mecanismes moleculars que desemboquen al CBC (2).

Síndrome de Gorlin-Goltz

Ja al 1894, Jarisch (47) i White (48) varen descriure una sèrie de pacients amb una predisposició molt marcada a l'aparició de CBC des d'una edat molt primerenca i amb característiques típiques d'una herència autosòmica dominant. Més tard, Howell (49) va relacionar la síndrome dels basocel·lulars múltiples amb altres anomalies somàtiques i finalment van ésser Gorlin i Goltz (50) al 1960 qui van descriure aquesta síndrome en profunditat. A més de l'aparició d'incomptables CBCs la síndrome de Gorlin-Goltz associa altres signes com són els pits palmars, queratoquistes de mandíbula, hipertelorisme o protuberàncies frontals.

No va ésser fins al 1996 que Johnson (51) va demostrar que mutacions inactivants del gen supressor de tumors Patched1 (Ptch1) a la línia germinal eren la causa de l'aparició descontrolada de múltiples CBCs en més del 90% dels casos.

Gen *PATCH* i la via *Hedgehog*

La via de senyalització intracel·lular *Hedgehog* (HH) té una importància cabdal durant la vida embrionària car regula la formació d'òrgans i teixits i és imprescindible per a la segmentació embrionària (52). A la vida adulta, la via HH roman inactiva com mostra la **figura 5**.

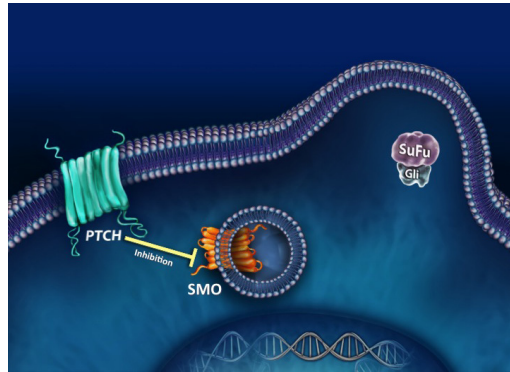


Figura 5. Via de senyalització *Hedgehog* (HH). En condicions normals l'activitat de PTCH manté inactivat SMO dins de vesícules endosòmiques lluny de la superfície de la membrana cel·lular. D'aquesta manera es mantenen inactivats els factors Gli i SuFu (depenents de SMO) encarregats de la transcripció de gens diana de la via HH que promouen la diferenciació i proliferació cel·lular.

Hom sap que *Ptch1* és un receptor transmembrana que ha demostrat tenir un paper important en la regulació de la via HH com a gen supressor de tumors però de la qual poc se'n sap a nivell mecanístic cel·lular (53). S'ha demostrat que el 93% de CBCs esporàdics tenen pèrdua d'heterocitat en una regió molt concreta i conservada del braç llarg del cromosoma 9 (9q21.1-31.1) que precisament on es troba localitzat el gen *PTCH1*; d'aquests, en el 70% es van demostrar mutacions somàtiques inactivants del gen *PTCH1* (54).

Així, el CBC seria un tumor genèticament homogeni on mutacions inactivants de *PATCH1* donarien una senyalització aberrant de la via HH amb activació de gens diana que controlen el cicle i la maduració cel·lular (**fig. 6**) com *GLI1*, *PTCH1* i *HHIP* (55).

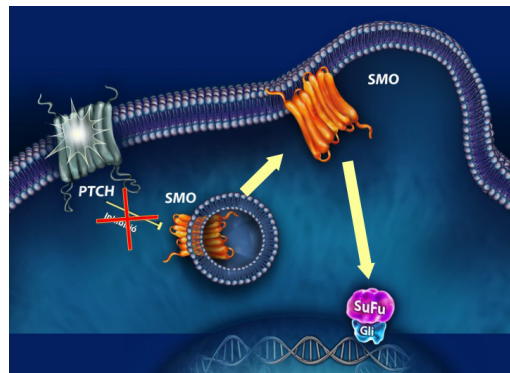


Figura 6. Activació anormal de la via *Hedgehog* (HH). Mutacions inactivants de *PTCH1* anul·len el seu efecte inhibitori sobre SMO que es desplaça fins a la membrana cel·lular. Un cop allà activaria factors de transcripció nuclears com Gli, SuFu o FOXM1 que promourien la transcripció de gens que perpetuarien la proliferació cel·lular.

Altres alteracions genètiques

A més de les descrites anteriorment s'han descrit altres alteracions genètiques que podrien potenciar la principal hiperactivació de la via del HH o inclús en alguns casos podrien ésser la principal.

Així, recentment s'ha descrit una major freqüència de determinats polimorfismes (-1154 G/A) del factor de creixement de l'endoteli vascular (VEGF) en pacients amb CBC comparat amb un grup control; a més, aquest polimorfisme podria estar relacionat amb uns nivells sèrics més elevats de VEGF que es relacionaria a una major agressivitat tumoral (56).

S'han trobat també mutacions al gen supressor de tumors p53 (57), a les vies de senyalització RAS y RAF (58) o a la β -caderina nuclear (via Wnt) (59) encara que no es conegui amb exactitud els mecanismes moleculars pels quals podrien condicionar el creixement i proliferació de les cèl·lules canceroses.

Noves dianes terapèutiques

La cirurgia completa amb demostració per o postoperatòria de la negativitat dels marges quirúrgics és el tractament d'elecció en la majoria de CBCs encara que altres teràpies com la radioteràpia, la crioteràpia, la teràpia fotodinàmica o l'imiquimod tòpic han demostrat també la seva utilitat en determinades situacions (60).

Coneguda la via HH de senyalització intracel·lular que està implicada en la carcinogènesi de la majoria de CBC esporàdics i associats a la Sd. De Gorlin, en els darrers anys s'han descrit diverses molècules que bloquegen la via HH. D'elles, la que més bon resultat ha obtingut en estudis previs i la qual ja la disposam comercialment és el vismodegib (GCD-0449). Vismodegib, és una molècula de petita mida que s'administra via oral i que inhibeix la via HH a través de la seva unió a SMO i que ha demostrat la seva eficàcia en pacients amb CBC localment avançat irressecables quirúrgicament, en CBC metastàsics (61) i en pacients amb CBCs múltiples (62). Per últim, ja hi ha evidència de que el vismodegib podria ésser útil com a tractament neoadjuvant per a reduir el volum tumoral prèvia a la cirurgia (63).

II. CIRURGIA ONCOLÒGICA DEL CARCINOMA BASOCEL·LULAR

Encara que la cirurgia convencional amb marges predeterminats és un tractament efectiu del CBC tan primari com recidivat (nivell d'evidència A-I), les taxes de recidives són als 5 anys del 2-5% i del 8-10% respectivament després d'una exèresi histològicament lliure de lesió (64). Hom atribueix aquest fet a què a les seccions histològiques verticals convencionals només s'examina una superfície inferior a l'1% dels marges reals de la lesió (65).

A més, com que la majoria (80%) dels CBC tributaris de tractament quirúrgic es localitzen a la cara, no és infreqüent que els marges establerts per protocol no es puguin assolir sense comprometre estructures anatòmiques i/o funcionals importants.

1. LA TÈCNICA DE MOHS

La cirurgia oncològica cutània amb control microscòpic dels marges per la tècnica de Mohs-Tromovich (CMM) consisteix a controlar peroperatòriament el 100% dels marges tumorals. D'aquesta forma s'aconsegueix el doble objectiu d'assegurar la negativitat dels marges quirúrgics reals així com la preservació del màxim de teixit i estructures sanes perilesionals.

La CMM aconsegueix les més altes taxes de curació que podem oferir als nostres pacients amb CBC (99-100% dels tumors primaris (66) y 95-96% dels tumors recidivants (67)) inclús en aquells d'alt risc amb un nivell d'evidència científica A-I. A més, encara que el cost absolut per cada acte quirúrgic és superior al de la cirurgia convencional, és probablement una tècnica que resulta cost-efectiva pel sistema sanitari en la mesura en què les recidives són gairebé inexistentes (68).

Les indicacions actuals de la CMM es troben resumides a l'ANNEX I.

QUIMIO-MICRO CIRURGIA DE MOHS

L'any 1932, el Dr. Frederic E. Mohs treballava a la Càtedra de Zoologia de la Universitat de Wisconsin com a becari estudiant les reaccions inflamatores dels teixits cancerosos (69). Estava provant diversos irritants a la pell de rates de laboratori quan, a l'injectar clorur de zenc al 20% va produir inesperadament una important necrosi tissular al lloc de la punxada. Tanmateix, el teixit necròtic es va ressecar i examinar al microscopi. La sorpresa va venir quan es va veure l'excel·lent preservació microscòpica de les estruc-

tures tissulars i cel·lulars. S'havia descobert un mètode de fixació del teixit in vivo capaç de mantenir l'arquitectura tissular per al seu estudi microscòpic.

Aquest fet aïllat no revesteix de més importància, emperò s'havia iniciat el camí pel qual després d'uns anys de desenvolupament de la tècnica, FE Mohs descriuria la primera tècnica per al mapeig complet dels marges quirúrgics durant la cirurgia oncològica cutània: la quimio-micro-cirurgia (69) que porta el seu nom.

FE Mohs va fer proves amb multitud d'agents i substàncies alternatives per a fixar la pell in vivo. Alguns els va descartar perquè produïen necrosi amb liqüefacció del teixit (àlcals càustics), altres per la seva toxicitat sistèmica (triòxid d'arsènic, fenol, clorur de mercuri o triclorur d'antimoni), per les males característiques organolèptiques (formol) o pel risc d'argíria (nitrat de plata). Així, el clorur de zinc (ZnCl) semblava que era el fixador in vivo amb més avantatges: té una penetrància en el teixit constant, previsible i controlable, no té toxicitat sistèmica apreciable, bona organolèptica, bo i segur de manejar i a més no altera l'ulterior cicatrització de les ferides. Es va determinar que el vehicle més adequat per a afavorir la penetració del clorur de zinc al teixit era la pasta d'estibnita al qual s'afegia un extracte de planta (*Sanguinaria canadensis*, *Phytolacca decandra*, *Podophyllum peltatum* o *Inula helenium*) com a aglutinant del vehicle per a mantenir la consistència.

La fórmula de la pasta de ZnCl més utilitzada fou:

Estibnita.....40.0 mg
Sanguinaria canadensis.....10.0 mg
Solució satura de clorur de Zn.....34.5 cc

La metodologia proposta per FE Mohs seguia les següents passes:

-Preparació per a la quimiocirurgia.

Un dels factors que més limita la penetració de ZnCl a la pell és la barrera de queratina. Per aquest motiu a la tècnica original s'aplicava una capa variable d'àcid dicloracètic o tricloracètic abans de fixar el teixit, especialment en aquells carcinomes escatosos molt cornificants.

-Fixació in vivo del tumor.

Es realitzava mitjançant l'aplicació d'una capa de pasta de ZnCl d'espessor variable entre 1 i 3 mm depenent de la profunditat prevista del tumor. El temps d'aplicació de la pasta de ZnCl és variable i pot anar des de 2 hores a 1 dia. Això depèn en gran mesura de la capacitat de penetració del ZnCl en cada teixit. Així teixits com la queratina, l'os, el múscul o l'augment a la vascularització local disminueixen la penetració i en canvi, el cartílag, el greix o teixits hipovasculares com cicatrius o pell amb radiodermitis l'augmenten.

-Resecció del primer estadi.

Una vegada el teixit s'havia fixat in vivo es procedia a la resecció amb bisturí fred del primer estadi. Aquest acte no requeria anestèsia ni coagulació, car es tallava a través del teixit ja fixat. Es realitzava un dibuix a escala de la peça i de l'entorn anatòmic on es trobava i es dividia en un número variable de submostres. A cadascuna es marcaven les vores amb un codi particular de colors per a no perdre l'orientació.

-Estudi microscòpic.

Cada una de les mostres extretes i marcades es giraven, congelaven i tallaven amb el micròtom i se n'analitzaven els marges lateral i profund. Si en algun es visualitzava tumor es marcava al gràfic i es repetia el procés fins a la seva negativització.

Emperò aquesta metodologia consumia molt temps, doncs el pacient romania ingressat durant tot el procediment. Tanmateix, era una tècnica dolorosa durant el temps de fixació in vivo del teixit.

METODOLOGIA CLÀSSICA:

CIRURGIA MICROCONTROLADA DE MOHS-TROMOVICH

L'any 1974, Tromovich i Stegman (70) varen proposar un nou mètode (ja insinuat per FE Mohs anys abans a localitzacions com la parpella on l'aplicació de la pasta era perillosa, incòmode i poc pràctica) per a fer el procés més àgil i confortable pel pacient. Van proposar eliminar la fixació in vivo i varen desenvolupar i millorar la tècnica en congelat que suposà la instauració dels fonaments de la tècnica moderna que se segueix en l'actualitat.

La tècnica de CMM actual consisteix a realitzar, de forma sistemàtica i ordenada, una de seqüència de passes denominades "estadis". A cada estadi es controla microscòpicament els marges exteriors (reals) fins a aconseguir la seva negativitat de forma que s'analitzen intraoperatòriament el 100% dels marges tumorals.

La seqüència habitual seria la següent:

1. Incisió.

Primer de tot es realitza curetatge o debulking de la porció central del tumor per a facilitar la presa de les mostres subseqüents. El primer estadi s'inicia amb un marge lateral d'1 mm a partir de la lesió clínica o dermatoscòpicament visible amb una incisió tangencial de les vores a 45° de la superfície cutània. Es procura que el tall sigui el més homogeni possible i en forma de cúpula invertida per a facilitar la posterior manipulació de la peça.

2. Mapeig orientat de la mostra:

1. Es dibuixa una reproducció a escala de la mostra ressecada a mida real sobre una figura que representa la zona anatòmica en què es localitza el tumor. S'utilitzen fotocòpies de dissenys anatòmics a les quals hi ha de constar el nom del pacient, la data de la cirurgia i l'estadi al que correspon. Sobre el gràfic es realitza una representació de les seccions en les quals es dividirà la mostra i el color amb el qual es marcarà cada marge. Es numeren amb números romans l'estadi i amb números decimals la secció corresponent. Per exemple, **I1** correspondria al primer estadi, secció 1.

2. La mostra de teixit extirpat es divideix en seccions d' aproximadament 1 o 1.2 cm² de superfície cadascuna les quals són orientades i marcades amb tinta líquida a les cares no-epidèrmiques amb un codi de colors propi estandarditzat. Per a cada estadi es dissenya un nou mapa.

3. Processat de les mostres.

Un tècnic especialitzat realitza un segon debulking del centre de la mostra, deixant només els marges lateral i profund que s'aplanen. Així s'ha convertit una estructura tri-dimensional en bidimensional en un sol pla per a procedir al seu estudi histològic com mostra la **figura 7**.

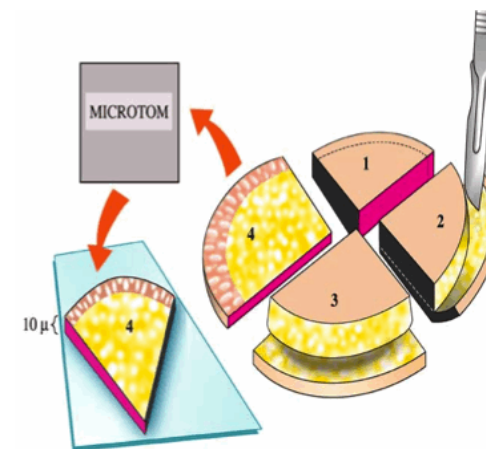


Figura 7. Processat de la mostra. Com que el que interessa és l'estudi del 100% dels marges reals de la mostra, es retira la part central per tal que les seves 3 dimensions es converteixen en les 2 dimensions que posteriorment estudiarem al microscopi.

Cada secció es col·loca a un criòtom de capçal mòbil que congela la mostra instantàniament (entre -25° i -30°C) i es talla en seccions d'entre 4 i 10 micres (μm) de gruix. Es comença a tallar pel marge quirúrgic exterior o real de forma que s'ha d'anar molt en compte de no profunditzar gaire, car es podria arribar al CBC així resultant en un fals positiu del marge en qüestió. Cada secció es tenyeix amb un colorant histològic i es munta en les laminetes corresponents. El més habitualment utilitzat és la hematoxilina-eosina (H/E), encara que el blau de toluidina (BT) és molt útil en localitzacions com el nas on el CBC es pot confondre amb la gran densitat de fol·licles pilosebàcics. En la tinció amb BT, l'estroma que acompanya els CBCs té metacromàsia rosada fet que no s'observa en els fol·licles.

4. Estudi microscòpic dels marges quirúrgics.

És el cirurgià de Mohs, juntament amb el metge patòleg en alguns països europeus, els responsables d'analitzar al microscopi les preparacions histològiques cercant restes de CBC residual als marges. Si a la preparació es detecta alguna resta de CBC el cirurgià ho senyala en color vermell sobre el mapa dibuixat anteriorment a la localització exacta (fig. 8) per a tornar al quiròfan per a ressecat el següent estadi específicament en el lloc on s'ha demostrat que hi havia persistència tumoral.

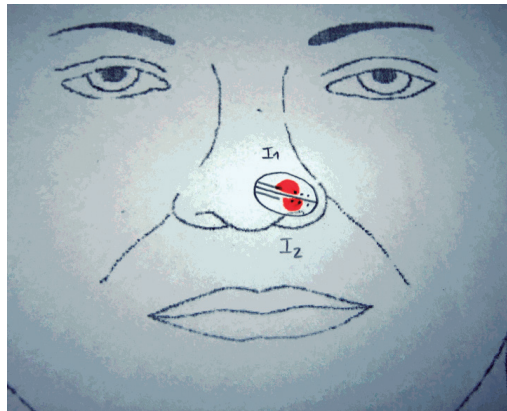


Figura 8. Mapa de cirurgia de Mohs. Sobre una plantilla que representa la zona anatòmica es dibuixa el defecte del primer estadi i la positivitat per CBC (vermell).

Tanmateix, aquesta metodologia no està exempta d'errors metodològics que podrien donar unes imatges inexactes, falsos negatius amb les conseqüents recidives tumorals. El pas crític és el processat de la mostra, concretament l'aplanament de la peça (tres dimensions) per a visualitzar-la al microscopi en un sol pla (dues dimensions). Si l'equip no està ben sincronitzat i entrenat no és difícil cometre inexactituds.

CIRURGIA AMB CONTROL TRIDIMENSIONAL DELS MARGES

A la darrera dècada ha aparegut multitud de publicacions (71, 72, 73) a la literatura en les quals es proposa una modificació de la tècnica habitual o clàssica de la CMM. Totes elles proposen controlar el 100% dels marges tumorals, tant els laterals com el profund.

Encara que s'han descrit diferents variants, la més acceptada és la que quadrangula el primer estadi realitzant talls a 90° de la superfície cutània obtenint-ne un paral·lelepípede tridimensional (hexaedre romboidal). A partir d'aquesta figura s'obtenen 4 seccions verticals corresponents al 4 costats o punts cardinals així com el fons del mateix que es processen d'igual forma que en la versió clàssica de la CMM (fig.9).

D'aquesta manera s'obtenen talls o seccions rectilínies i verticals en tots els casos que són molt més fàcils de processar. Com que no s'han d'aplanar, perquè ja són seccions rectilínies, s'eviten artefactes en el tall i la tinció i així les preparacions que s'obtenen amb aquesta tècnica solen ser de millor qualitat.

A més, la localització de restes de CBC en els marges quirúrgics és més acurada. En la tècnica clàssica, tant el marge lateral com el profund s'acaben visualitzant en un sol pla. Es pot donar el cas en què sorgeixi el dubte de si la persistència tumoral està al marge profund o al lateral i d'aquesta forma al següent estadi s'agafi tant marge lateral com profund amb el conseqüent malbaratament de pell sana perilesional.

Amb la tècnica del control de marges tridimensional aquest fet no es dona, car estem visualitzant 4 marges laterals i 1 profund. A més, quan s'analitzen al microscopi els marges laterals es pot avaluar molt millor la profunditat real a la qual es troba el tumor.

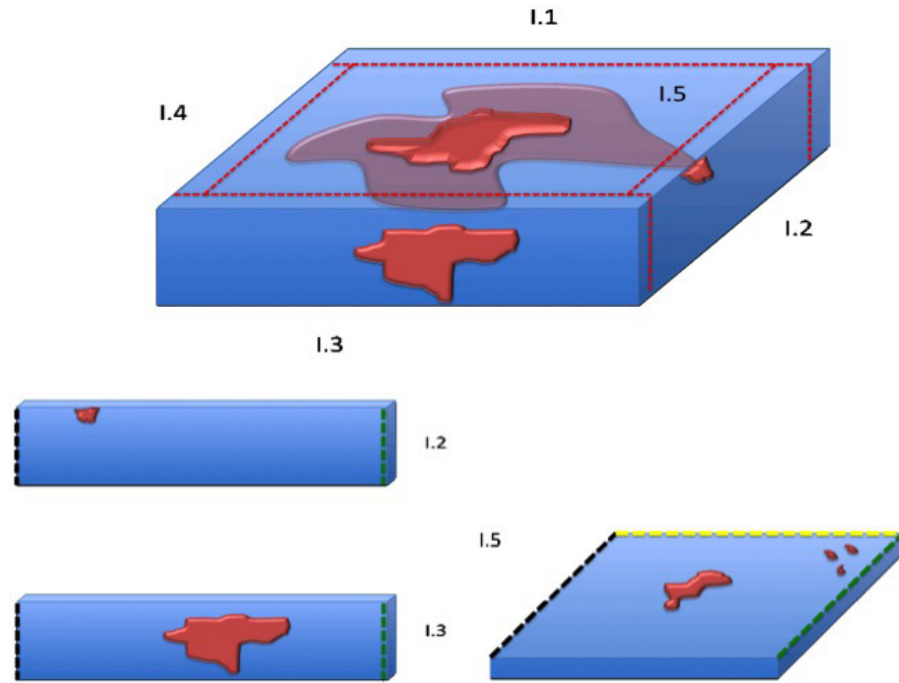


Figura 9. Representació esquemàtica de la cirurgia amb control tridimensional dels marges. A partir de la lesió clínicament visible en superfície s'inicia el primer estadi amb 1-2 mm de marge lateral quadrangulant la peça.

Encara que al nostre centre, gairebé totes les cirurgies de Mohs es realitzen seguint aquesta tècnica de control tridimensional dels marges, els treballs aquí presentats es van realitzar seguint la tècnica clàssica de Mohs, molt més acceptada i estandarditzada als països anglosaxons i per tant per la comunitat científica internacional.

III. LA MICROSCÒPIA CONFOCAL DE FLUORESCÈNCIA

La microscòpia confocal (MC) és una nova tècnica d'imatge que utilitza un làser d'escombratge per a obtenir imatges amb resolució cel·lular en temps real sense necessitat de processar el teixit. Utilitza un làser díode de baixa potència que emet un feix de llum que serà reflectit per diferents estructures del teixit a estudi per ésser posteriorment captat per un receptor (74).

Els primers MC que es varen desenvolupar foren els de reflectància (MCR), en els quals el feix de llum làser que incidia sobre la pell in vivo és reflectit al travessar estructures amb diferent índex de refracció (75). D'aquesta forma s'obtenen imatges d'alta definició tissular en temps real de la pell in vivo. Aquestes imatges s'obtenen de forma no invasiva, ja que no requereixen de fixació ni processat previ del teixit (76).

Més recentment, s'ha desenvolupat el MC de fluorescència (MCF) (77), en el què el feix de llum làser té una longitud d'ona específica capaç d'ésser captada per un cromòfor específic. El cromòfor del qual es té més experiència és el taronja d'acridina, colorant que és captat per les cèl·lules nucleades, s'uneix específicament al DNA i RNA de la cèl·lula marcant així els nuclis. En aquest cas, s'ha demostrat que l'ús del taronja d'acridina pot augmentar fins a 1000 vegades el contrast nuclear-citoplasmàtic i el nuclear-dèrmic a les imatges de MCF (78). A més, com que la dermis és una estructura composta principalment de fibres de col·lagena i elàstiques és molt pobre en cèl·lules, essent l'autofluorescència pròpia de la dermis pràcticament nul·la. Aquest fet, permet un enorme contrast entre la dermis (afluorescent) i les estructures epitelials nucleades hiperfluorescents que en ella es poguessin trobar com poden ésser unitats pil·losebàcies, glàndules ecrines o tumors epitelials (CBC, carcinoma escatós).

D'aquesta manera, amb la MCF ex vivo es poden obtenir imatges en temps real i amb resolució cel·lular qualsevol teixit amb un processament mínim de la peça (79) (**fig.10**).

L'aparell de MCF (VivaScope 2500; Caliber Imaging and Diagnostics, Rochester, NY, U.S.A.) (**fig.11**) és un microscopi làser d'escombratge multimodal basat en 3 làsers de baixa potència amb longituds d'ona de 658 (taronja-vermell), 445 nm (blau) i 830 nm (reflectància).

Aquest MCF escaneja la mostra obtenint imatges de 750 x 750 μm que posteriorment seran unides adequadament per a formar mosaics en 2 dimensions de fins a 144 mm^2 (12 x 12 mm) corresponent a un augment de 2X del microscopi òptic convencional (lupa).

Així, estudis previs (80) han demostrat l'efectivitat del MCF en la detecció de restes CBC al marge quirúrgic durant la cirurgia de Mohs. A més, últimament (81, 82) s'ha treballat en augmentar la rapidesa de recollida de les imatges dels aparells de MFC podent fer la tècnica de la CMM una tècnica cost-efectiva molt atractiva per la medicina del futur (83), (84).

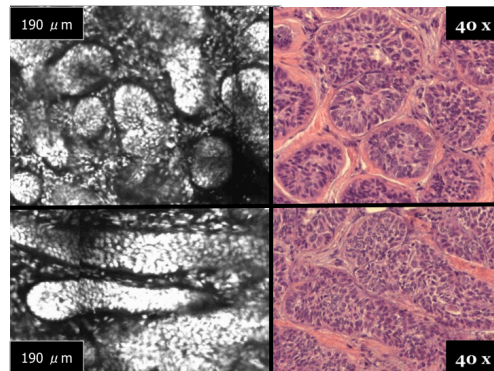


Figura 10. Carcinoma basocel·lular cordonal. S'observen nius i cordons de cèl·lules hiperfluorescents (esquerra) i les corresponents a la tinció amb hematoxilina i eosina (dreta).

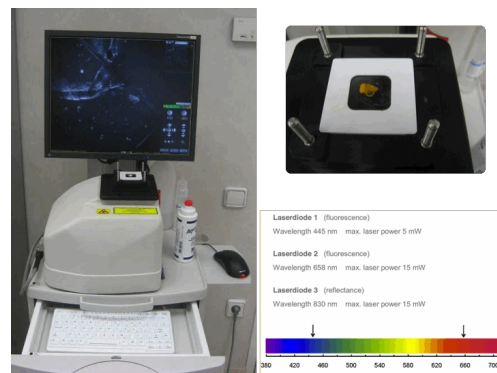


Figura 11. Microscopi confocal de fluorescència multilàser. S'observa la simplicitat de l'estructura on destaquen una platina on es col·loca la mostra i la pantalla d'alta definició per a veure les imatges en temps real. A més, es mostren les longituds d'ona de cadascun dels 3 làsers que pote metre.

HIPÒTESIS DE TREBALL

1. La MCF ex vivo és una eina útil en la visualització i estudi de teixits en fresc i en temps real.
2. Les imatges obtingudes mitjançant MCF ex vivo tenen una bona correlació morfològica amb les seccions histològiques en congelat de les peces quirúrgiques de CBC ressecat amb cirurgia de Mohs.
3. Hi ha criteris morfològics específics de CBC a les imatges de MCF que farien possible diferenciar-ho de les altres estructures annexials de la pell normal.
4. La MCF ex vivo és una eina útil en la detecció de restes de CBC residual als marges quirúrgics durant la cirurgia de Mohs.
5. La utilització de la MCF durant la cirurgia de Mohs en l'avaluació dels marges quirúrgics és un mètode més ràpid que el convencional en congelat.

OBJECTIU PRINCIPAL

Demostrar que la MCF ex vivo és una eina útil en la detecció intraoperatòria de restes de carcinoma basocel·lular durant la cirurgia oncològica cutània mitjançant la tècnica de Mohs-Tromovich.

OBJECTIUS ESPECÍFICS

1. Descriure i validar criteris diagnòstics de CBC a les imatges obtingudes per MCF ex vivo:
 - a. Comparar les freqüències del criteris al CBC i comparació amb les estructures annexials de la pell normal.
 - b. Comparar les freqüències dels criteris als principals subtipus de CBC (superficial, nodular i infiltrant).
 - c. Validació interobservador del criteris descrits
2. Descriure el grau de correlació entre la MCF i l'estudi histològic de rutina en la classificació entre els diferents subtipus histològics de CBC (superficial, nodular i infiltrant-micronodular)
3. Valorar mitjançant MCF ex vivo l'afectació dels marges quirúrgics de CBC ressecats per cirurgia de Mohs:
 - a. Comparació amb el "patró or" que és la histologia en congelat per a determinar la sensibilitat, especificitat, valor predictiu positiu i valor predictiu negatiu de la MCF ex vivo en la detecció de CBC residual.
 - b. Determinar el temps invertit en el processament de la mostra fins a obtenir les imatges per MCF ex vivo i comparar-la amb el processament en congelat clàssic.

MATERIAL I MÈTODES
RESULTATS

PUBLICACIONS

Original Investigation

Fast Evaluation of 69 Basal Cell Carcinomas With Ex Vivo Fluorescence Confocal Microscopy Criteria Description, Histopathological Correlation, and Interobserver Agreement

Antoni Bennàssar, MD; Cristina Carrera, MD; Susana Puig, MD, PhD; Antoni Vilalta, MD; Josep Malvehy, MD, PhD

IMPORTANCE Fluorescence confocal microscopy (FCM) represents a first step toward a rapid “bedside pathology” in the Mohs surgery setting and in other fields of general pathology.

OBJECTIVE To describe and validate FCM criteria for the main basal cell carcinoma (BCC) subtypes and to demonstrate the overall agreement with classic pathologic analysis of hematoxylin-eosin-stained samples.

DESIGN A total of 69 BCCs from 66 patients were prospectively imaged using ex vivo FCM. Confocal mosaics were evaluated in real time and compared with classic pathologic analysis.

SETTING Department of Dermatology, Hospital Clínic of Barcelona, Barcelona, Spain, between November 2010 and July 2011.

PARTICIPANTS Patients with BCC attending the Mohs Surgery Unit.

MAIN OUTCOMES AND MEASURES Presence or absence of BCC and histological subtype (superficial, nodular, and infiltrating) in the confocal mosaics. Eight criteria for BCC were described, evaluated, and validated.

RESULTS Although there were minor differences among BCC subtypes, the most BCC-defining criteria were peripheral palisading, clefting, nuclear pleomorphism, and presence of stroma. These criteria were validated with independent observers (κ values >0.7 for most criteria).

CONCLUSIONS AND RELEVANCE We herein propose, describe, and validate FCM criteria for BCC diagnosis. Fluorescence confocal microscopy is an attractive alternative to histopathologic analysis of frozen sections during Mohs surgery because large areas of freshly excised tissue can be assessed in real time without the need for tissue processing while minimizing labor and costs.

JAMA Dermatol. 2013;149(7):839-847. doi:10.1001/jamadermatol.2013.459
Published online May 1, 2013.

Author Affiliations: Melanoma Unit, Department of Dermatology, Hospital Clínic and Institut d'Investigacions Biomèdiques Agustí Pi i Sunyer, Barcelona, Spain (Bennàssar, Carrera, Puig, Vilalta, Malvehy); Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras (CIBERER), Barcelona, Spain (Carrera, Puig, Malvehy).

Corresponding Author: Antoni Bennàssar, MD, Department of Dermatology, Hospital Clínic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain (tbennassar@gmail.com).

Real-time high-resolution imaging of human skin is possible in vivo but can also be performed ex vivo with a confocal microscope.¹ Confocal mosaicing microscopy offers an attractive alternative to histopathologic analysis of frozen sections during Mohs surgery because cellular morphology can be observed, in real time, in thin optical sections and directly in freshly excised tissue.^{2,3}

Acetic acid was first used as a contrast agent to brighten nuclei in reflectance-mode confocal microscopy (RCM). In RCM, large, densely nucleated basal cell carcinomas (BCCs) are easily detected in mosaics. However, tiny strands of micronodular-infiltrating BCCs remain hidden in RCM mosaics because of the bright scattering interference of the surrounding normal dermis (strong reflectance).^{4,5} In the fluorescence mode, a contrast agent that specifically stains nuclei (acridine orange) is used. With fluorescence confocal microscopy (FCM), acridine orange increases the contrast between the nuclei and dermis of BCC cells 1000-fold, and only weak fluorescence is collected from the surrounding dermis. Thus, both large and small BCCs are detected in mosaics.⁶

Fluorescence confocal microscopy devices display large areas of tissue with high resolution and low magnification in a manner that is analogous to that seen in thin histopathologic sections. Confocal images (750 × 750 μm) are stitched together to create mosaics to display large areas of tissue, as required for surgical pathologic analysis. Modern FCM devices are able to display wide field of view mosaics of up to 12 × 12 mm; this corresponds to a view with 2× magnification—a view that is routinely used by Mohs surgeons when reading frozen pathologic sections with a standard light microscope.^{4,6} Mosaics are created in less than 3 minutes, whereas histopathologic analysis of frozen sections is time consuming, requiring 15 to 30 minutes per stage.⁷

However, this new imaging technique is entirely different and therefore must be validated. Recent studies have demonstrated an excellent correlation between ex vivo FCM images and histopathologic findings for nonmelanoma skin cancer.⁶ In a blind evaluation, residual BCC was detected in freshly excised Mohs tissue with an overall high sensitivity and specificity when compared with the gold standard of frozen section stained with hematoxylin-eosin (H&E).⁸⁻¹⁰

Fluorescence confocal microscopy has the potential to improve diagnostic accuracy. Moreover, large-area mosaicing may offer a means for rapid examination of BCC directly in fresh excisions while minimizing labor and costs. Ex vivo FCM is the biggest advance in Mohs surgery for decades and may evolve into an entirely new alternative to histopathologic analysis of frozen sections. The technology may enable the implementation of rapid surgical bedside pathologic analysis to guide Mohs surgery.

The feasibility of FCM for rapid bedside pathologic analysis has been widely described with good sensitivity and specificity^{5,9,10} and may represent a time-saving alternative to the use of frozen sections during classic Mohs surgery or microscopically controlled surgery.^{4,11,12} However, to our knowledge, no diagnostic BCC criteria have been reported to date.

The goals of this study are 2-fold. First, we aim to describe and validate FCM criteria for BCC because they are lacking in the medical literature. Second, we also want to de-

Table 1. Characteristics of 69 Tumors in 66 Patients

Characteristic	Value, ^a No. (%) (N=69)
Age of patient, mean (range), y	71.9 (27-96)
Sex of patient	
Male	44 (64)
Female	25 (36)
Location	
Nose	30 (43)
Eyelid	2 (3)
Forehead	16 (23)
Cheek	3 (4)
Chin	2 (3)
Ear	6 (9)
Trunk	7 (10)
Neck	3 (4)
Status	
Primary	64 (93)
Recurrence	5 (7)
Histological subtype	
Micronodular-infiltrating	51 (74)
Nodular	12 (17)
Superficial	6 (9)

^a Data are given as number (percentage) of tumors unless otherwise specified.

scribe FCM characteristics and criteria for the main BCC subtypes and validate them, demonstrating the overall agreement with classic pathologic analysis.

Methods

Study Sample and Tissue Collection

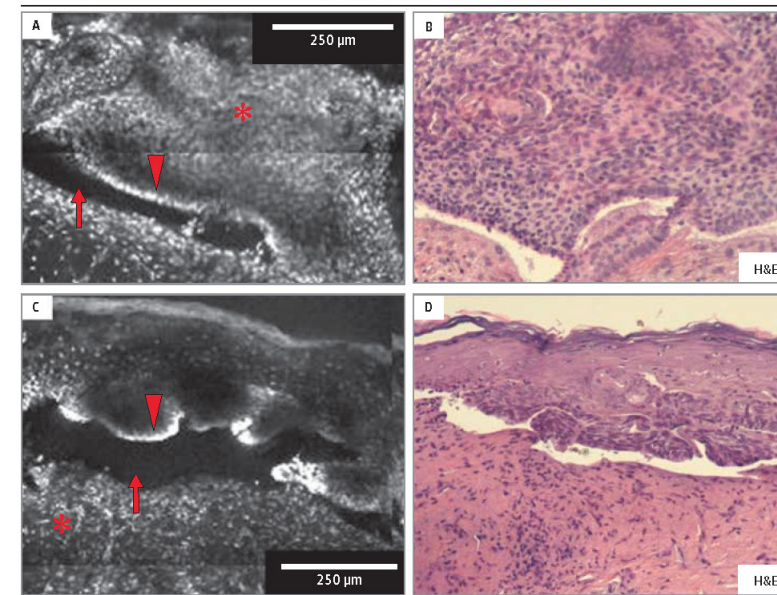
Eighty consecutive patients from our Mohs Surgery Unit (Hospital Clínic, Barcelona, Spain) with 84 surgically removed BCCs were prospectively enrolled in the study. All patients underwent classic Mohs surgery (45° incision), and all lesions were at least 1 cm in their maximum diameter. The study was approved by the ethics committee of the Hospital Clínic and the University of Barcelona, Spain (registry No. 2010/5492).

Details of tumor location, status (primary or recurrence), and histopathologic subtype, as well as patient demographic data, are listed in Table 1. A 1-mm vertical central strip of tissue from the first Mohs stage center was taken without disruption of the tissue margins for ulterior frozen section assessment. All 84 lesion centers were imaged under FCM, creating a 12 × 12 mm Viva-block mosaic for each one. For technical reasons, 15 panels were not optimal for evaluation and were discarded. Finally, 69 tumor specimens from 66 patients were evaluated. Both surgery and FCM mosaicing imaging were performed prospectively by the first author (A.B.) during Mohs surgery.

Fluorescence Confocal Microscopy

Confocal mosaics were acquired using a modified version of a commercially available ex vivo laser scanning FCM (Viva-scope 2500; Lucid Inc); this FCM version is specially de-

Figure 1. Fluorescence Confocal Microscopy (FCM) Features of Basal Cell Carcinoma (BCC)



This image composition shows a superficial BCC under FCM and the histopathological counterpart with hematoxylin-eosin (H&E) stain. A, A well-circumscribed mass (nuclear crowding) of pleomorphic hyperfluorescent bright dots (asterisk) with peripheral palisading (arrowhead) and clefting (arrow). B, Histopathological counterpart showing superficial BCC with classic palisading and clefting (H&E, original magnification ×10). C, Dark space (arrow) underneath hyperfluorescent nuclei within the epidermal basal layer arranged with palisading (arrowhead). The dermis appears with high nuclear density (asterisk) corresponding to stromal activated fibroblasts and inflammatory infiltrate. D, Histopathological counterpart showing superficial BCC (H&E, original magnification ×4) with corresponding nucleated tumoral stroma.

signed for ex vivo imaging of freshly excised tissue samples. All samples were directly immersed in a 1mM solution of acridine orange for 20 to 30 seconds depending on sample thickness and finally rinsed in isotonic saline solution in preparation for confocal imaging.

Acridine orange provides a strong contrast between nucleus and dermis because it specifically stains the DNA (and also RNA) of nucleated cells. With FCM, only weak fluorescence is collected from the dermis and subcutaneous fat, therefore increasing the contrast of epithelial cells 1000-fold, including epidermis, adnexal structures, and BCC cells. Equally important is the fact that acridine orange immersion affects neither subsequent frozen sections nor the quality of formalin-fixed histopathologic sections.⁶ To detect orange fluorescence, the wavelength used was 488 nm from the diode laser; illumination laser power was automatically set, but the depth had to be manually adjusted.

For each skin specimen a 12 × 12 mm mosaic was created, such that the magnification is equivalent to that of a standard low-power 2× view of optical microscopes. It took 150 seconds to display each 12 × 12 mm panel and 20 additional seconds for the subsequent image stitching. The instrumentation, imaging, and technical details have been described by Gareau et al.⁸

Mosaic Evaluation

Immediately after surgery, all displayed FCM mosaics from freshly excised samples were evaluated by the attending Mohs surgeon (A.B.) in real time in the operating room. He is experienced in analysis of both frozen Mohs slides and FCM images because he has been formally trained in both fields. Moreover, he has experience in RCM technology, evaluating benign and malignant lesions. For comparison with classic pathologic analy-

sis (gold standard), the corresponding formalin-fixed slides stained with H&E or toluidine blue were processed and obtained for all samples. Permanent formalin-fixed pathologic slides were blindly read by our dermatopathologists.

Fluorescence confocal microscopy panels were visualized at a 2× magnification at first glance and then at 4× (pan-zoom tool), mimicking the usual frozen section slide reading process during Mohs surgery. “Zooming” mosaics at higher magnifications of 10× to 30× were performed on the samples from only a few patients when necessary.

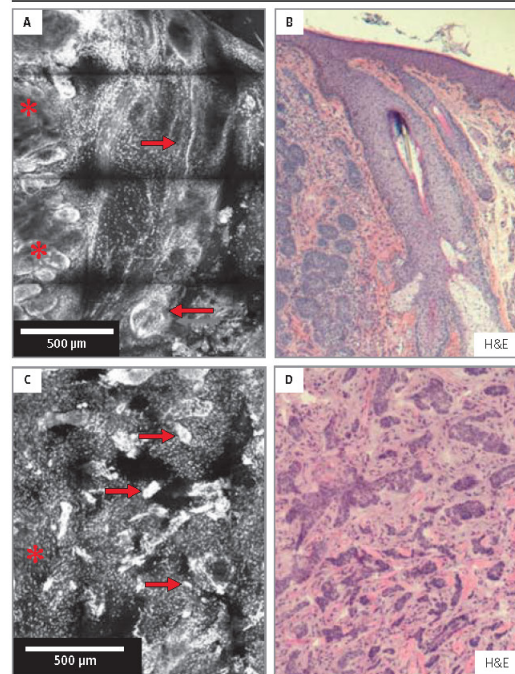
To our knowledge, BCC characteristics under FCM have not been described as yet. Fluorescence confocal microscopy displays mosaics that reproduce the architecture of normal skin, as well as tumor shape, in real time with cellular resolution. However, when visualizing FCM mosaics we can use neither color terminology as in H&E classic pathologic analysis nor structure refractility as in RCM. In FCM we must describe structures in terms of their fluorescence emission. Thus, nucleated skin structures, such as the epidermis, adnexal structures, and BCC, are described as fluorescent. In contrast, the dermis has only a few cellular structures; thus, fluorescence emission is expected to be absent or weak.

The first step in the evaluation of mosaics consisted in the identification of BCC presence or absence and histological subtype, including superficial BCC (sBCC), nodular BCC (nBCC), and micronodular-infiltrative BCC (iBCC). Each FCM panel was classified into 1 of these 3 subtypes on the basis of general tumor shape and distribution of fluorescent nests and strands of BCC.

FCM Criteria for BCC

Classic histopathological BCC features were adapted on FCM images. Eight criteria, including presence of fluorescence, tu-

Figure 2. Fluorescence Confocal Microscopy (FCM) Features of Basal Cell Carcinoma (BCC)



A, FCM image of a nodular BCC composed of multiple, well-demarcated nests of fluorescent pleomorphic cells with peripheral palisading (asterisks). A hair follicle is also clearly seen (arrows) and the "starry sky" image in between corresponding to BCC stroma. B, Note the striking correspondence to the pathological counterpart (hematoxylin-eosin [H&E], original magnification $\times 4$). C, FCM view of a micronodular-infiltrating BCC. High-density hyperfluorescent thin strands of BCC (arrows) are infiltrating a very nucleated stroma (asterisk). Note that there is no clear palisading or clefting. D, Histological counterpart showing microinfiltrating BCC within a sclerosing stroma (H&E, original magnification $\times 10$).

mor demarcation, nuclear crowding, peripheral palisading, clefting, nuclear pleomorphism, increased nuclear to cytoplasm (N/C) ratio, and stroma, were described and evaluated (Figure 1 and Figure 2).

Fluorescence. Presence of fluorescence was determined when bright-white images were seen on the screen. Fluorescence corresponds to nucleated cells stained with acridine orange. Absence of fluorescence is seen as a black background.

Tumor demarcation. Tumor shape was divided into 2 categories, ill defined when a line could not be clearly drawn to separate the tumor from the surrounding tissue and well demarcated when one could be.

Nuclear crowding. Nuclear crowding was determined when the nuclear density was higher than that of the surrounding epidermis and adnexal structures.

Peripheral palisading. Palisading is described as peripheral polarized and aligned fluorescent ellipses, being the counterpart of the so-called criteria in formalin-fixed H&E-stained

slides; it corresponds to the prominent tendency of the outermost row of basal cells to be arranged in a parallel-polarized way.

Clefting. Clefting is a black fluorescence-free half-moon attached to the tumor mass.

Nuclear pleomorphism. Nuclear pleomorphism is a deviation from the normal round or oval nuclear outline present in normal keratinocytes.

Enlarged N/C ratio. As tumoral cells, BCC cells are supposed to have an enlarged N/C ratio when compared with normal keratinocytes. Thus, under FCM, BCC nests are seen as crowded masses of elongated heterogeneous spots of fluorescence (prominent nuclei) with poor or absent cytoplasm.

Stroma. Tumoral stroma is the modified dermis surrounding the BCC mass. When viewed in FCM mosaics, the stroma is seen as a more densely nucleated dermis, as fluorescent dots within a black background. This image is characteristic and is reminiscent of a "starry sky" in which the "stars" correspond to inflammatory cells and activated fibroblast nuclei. The amount of stroma within the tumor was evaluated in a semiquantitative manner.

Results

A total of 69 surgically removed BCCs from 66 patients were imaged. Forty-four of the tumors (64%) came from male patients and 25 from female patients (36%), with a mean (range) patient age of 71.9 years (27-96 years). The nose was the most frequent location (43%), followed by the forehead (23%), trunk (10%), ear (9%), neck (4%), cheek (4%), chin (3%), and eyelid (3%). Most of the BCCs were primary (93%), and the main histological subtype was micronodular-infiltrating, representing approximately three-quarters of the tumors. These results are summarized in Table 1.

FCM Criteria for BCCs

Basal cell carcinoma consists of a malignant proliferation of basaloid cells with prominent nuclei; thus, BCC nests and strands were hyperfluorescent when viewed under FCM. Fluorescence from dermal cells (lymphocytes and fibroblasts), hair follicle (HF) keratinocytes, and eccrine gland (EG) cells was also observed.

Approximately two-thirds of the BCCs were considered well demarcated. The surrounding dermis was obviously ill defined, but 91% of the HFs and all EG cells were considered well demarcated. These differences were statistically significant.

The proposed FCM criteria for BCCs of nuclear crowding (91%), palisading (96%), and nuclear pleomorphism (100%) were present in almost all BCCs. Nuclear crowding was also present in 94% of HFs, especially in the bulb, but less frequently in the surrounding dermis and was almost absent in EG cells. Palisading was one of the most characteristic FCM criteria for BCC. It was present in 96% of BCCs but almost absent in the surrounding dermis and adnexal structures. Thus, this criterion has a high sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV).

Table 2. Fluorescence Confocal Microscopy (FCM) Criteria for BCC and Correlation With Other Skin Structures

FCM Criteria ^a	No. (%)		P Value	%			
	BCC (n = 69)	Surrounding Dermis (n = 138)		Se	Sp	PPV	NPV
Fluorescence presence	69 (100)	130 (94)	.054
Well demarcated	43 (62)	0	<.005	62	100	100	84
Nuclear crowding	63 (91)	98 (71)	.001	91	29	39	87
Palisading	66 (96)	0	<.005	96	100	100	98
Clefting	36 (52)	0	<.005	61	100	100	86
Nuclear pleomorphism	69 (100)	74 (54)	<.005	100	46	48	100
Increased N/C ratio	69 (100)	138 (100)
Presence of stroma	65 (94)	130 (94)	>.99
	BCC (n = 69)		Hair Follicles (n = 138)				
Fluorescence presence	69 (100)	138 (100)	
Well demarcated	43 (62)	125 (91)	<.005	62	9	26	33
Nuclear crowding	63 (91)	130 (94)	.50	
Palisading	66 (96)	5 (4)	<.005	96	96	93	98
Clefting	36 (52)	0	<.005	61	100	100	86
Nuclear pleomorphism	69 (100)	8 (6)	<.005	100	94	90	100
Increased N/C ratio	69 (100)	11 (8)	<.005	100	92	86	100
Presence of stroma	65 (94)	0	<.005	94	100	100	97
	BCC (n = 69)		Eccrine Gland Cells (n = 138)				
Fluorescence presence	69 (100)	138 (100)	
Well demarcated	43 (62)	138 (100)	<.005	62	0	24	0
Nuclear crowding	63 (91)	10 (7)	<.005	91	93	86	96
Palisading	66 (96)	13 (9)	<.005	96	91	84	98
Clefting	36 (52)	0	<.005	61	100	100	86
Nuclear pleomorphism	69 (100)	0	<.005	100	100	100	100
Increased N/C ratio	69 (100)	138 (100)	
Presence of stroma	65 (94)	0	<.005	94	100	100	97

Abbreviations: BCC, basal cell carcinoma; N/C ratio, nuclear to cytoplasm ratio; NPV, negative predictive value; PPV, predictive positive value; Se, sensitivity; Sp, specificity.

^a Eight FCM criteria for BCC were described on the basis of fluorescence images and compared with normal skin structures.

Even though clefting was observed in only roughly half of the BCCs, this criterion was 100% specific and the PPV was 100% in as far as it was not present in any of the remaining skin structures.

Nuclear pleomorphism was observed in all BCCs but only in approximately half of the surrounding dermis and in 6% of HFs. No EG cells presented nuclear pleomorphism. Thus, sensitivity and NPV for this criterion were 100%.

Enlargement of the N/C ratio was present in all BCC cells, surrounding dermis cells (lymphocytes and fibroblasts), and EG cells. In HFs, a few bulb cells showed an increased N/C ratio, but most of them and all HF shaft keratinocytes had a low N/C ratio similar to that of normal epidermis.

Basal cell carcinoma stroma was present in 94% of BCCs but was not observed in any HFs or EG cells. Thus, when compared with adnexal structures, the presence of stroma has a 100% specificity and PPV. These results are summarized in Table 2.

FCM Differences Among BCC Subtypes

As Table 3 shows, there were no statistically significant differences between BCC subtypes when comparing fluores-

cence, palisading, nuclear pleomorphism, and N/C ratio because all these criteria were present in most BCCs.

All nBCCs were considered well demarcated. However, the tumor limits were clearly defined in only 31% and 14% of iBCCs and sBCCs, respectively. All iBCCs and nBCCs presented nuclear crowding, but just 1 sBCC (14%) had an increased nuclear density. All sBCCs and most nBCCs showed clefting images, yet just 38% of iBCCs presented clefting.

In reference to tumoral stroma, 29% of sBCCs had no stroma and 57% had poor stroma. In contrast, in 90% and 98% of nBCCs and iBCCs, respectively, tumoral stroma images were observed. These differences were statistically significant.

Correlation Between FCM and H&E Differentiating BCC Subtypes

When viewed under FCM, all BCC mosaics were classified by the Mohs surgeon into 1 of the 3 main BCC subtypes, sBCC, nBCC, or iBCC (Figures 3, 4, and 5, respectively). Independently, our dermatopathologist performed the same procedure with H&E slides. The overall agreement between both techniques and observers was high ($\kappa = 0.9$).

Table 3. Basal Cell Carcinoma (BCC) Subtype Differences

FCM Criteria	No. (%)		χ^2	P Value ^a
	BCC (n = 69 [100%])	sBCC (n = 7 [10%])		
Fluorescence presence	69 (100)	7 (100)	NS	...
Well demarcated	27 (39)	1 (14)	18.9	<.001
Nuclear crowding	63 (91)	1 (14)	58.2	<.001
Palisading	66 (96)	7 (100)	1.0	.60
Clefting	36 (52)	7 (100)	16.1	<.001
Nuclear pleomorphism	69 (100)	7 (100)	0.3	.85
Increased N/C ratio	69 (100)	7 (100)
Stroma				
Absent	4 (6)	2 (29)	15.8	<.005
<50%	16 (23)	4 (57)		
>50%	49 (71)	1 (14)		
FCM Criteria	No. (%)		χ^2	P Value ^a
	BCC (n = 69 [100%])	nBCC (n = 10 [14%])		
Fluorescence presence	69 (100)	10 (100)	NS	...
Well demarcated	27 (39)	10 (100)	18.9	<.001
Nuclear crowding	63 (91)	10 (100)	58.2	<.001
Palisading	66 (96)	10 (100)	1.0	.60
Clefting	36 (52)	9 (90)	16.1	<.001
Nuclear pleomorphism	69 (100)	10 (100)	0.3	.85
Increased N/C ratio	69 (100)	10 (100)
Stroma				
Absent	4 (6)	1 (10)	15.8	<.005
<50%	16 (23)	1 (10)		
>50%	49 (71)	8 (80)		
FCM Criteria	No. (%)		χ^2	P Value ^a
	BCC (n = 69 [100%])	iBCC (n = 52 [75%])		
Fluorescence presence	69 (100)	52 (100)	NS	...
Well demarcated	27 (39)	16 (31)	18.9	<.001
Nuclear crowding	63 (91)	52 (100)	58.2	<.001
Palisading	66 (96)	49 (94)	1.0	.60
Clefting	36 (52)	20 (38)	16.1	<.001
Nuclear pleomorphism	69 (100)	51 (98)	0.3	.85
Increased N/C ratio	69 (100)	52 (100)
Stroma				
Absent	4 (6)	1 (2)	15.8	<.005
<50%	16 (23)	11 (21)		
>50%	49 (71)	40 (77)		

Abbreviations: iBCC, infiltrating BCC; nBCC, nodular BCC; N/C ratio, nuclear-to-cytoplasm ratio; NS, not significant; sBCC, superficial BCC.
^a There were statistically significant differences between BCC subtypes in demarcation, nuclear crowding, clefting, and stroma.

Interobserver Correlation

Criteria validation was carried out by means of cross tables between the main author and 2 independent observers (C.C. and J.M.) evaluating each FCM criterion for BCC. These criteria were validated with κ values greater than 0.7 for most criteria in both independent observers as given in Table 4.

Discussion

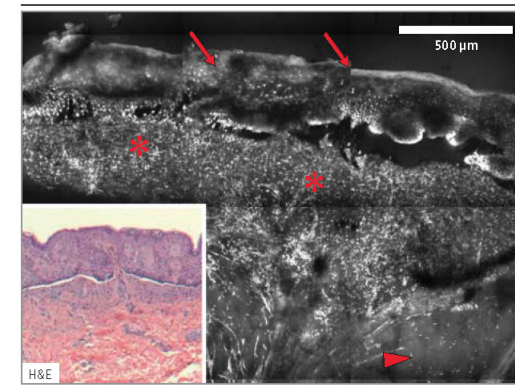
Ex vivo FCM is a new imaging tool capable of displaying large areas of tissue with a high resolution in a manner that is analogous to that seen in thin sections of histopathologic samples.^{4,5} Ex vivo FCM may represent an alternative to histopathologic analysis of frozen samples during Mohs surgery because surgical margins can be assessed in real time directly in freshly excised tissue,^{9,10,12} thus saving time and resources.

However, this new imaging method is entirely different from existing techniques and therefore must be validated. There are many reports demonstrating an excellent correlation between ex vivo FCM images and histopathologic analysis for nonmelanoma skin cancer.^{3,8-10} However, none have reported a structured description of FCM features for BCCs nor validated truthful criteria to differentiate it from the surrounding dermis and adnexal structures

FCM Criteria for BCCs

Fluorescence confocal microscopy collects fluorescence from nucleated cells such as BCC nests and strands, basal layers of the epidermis, and adnexal structures including HFs and eccrine sweat glands. Dermal fluorescence is weak, and only within the tumoral stroma can nucleated cells be observed, corresponding to inflammatory lymphocytes and activated fibroblasts.

Figure 3. Fluorescence Confocal Microscopy Mosaic of Superficial Basal Cell Carcinoma (BCC)



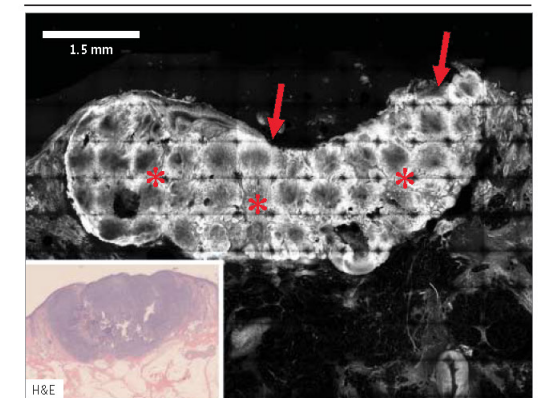
There is an ill-defined proliferation in the basal epidermal layer. There is a high density of pleomorphic hyperfluorescent dots corresponding to BCC nuclei arranged with peripheral palisading. A fluorescence-free black area corresponding to clefting is separating the tumor from its stroma. The BCC stroma is seen as a densely nucleated dermis appearing as fluorescent dots within a black background, giving the characteristic "starry sky" image (asterisks). These nuclei correspond to activated fibroblasts and inflammatory lymphocytes. The former stroma is clearly differentiated from the normal dermis shown as gray-black collagen bundles (arrowhead) with sparse nuclei. Significant is the regular epidermis appearance (arrows) where the higher the layer is, the less density of fluorescent dots are seen, here reproducing the normal keratinocyte nuclear apoptosis. The stratum corneum is seen as light-gray waves with a striking correspondence to the classic pathologic analysis image. Inset: The corresponding histopathological picture (hematoxylin-eosin [H&E], original magnification $\times 4$).

Fluorescence confocal microscopy displays mosaic images where the more fluorescence one structure collects and subsequently delivers, the brighter it appears on the screen. When a structure does not contain nuclei, no acridine orange is fixed. The structure therefore lacks fluorescence and appears gray or black on the screen. Thus, when visualizing FCM images we should describe the structure first of all by its fluorescence and forget about refractile structures such as in RCM or colors as in classic histopathologic analysis with H&E. This concept seems obvious, but it is the mainstay in FCM. Thus, under FCM, tumoral cells, HFs, EGs, and reactive cells within the tumoral stroma appear hyperfluorescent. However, we should point out that normal dermis does not have any fluorescence and therefore is usually seen as black or gray-black.

In addition, most BCCs and adnexal structures were determined as hyperfluorescent, well-defined bright spots as far as one can precisely demarcate the limits. Fluorescence in the surrounding dermis was diffuse and ill defined.

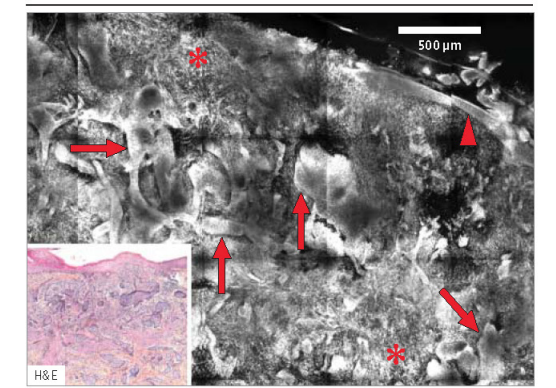
On the basis of classic histopathologic analysis, 5 morphological-fluorescent criteria for BCC were defined, including nuclear crowding, palisading, clefting, nuclear pleomorphism, and increased N/C ratio. Nuclear crowding was present in most BCCs, but it was also observed in some adnexal structures and in high-density inflammation surrounding the tumor. Therefore, although it is not a very specific criterion, it has a high NPV.

Figure 4. Fluorescence Confocal Microscopy Mosaic of Nodular Basal Cell Carcinoma (BCC) Showing a Well-Demarcated Mass of BCC Composed of Crowded Nests and Islands of Pleomorphic Fluorescent Nuclei Arranged With Peripheral Palisading (Asterisks)



There is no or a weak inflammatory response or stromal reaction. Note the interruption of the normal epidermis in the upper region showing the tumor ulceration (arrows). Inset: Striking correlation of general skin architecture and normal skin structures (dermis, fat tissue, hair follicles, and eccrine glands) with pathological slide (hematoxylin-eosin [H&E], original magnification $\times 2$).

Figure 5. Fluorescence Confocal Microscopy (FCM) Mosaic of Infiltrating Basal Cell Carcinoma (iBCC)



Under FCM, iBCC is seen as a proliferation of nests and thin strands composed of densely packed, pleomorphic hyperfluorescent nuclei infiltrating throughout the dermis (arrows). Note that in the former highly invasive thin iBCC strands periphery the nuclei are not arranged with palisading and there is a lack of clefting images. The surrounding dermis has a high density of fluorescent dots corresponding to nucleated cells from the tumoral stroma (asterisks), including inflammatory lymphocytes and activated fibroblasts. There is tumor ulceration in the central region, but the remaining epidermis has a normal appearance (arrowhead). Inset: The corresponding histopathological picture (hematoxylin-eosin [H&E], original magnification $\times 4$).

Peripheral palisading and clefting were the best BCC-defining FCM criteria. Palisading was present in most BCCs, and even though clefting was observed in roughly half the BCCs, these criteria were almost pathognomonic for BCC and

Table 4. Interobserver Agreement

Observation	Observer ^a	
	1	2
Fluorescence presence	1	1
Well demarcated	0.78	0.68
Nuclear crowding	0.78	0.68
Palisading	0.90	0.76
Clefting	0.90	0.70
Nuclear pleomorphism	0.86	0.86
Increased enlargement of the N/C ratio	0.70	0.74
Stroma presence	0.87	0.87

Abbreviation: N/C ratio, nuclear to cytoplasm ratio.

^a The κ value was calculated for each observer compared with the first author.

the PPV was almost 100%, as far as they were seldom present in any of the remaining skin structures.

Nuclear pleomorphism was observed in all BCCs but only in approximately half of the surrounding dermis and in 6% of HFs, but no EG cells showed nuclear pleomorphism. We suggest that this criterion describes a deviation from the round or elliptical nuclear shape and is the counterpart of the so-called nuclear atypia in classic BCC pathologic analysis with H&E. It could be observed in some activated fibroblasts in the surrounding dermis and in some HF bulbs, but the differences are significant.

Enlargement of the N/C ratio was present in all BCC cells, surrounding dermis cells, and EG cells as far as activated fibroblasts, inflammatory lymphocytes, and ductal cells have prominent nuclei and barely show cytoplasm. In HFs, some of the bulb cells showed increased N/C ratio, but most of them and all HF shaft keratinocytes had a low N/C ratio similar to that of normal epidermis.

In summary, when analyzing an FCM mosaic, if we have a well-circumscribed mass or lobule of pleomorphic hyperfluorescent bright dots with a striking tendency to arrange themselves with peripheral palisading next to the clefting, the likelihood of it being BCC is high.

The BCC stroma FCM image is highly specific and is reminiscent of a starry sky. It was present in 94% of BCCs and their surrounding dermis, but it was never observed in any HFs or EG cells. Thus, when compared with adnexal structures, the presence of stroma is very specific and has a PPV of 100%. We would like to highlight and stress the importance of this criterion. According to our experience, in some cases we observed the starry sky image within the freshly excised tumor true margin but we were unable to spot a single BCC nest. Afterward, the Mohs histotechnician went deeper with the cryostat and then the frozen sections stained with H&E showed the presence of BCC. So, as in classic Mohs frozen section reading, all inflammatory foci should be thoroughly investigated for tumor presence (A.B. 2011, unpublished data).

FCM Differences Among BCC Subtypes

We can conclude that BCC under FCM is seen as hyperfluorescent aggregates of pleomorphic nuclei with peripheral

palisading arrangement and enlargement of the N/C ratio.

In sBCCs, fluorescent dots corresponding to tumoral nuclei were sparsely distributed along the basal layer of the epidermis without crowding images; here most sBCCs were described as ill defined. Clefting was present in all sBCCs. Moreover, sBCCs had less stromal reaction and inflammation than nBCCs and iBCCs.

Nodular BCCs are seen as a well-demarcated nodular crowding of hyperfluorescent pleomorphic nuclei with high N/C ratio. Fluorescent dots corresponding to tumoral nuclei were arranged in a parallel way in the periphery, and in most mosaics the starry sky image corresponding to stroma was also observed. Tumoral dermis was separated from the main BCC islands by black fluorescence-free areas corresponding to clefting.

Under FCM, iBCCs can be described as nests and strands composed of fluorescent pleomorphic dots infiltrating the surrounding dermis. The thinner the strands are, the less nuclear crowding, palisading, and clefting are present and the more ill defined the tumor is. Furthermore, iBCCs are accompanied by a strong stromal and inflammatory reaction.

Correlation Between FCM and H&E in Differentiation of BCC Subtypes

There was a high overall agreement between the FCM mosaics viewed by the Mohs surgeon and the H&E slides evaluated by a dermatopathologist ($\kappa = 0.9$) classifying BCC subtypes. This good agreement was possible because FCM images have cellular resolution and an excellent morphologic correlation with classic H&E histopathological slides.

Conclusion

Ex vivo FCM is a newly developed technology that may be an attractive alternative to frozen or paraffin-fixed, H&E-stained histological sections during Mohs surgery because freshly excised tissue can be imaged without the need for tissue processing. Furthermore, it takes only a few minutes to obtain a 12 × 12-mm FCM mosaic, compared with 15 to 30 minutes with classic pathologic analysis techniques. This represents a first step toward a rapid “bedside pathology.”

There are a few articles analyzing the sensitivity, specificity, PPV, and NPV of FCM in evaluating residual BCC in Mohs surgery margins. However, to our knowledge, the FCM fluorescent and morphological characteristics for BCC have not been described thus far.

We herein propose, describe, and validate the criteria for BCC diagnosis under FCM. Moreover, we demonstrate that there is a high correlation with the findings of the dermatopathologist when specimens are classified into the main BCC subtypes and an excellent correlation with frozen sections. However, more studies are required to validate this technique such that it can be incorporated into daily practice in a Mohs surgery setting.

ARTICLE INFORMATION

Accepted for Publication: February 4, 2013.

Published Online: May 1, 2013.
doi:10.1001/jamadermatol.2013.459.

Author Contributions: All authors had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Study concept and design: Bennàssar, Puig, Vilalta, and Malvehy.

Acquisition of data: Bennàssar.

Analysis and interpretation of data: Bennàssar, Carrera, Puig, and Malvehy.

Drafting of the manuscript: Bennàssar.

Critical revision of the manuscript for important intellectual content: All authors.

Statistical analysis: Puig.

Administrative, technical, and material support: Bennàssar.

Study supervision: Bennàssar, Puig, Vilalta, and Malvehy.

Conflict of Interest Disclosures: None reported.

Funding/Support: This study was supported in part by personal grants to Dr Bennàssar from Hospital Clínic de Barcelona “Emili Letang” and partially supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) grant 09/1393 (CIBERER U-726, ISCIII).

Role of the Sponsors: The sponsors had no role in the design and conduct of the study; in the collection, analysis, and interpretation of data; or in the preparation, review, or approval of the manuscript.

Additional Contributions: We are indebted to our dermatopathologists, J. Palou, MD, A. García, MD, and L. Alós, MD, PhD, for their unselfish contribution to critical review of the manuscript. Donation of medical equipment: we borrowed the Vivascope 2500 from Lucid Inc for 8 months.

Correction: This article was corrected online May 20, 2013, for an error in the Results section of the abstract.

REFERENCES

- Gonzalez SG, Gill M, Halpern AC, eds. *Reflectance Confocal Microscopy of Cutaneous Tumors*. London, England: Informa UK; 2008.
- Chung VQ, Dwyer PJ, Nehal KS, et al. Use of ex vivo confocal scanning laser microscopy during Mohs surgery for nonmelanoma skin cancers. *Dermatol Surg*. 2004;30(12, pt 1):1470-1478.
- 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(5):1137-1143.
- Patel YG, Nehal KS, Aranda I, Li Y, Halpern AC, Rajadhyaksha M. Confocal reflectance mosaicing of basal cell carcinomas in Mohs surgical skin excisions. *J Biomed Opt*. 2007;12(3):034027.
- Gareau DS, Patel YG, Li Y, et al. Confocal mosaicing microscopy in skin excisions: a demonstration of rapid surgical pathology. *J Microsc*. 2009;233(1):149-159.
- Gareau DS, Li Y, Huang B, Eastman Z, Nehal KS, Rajadhyaksha M. Confocal mosaicing microscopy in Mohs skin excisions: feasibility of rapid surgical pathology. *J Biomed Opt*. 2008;13(5):054001.
- Abeytunge S, Li Y, Larson B, Toledo-Crow R, Rajadhyaksha M. Rapid confocal imaging of large areas of excised tissue with strip mosaicing. *J Biomed Opt*. 2011;16(5):050504.
- Gareau DS, Karen JK, Dusza SW, Tudisco M, Nehal KS, Rajadhyaksha M. Sensitivity and specificity for detecting basal cell carcinomas in Mohs excisions with confocal fluorescence mosaicing microscopy. *J Biomed Opt*. 2009;14(3):034012.
- Ziefle S, Schüle D, Breuninger H, Schippert W, Moehrl M. Confocal laser scanning microscopy vs 3-dimensional histologic imaging in basal cell carcinoma. *Arch Dermatol*. 2010;146(8):843-847.
- Karen JK, Gareau DS, Dusza SW, Tudisco M, Rajadhyaksha M, Nehal KS. Detection of basal cell carcinomas in Mohs excisions with fluorescence confocal mosaicing microscopy. *Br J Dermatol*. 2009;160(6):1242-1250.
- Schüle D, Breuninger H, Schippert W, Dietz K, Moehrl M. Confocal laser scanning microscopy in micrographic surgery (three-dimensional histology) of basal cell carcinomas. *Br J Dermatol*. 2009;161(3):698-700.
- Bennàssar A, Vilalta A, Carrera C, Puig S, Malvehy J. Rapid diagnosis of two facial papules using ex vivo fluorescence confocal microscopy: toward a rapid bedside pathology. *Dermatol Surg*. 2012;38(9):1548-1551.

TREBALL 1

“Fast evaluation of 69 basal cell carcinoma with ex vivo fluorescence confocal microscopy. Criteria description, histopathological correlation and interobserver agreement”

Antoni Bennàssar , Cristina Carrera , Antoni Vilalta , Susana Puig, Josep Malvehy

JAMA Dermatol 2013; 149(7):839-847.

Factor d'impacte: 4,76

RESUM

Fonaments

La microscòpia confocal de fluorescència (MCF) és una nova tècnica d'imatge que representa un primer pas en la patologia computeritzada a temps real. Això podria tenir una aplicabilitat cabdal immediata a la cirurgia de Mohs i en un futur a tots el camps de la patologia general.

Objectius

1. Descriure i validar criteris de carcinoma basocel·lular a les imatges de FCM analitzant la concordança intraobservador i interobservador
2. Analitzar el grau de concordança en la classificació dels CBC en els principals subtipus histològics (superficial, nodular i infiltrant) entre la MCF i la histologia convencional en mostres tenyides amb hematoxilina/eosina.

Metodologia

Estudi prospectiu on es recolliren imatges de MCF de la part central de carcinomes basocel·lulars tributaris de cirurgia de Mohs per a la descripció i validació interobservador de criteris definitoris per a la diferenciació amb les estructures annexials de la pell normal.

Resultats

1. Descripció de criteris de CBC en els mosaics de MCF

Es descriuen 8 criteris morfològics definitoris de CBC als mosaics de MCF: presència de fluorescència, bona delimitació, agregació nuclear, estacada perifèrica, fenedura, pleomorfisme nuclear, augmento del rati nucli/citoplasma i presència d'estroma.

Els criteris que resultaren esser més definitoris de CBC amb diferències estadísticament significatives ($p < 0.005$) en comparació amb les estructures annexials de la pell normal foren: l'estacada perifèrica, la fenedura, el pleomorfisme nuclear així com la presència d'estroma al voltant del tumor.

Aquests criteris foren validats amb 2 observadors independents mostrant una bona correlació ($\kappa > 0.7$).

2. Correlació en la classificació dels subtipus histològics de CBC

Es va demostrar una molt bona correlació morfològica entre l'investigador principal classificant els mosaics de MCF entre els principals subtipus histològics de CBC (superficial, nodular i infiltrant-cordonal) i el patòleg al valorar les preparacions histològiques convencionals ($\kappa 0.9$).

Conclusions

En aquest treball els autors proposen, descriuen i validen criteris de CBC pel seu diagnòstic als mosaics de MCF.

La MCF és una alternativa de futur a la histologia convencional, amb especial potencial a la cirurgia de Mohs, car permet una visualització del teixit amb resolució cel·lular en fresc i en temps real.

Ex vivo fluorescence confocal microscopy for fast evaluation of tumour margins during Mohs surgery

A. Bennàssar,¹ A. Vilata,¹ S. Puig^{1,2} and J. Malveyh^{1,2}¹Melanoma Unit, Dermatology Department, Hospital Clínic & IDIBAPS (Institut d'Investigacions Biomèdiques Agustí Pi i Sunyer), Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain²Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras (CIBERER), Barcelona, Spain

Summary

Background Ex vivo fluorescence confocal microscopy (FCM) enables real-time imaging of skin morphology directly in freshly excised tissue. FCM displays wide field-of-view mosaics with cellular resolution, thus enabling a rapid bedside pathology. An application of interest is rapid detection of residual basal cell carcinoma (BCC) in skin excisions during Mohs surgery.

Objectives We sought to evaluate the sensitivity and specificity of ex vivo imaging with FCM for the detection of residual BCC in Mohs tissue excisions, and to calculate the time invested up to the diagnosis for both FCM and frozen sections.

Methods Eighty consecutive BCCs were prospectively collected and the margins scanned with ex vivo FCM, including excisions with and without residual BCC of all major subtypes. Each mosaic was divided into two or four, resulting in 480 submosaics for study. Every confocal submosaic was assessed for the presence or absence of BCC and compared with standard frozen sections as the gold standard. Furthermore, the time spent for each technique was calculated and compared.

Results The overall sensitivity and specificity of detecting residual BCC were 88% and 99%, respectively. Moreover, the new technique reduced by almost two-thirds the time invested when compared with the processing of a frozen section ($P < 0.001$).

Conclusions The results demonstrate the feasibility of confocal mosaicing microscopy in fresh tissue for rapid surgical pathology, potentially to expedite and guide Mohs surgery with high accuracy. This observation is an important step towards the goal of using real-time surgical pathology for skin tumours.

What's already known about this topic?

- Ex vivo fluorescence confocal microscopy (FCM) enables real-time imaging of freshly excised tissue.
- The feasibility of a rapid tissue assessment has been described.

What does this study add?

- This study demonstrates the potential of FCM for rapid surgical pathology to guide Mohs surgery with high accuracy.
- FCM is a first step towards rapid 'bedside pathology' and represents a time-saving alternative to frozen sections during Mohs surgery.

Correspondence

Antoni Bennàssar.

E-mail: tbennassar@gmail.com

Accepted for publication

30 September 2013

Funding sources

This project has been supported by personal grants to A.B. from Hospital Clínic de Barcelona 'Emili Letang' and is partially supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) grant 09/1393; CIBERER U-726, ISCIII.

Conflicts of interest

The VivaScope[®] 2500 was borrowed from Lucid Inc. for 8 months (now Caliber Imaging and Diagnostics).

DOI 10.1111/bjd.12671

Confocal mosaicing microscopy is an attractive alternative to frozen histopathology during Mohs micrographic surgery (MMS), as cellular morphology can be observed, in real time, in thin optical sections and directly in freshly excised tissue.^{1,2}

In reflectance-mode confocal microscopy (RCM) a strong bright scattering interference comes from the dermis (reflectance), making the diagnosis difficult.³ However, in fluorescence-mode confocal microscopy (FCM) a contrast agent (acridine orange) specifically stains nuclei, increasing the contrast of nucleated cells, and only weak fluorescence is collected from the dermis.⁴

In confocal mosaicing, high-resolution individual images (750 × 750 μm) are stitched together to create mosaics that display low magnification of large areas of tissue, as required for Mohs surgery. Modern FCM devices are able to display wide field-of-view mosaics of up to 12 × 12 mm; this corresponds to a 2 × view of standard light microscopy, which is the method routinely used by Mohs surgeons when reading frozen sections.³ Each FCM mosaic is created in < 3 min, enabling real-time bedside pathology.

Recent studies have demonstrated an excellent correlation between ex vivo FCM images and histopathology for non-melanoma skin cancer.^{5,6} Moreover, the feasibility of rapid bedside pathology with FCM has been widely described,^{7,9} and may represent a time-saving alternative to frozen sections during microscopically controlled surgery.^{3,10,11}

It has been shown that not only is MMS safe, but it is also the technique with the lowest rates of basal cell carcinoma (BCC) recurrence.¹² However, it is a time-consuming procedure without a proven cost benefit ratio as yet.¹³ In a blind evaluation, residual BCC was detected in freshly excised Mohs tissue with an overall high sensitivity and specificity compared with the gold standard of a frozen section stained with haematoxylin and eosin.⁶

The goal of this study was to calculate prospectively the sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of FCM in detecting residual BCC on the surgical margins during Mohs surgery. Although there are a few published reports that have evaluated these parameters,^{6,8} ours is the first prospective study to incorporate ex vivo FCM into daily practice in a Mohs surgery setting. Furthermore, we also sought to calculate and compare the time consumed by FCM vs. frozen pathology, for the first time, during the routine practice of Mohs surgery. Ex vivo FCM is the outstanding advance in Mohs surgery over the last decades and may evolve into an entirely new alternative to classical histopathology, saving time and lowering MMS costs.

Materials and methods

Study sample and tissue collection

Eighty consecutive surgically removed BCCs from the Mohs Surgery Unit at the Hospital Clínic, Barcelona, Spain, were prospectively enrolled between October 2010 and November

2011. The study was approved by the ethics committee of the Hospital Clínic and the University of Barcelona, Spain (registry number 2010/5492).

All BCCs were ≥ 5 mm in diameter. Details of tumour location, status (primary or recurrent) and histopathological subtype are listed in Table 1. All 80 lesions underwent classical Mohs surgery (45° incision), splitting the first Mohs stage into two samples (160 tissue samples). For each one, the outer margin (true surgical margin) was imaged under FCM, creating a 12 × 12-mm VivaBlock[®] mosaic (Caliber Imaging and Diagnostics, Rochester, NY, U.S.A.) producing 160 full mosaics. For technical reasons, the quality of 10 panels was not optimal for evaluation and thus these were not included. In order to evaluate the confocal images, each mosaic was divided into two or four submosaics depending on the sample size. Samples measuring < 5 mm maximum diameter were divided into two submosaics, and those > 5 mm into four submosaics. Finally, 480 submosaics were enrolled and evaluated in the study.

The whole process, including surgery, acquiring FCM images and mosaic evaluation, was prospectively performed by the main author (A.B.) using the pan-zoom tool in situ in the surgery room, during Mohs surgery.

Fluorescence confocal microscopy

Confocal mosaics were acquired using a modified version of a commercially available ex vivo laser scanning FCM (VivaScope[®] 2500; Caliber Imaging and Diagnostics, Rochester, NY, USA); this FCM version is specially designed for ex vivo imaging of freshly excised tissue samples.

All samples were directly immersed in a 1 mmol L⁻¹ solution of acridine orange to provide a strong nuclear dermis contrast, as it specifically stains nuclear DNA. Thus, FCM collects fluorescence from nucleated cells, and consequently the images displayed are formed mainly by stained nuclei.

Table 1 Patient and tumour characteristics

Characteristic	Number (%)
Patients	74 (100)
Basal cell carcinomas	80 (100)
Sex	
Male	44 (59)
Female	30 (41)
Location	
Head and neck	73 (91)
Trunk	7 (9)
Status	
Primary	63 (79)
Recurrent	17 (21)
Histological subtype	
Infiltrating	67 (84)
Nodular	9 (11)
Superficial	4 (5)

When a structure does not contain nuclei, no acridine orange is fixed, therefore it lacks fluorescence and the structure appears grey or black on the screen. Thus, under FCM, tumour cells and reactive cells within the tumour stroma appear hyperfluorescent, including the normal epidermis and adnexal structures. However, we should point out that normal dermis does not have any fluorescence and therefore is usually seen as black or grey black.

Equally important is the fact that acridine orange immersion affects neither subsequent frozen sections nor formalin fixed histopathology quality.⁴ To detect orange fluorescence the laser wavelength used was 488 nm; illumination laser power was automatically set but the depth had to be manually adjusted.

For each skin specimen a 12 × 12 mm mosaic was created, such that the magnification was equivalent to that of the standard low power 2 × view of optical microscopes. It took 150 s to display each 12 × 12 mm panel, and an additional 20 s for the subsequent image stitching. The instrumentation, imaging and technical details have already been described by Bennassar et al.⁵ and Gareau et al.⁶

Mosaic evaluation

Displayed FCM mosaic images were evaluated in real time from freshly excised samples in the operating room by the main author (A.B.). Gold standard frozen pathology stained either with haematoxylin and eosin or toluidine blue was performed directly after mosaicing in order to compare both techniques.

Fluorescence mode confocal microscopy panels were first visualized at 2× magnification, and then at 4× (pan zoom tool) for each submosaic, mimicking the usual frozen section slide reading process during Mohs surgery. ‘Zooming’ mosaics at higher magnifications of 10–30× was performed only on a few mosaics when necessary. A.B. is experienced in reading both frozen Mohs slides and FCM images, having been formally trained in both fields.

Fluorescence confocal microscopy displays mosaics that reproduce the architecture of normal skin and tumour shape in real time with cellular resolution. However, when visualizing FCM mosaics we can use neither colour terminology, as in haematoxylin and eosin classical pathology, nor structure refractivity, as in RCM. Thus, we must describe structures relative to their fluorescence emission. In a previous article the authors adapted classical histopathological BCC features in FCM images.⁵ Eight criteria, namely presence of fluorescence, tumour demarcation, nuclear crowding, peripheral palisading, clefting, nuclear pleomorphism, increased nuclear–cytoplasm ratio and the presence of stroma, were described, evaluated and validated. These criteria have been demonstrated to be useful in distinguishing BCC nests and strands from adnexal structures. In FCM mosaics, a well circumscribed mass or lobe of pleomorphic hyperfluorescent bright dots, with a striking tendency to arrange with peripheral palisading next to the clefting, is very likely to be a BCC. Thus, when reading a mosaic looking for the presence or absence of residual BCC,

Table 2 Detection of residual basal cell carcinoma (BCC) in Mohs samples with *ex vivo* fluorescence confocal microscopy (FCM) vs. haematoxylin and eosin (H&E) staining

	H&E+	H&E-	Total
FCM+	79 (89)	1 (0.3)	80 (16.7)
FCM-	10 (11)	390 (99.7)	400 (83.3)
Total	89 (18.5)	391 (81.5)	480 (100)

All values are n (%). +, positive for BCC; -, negative for BCC.

the author based the decision on these criteria. Frozen pathology was blindly read by our dermatopathologists, who stated whether the slide was positive or negative for BCC.

Time invested in tissue processing

The tissue processing time, up to obtaining the FCM mosaics and frozen section slides stained with haematoxylin and eosin, was also calculated for each BCC and compared. To calculate the time invested in FCM processing, the acridine orange ink ing and rinsing, image acquisition and mosaic stitching were included. On the other hand, in classical frozen sections, the time included sample flattening, freezing and cutting with the cryostat, staining and slide mounting.

Results

In total 80 surgically removed BCCs from 74 patients were imaged. More than 90% of the BCCs (91%) were located in the head and neck area, and 9% on the trunk. Most of the BCCs were primary (79%), and the main histological subtype was micronodular/infiltrating, representing more than three quarters of the tumours. These results are summarized in Table 1.

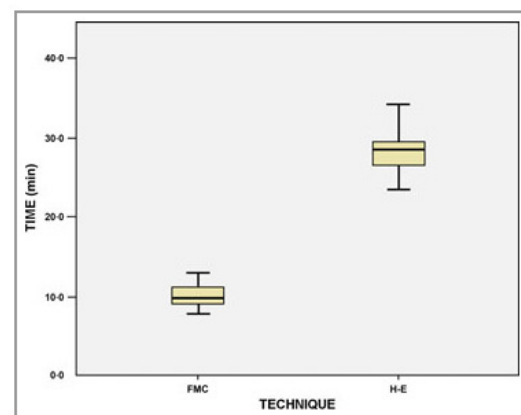


Fig 1. Differences between time taken for *ex vivo* fluorescence confocal microscopy (FCM) and frozen section processing with haematoxylin and eosin (H&E). The graph shows and compares the mean, median, SD, maximum and minimum for each technique.

Detection of residual basal cell carcinoma in the surgical margins

Basal cell carcinoma is a malignant proliferation of basaloid cells with prominent nuclei, thus residual BCC was seen as nests and strands composed of hyperfluorescent nuclei when viewed under FCM.

The overall sensitivity, specificity, PPV and NPV in detecting residual BCC in the surgical margins were 88%, 99%, 98% and 97%, respectively. From 89 true positive samples for BCC proven by frozen haematoxylin and eosin pathology, *ex vivo* FCM picked up 79, missing 10 cases (false negatives). On the

other hand, from 391 samples that were negative by haematoxylin and eosin, only one false positive was observed. These results are detailed in Table 2.

Time invested in tissue processing

The mean time to obtain FCM mosaics in the first Mohs stage (two samples per stage) was 10.1 ± 1.22 min, while it took a mean of 28.2 ± 2.2 min to process the samples with frozen haematoxylin and eosin stained slides. These differences were statistically significant (P < 0.001; Fig. 1).

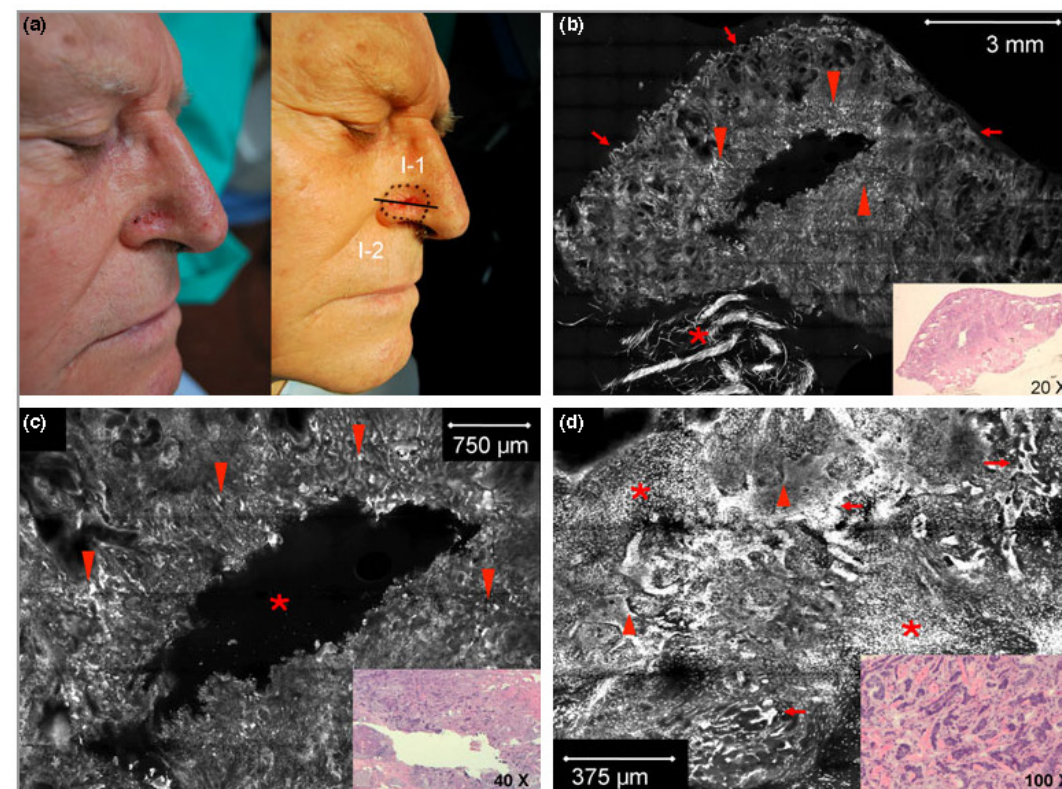


Fig 2. Infiltrating basal cell carcinoma (BCC) on the nose, with Mohs surgery guided by *ex vivo* fluorescence confocal microscopy (FCM). (a) Clinical picture of an ill-defined sclerosing BCC on the right nasal ala. The first Mohs stage was started 1 mm around the clinical margin and was divided into two samples (I1 and I2). (b) *Ex vivo* FCM mosaic showing the surgical margin of stage II with the corresponding frozen haematoxylin and eosin (H&E)-stained counterpart (original magnification 20×). Arrows mark the outer margin corresponding to the epidermis and superficial dermis with a high density of pilosebaceous units as seen in normal skin on the nose. No colours are seen under FCM, only fluorescence from acridine orange-stained nucleated cells is displayed in FCM mosaics. Thus, an acridine orange-embedded gauze is placed in the corresponding black-stained site with H&E (asterisk). Also seen around the central black artefact are multiple irregular hyperfluorescent dots corresponding to BCC infiltration (arrowheads). (c) In a closer view this confocal mosaic shows an infiltrating BCC with the H&E counterpart (original magnification 40×). Under FCM, infiltrating BCC is seen as a proliferation of nests and thin strands (arrowheads) within a dense tumoral stroma around the central fluorescence-free artefact (asterisk). (d) Closer view of the infiltrating BCC confocal mosaic with the H&E counterpart (original magnification 100×), composed of densely packed, pleomorphic hyperfluorescent nuclei infiltrating throughout the dermis (arrows). Notice that in the bigger tumour island periphery, nuclei arrange with palisading (arrowheads). The surrounding dermis has a high density of fluorescent dots corresponding to nucleated cells from the tumoral stroma (asterisks), including inflammatory lymphocytes and activated fibroblasts.

Discussion

Ex vivo FCM is a new imaging tool capable of displaying large areas of tissue with a high resolution in a manner that is analogous to that seen in thin histopathological sections. *Ex vivo* FCM may represent an alternative to frozen histopathology during Mohs surgery, as residual BCC may be observed directly and in real time in freshly excised surgical margins.

Frozen histopathology during Mohs surgery is time consuming and labour intensive, sometimes requiring up to 45 min per stage, as well as a specifically trained team of technicians and a complex infrastructure. Currently available *ex vivo* FCM devices take < 3 min to provide a 12 × 12-mm mosaic, and they require neither extra personnel (only the Mohs surgeon) nor a histopathology laboratory.

The overall sensitivity and specificity were as high as 88% and 99%, respectively, in detecting residual BCC in the freshly excised study samples. From 89 true positive samples for BCC proven by frozen pathology, *ex vivo* FCM picked up 79 BCCs, missing 10 cases. When reviewing these 10 FCM false negative cases we realized that they corresponded to 10 sclerosing infiltrating BCCs composed of thin strands of two to three cells. There are many reasons to explain this fact, mainly technical issues, considering that the device is a prototype and that there are neither experienced Mohs surgeons in this technique nor training programmes. However, some of these cases could correspond to false positive frozen sections. It could be that BCC strands were very close to the surgical margin but did not affect it; once the sample is frozen, the Mohs technician wastes a certain quantity of tissue before obtaining an optimal section, this way reaching the tumour mass. With the *ex vivo* FCM, as no tissue is consumed because the sample is directly applied and scanned, the evaluated mosaics are the counterpart of the true surgical margin.

On the other hand, from 391 negative samples by haematoxylin and eosin, in only one case was a false positive observed under *ex vivo* FCM. This supports the idea that *ex vivo* FCM is a very reliable tool when an image suggestive of BCC is spotted. Thus, when performing Mohs surgery the surgical margins can be assessed in < 3 min with confocal microscopy, with a specificity close to 100%. This represents a first step towards rapid bedside pathology, and when BCC is detected in a confocal mosaic it would be acceptable to proceed to the next Mohs stage without the need for further processing, saving time and resources (Fig. 2). The PPV and NPV were 98% and 97%, respectively; however, the prevalence in the sample of a positive margin for BCC was low, so these values are not reliable.

When performing MMS with a high standard of quality it is mandatory to have a pathology laboratory right next to the operating theatre for rapid sample processing in order to be efficient. These facilities are nowadays more and more difficult to put together because of the tendency to set surgery and pathology departments apart in public hospitals all over Europe. MMS also has the requirement of a properly trained pathology technician, specially skilled in frozen pathology,

with a three-dimensional understanding of the sample and entirely dedicated to it. Thus, MMS is becoming more and more expensive and inefficient. Therefore, new strategies addressed to a rapid bedside assessment of the tumour margins are required. In this article the authors calculate and demonstrate that *ex vivo* FCM significantly reduces the time of sample processing with a high sensitivity and even better specificity. However, more experience is required to validate this technique in order to incorporate it into daily practice, along with cost benefit studies to confirm that *ex vivo* FCM indeed reduces Mohs surgery costs.

In our study, *ex vivo* FCM is applied during Mohs surgery because the skin is the most accessible tissue. However, real-time mosaicing of fresh tissue may prove useful and even quicker¹⁴ in many fields of pathology, including intraoperative assessment of malignancies or needle biopsies. In the present study, FCM images were evaluated by only one Mohs surgeon. This limitation occurs because no other qualified personnel are present in the operating room where Mohs surgery is performed and FCM images are acquired. To broaden the applications of *ex vivo* FCM in the near future, studies involving general pathologists, dermatopathologists and confocal experts evaluating the confocal images are mandatory.

In conclusion, *ex vivo* FCM is a newly developed technology that may be an attractive alternative to frozen or paraffin-fixed, haematoxylin and eosin-stained histological sections. Thus, FCM could represent an entirely new alternative to classical pathology, and a first step towards a rapid 'bedside pathology', solving the time delays, setting limitations and high costs of current pathology. Moreover, despite the promising results, the sensitivity of *ex vivo* FCM devices needs to be improved in the detection of remaining BCC, while more multicentre studies need to be conducted in order to validate this technique.

References

- Gonzalez SG, Gill M, Halpern AC (eds). *Reflectance Confocal Microscopy of Cutaneous Tumours*. London: Informa U.K. Ltd, 2008.
- Chung VQ, Dwyer PJ, Nehal KS *et al.* Use of *ex vivo* confocal scanning laser microscopy during Mohs surgery for nonmelanoma skin cancers. *Dermatol Surg* 2004; **30**:1470–8.
- Patel YG, Nehal KS, Aranda I *et al.* Confocal reflectance mosaicing of basal cell carcinomas in Mohs surgical skin excisions. *J Biomed Opt* 2007; **12**:034027.
- Gareau DS, Li Y, Huang B *et al.* Confocal mosaicing microscopy in Mohs skin excisions: feasibility of rapid surgical pathology. *J Biomed Opt* 2008; **13**:054001.
- Bennàssar A, Carrera C, Puig S *et al.* Fast evaluation of 69 basal cell carcinomas with *ex vivo* fluorescence confocal microscopy: criteria description, histopathological correlation, and interobserver agreement. *JAMA Dermatol* 2013; **149**:839–47.
- Gareau DS, Karen JK, Dusza SW *et al.* Sensitivity and specificity for detecting basal cell carcinomas in Mohs excisions with confocal fluorescence mosaicing microscopy. *J Biomed Opt* 2009; **14**:034012.
- Ziefle S, Schüle D, Breuninger H *et al.* Confocal laser scanning microscopy versus 3-dimensional histologic imaging in basal cell carcinoma. *Arch Dermatol* 2010; **146**:843–7.

- Karen JK, Gareau DS, Dusza SW *et al.* Detection of basal cell carcinomas in Mohs excisions with fluorescence confocal mosaicing microscopy. *Br J Dermatol* 2009; **160**:1242–50.
- Gareau DS, Patel YG, Li Y *et al.* Confocal mosaicing microscopy in skin excisions: a demonstration of rapid surgical pathology. *J Microsc* 2009; **233**:149–59.
- Schüle D, Breuninger H, Schippert W *et al.* Confocal laser scanning microscopy in micrographic surgery (three-dimensional histology) of basal cell carcinomas. *Br J Dermatol* 2009; **161**:698–700.
- Bennàssar A, Vilalta A, Carrera C *et al.* Rapid diagnosis of two facial papules using *ex vivo* fluorescence confocal microscopy: towards a rapid bedside pathology. *Dermatol Surg* 2012; **38**:1548–51.

- Macfarlane L, Waters A, Evans A *et al.* Seven years' experience of Mohs micrographic surgery in a U.K. centre, and development of a U.K. minimum dataset and audit standards. *Clin Exp Dermatol* 2013; **38**:262–9.
- Stern RS. Cost effectiveness of Mohs micrographic surgery. *J Invest Dermatol* 2013; **133**:1129–31.
- Abeytunge S, Li Y, Larson B *et al.* Rapid confocal imaging of large areas of excised tissue with strip mosaicing. *J Biomed Opt* 2011; **16**:050504.

TREBALL 2

“Ex vivo fluorescence confocal microscopy for fast evaluation of tumour margins during Mohs surgery”

Antoni Bennàssar, Antoni Vilalta, Susana Puig, Josep Malvehy

Br J Dermatol 2014; 170(2):360-5.

Factor d'impacte: 3,76

RESUM

Fonaments

El microscopi confocal de fluorescència (MCF) és un microscopi làser d'escombratge que utilitza la fluorescència d'alguns pigments per a obtenir imatges en temps real i amb resolució cel·lular dels teixits estudiats. S'han descrit i validat prèviament criteris específics de CBC per a la seva identificació en els mosaics de MCF.

Objectius

1. Estudiar els marges quirúrgics de CBC ressecats mitjançant CMM amb MCF ex vivo i comparar-los amb la histologia convencional en congelat tenyida amb H/E.
2. Determinar la sensibilitat (S), especificitat (E), valor predictiu positiu (VPP) i valor predictiu negatiu (VPN) de la MCF ex vivo en la detecció de CBC residual als marges quirúrgics de les cirurgies de Mohs.
3. Determinar el temps invertit en el processament de les mostres fins a obtenir el diagnòstic amb cadascuna de les tècniques i compara-ho.

Resultats

1. Càlcul de la S, E, VPP i VPN del MCF per a la detecció de CBC residual als marges quirúrgics de les cirurgies de Mohs.

Es van analitzar amb MCF un total de 480 submosaics dels quals, 80 varen esser catalogats com a positius per a CBC (basat en els criteris prèviament descrits) i als 400 restants no es varen observar imatges suggestives de CBC. Es varen comparar aquests resultats amb el “patró or” que és la histologia convencional en congelat. Dels 400 submosaics on es va indicar que no hi havia restes de CBC als mosaics de MCF, a 10 d'ells es va demostrar positivitat per CBC a la histologia en congelat (falsos negatius). Per altra part, només a 1 dels 80 catalogats com a positius per CBC al MCF no es va demostrar a la histologia (fals positiu).

Amb tot, es varen obtenir els següents resultats: S 88%, E 99%, VPP 98% i VPN97%.

2. Càlcul del temps invertit en el processament de les mostres de CMM.

A la nostra mostra, els temps mitjà fins a obtenir les imatges per a realitzar el diagnòstic del primer estadi en la CMM fou de 10.1 minuts amb la MCF comparat amb els 28.2 minuts amb la histologia en congelat i tenyida amb H/E. La diferència entre els temps és estadísticament significativa ($p < 0.001$).

Conclusions

En aquest treball es demostra que la MCF té una molt bona sensibilitat (88%) i una excel·lent especificitat (99%) per a la detecció de CBC residual als marges quirúrgics durant la cirurgia de Mohs.

A més, el temps fins a l'obtenció del diagnòstic amb la MCF s'ha demostrat significativament inferior que quan es processa en congelat per a la histologia convencional.

COMMUNICATIONS AND BRIEF REPORTS

Rapid Diagnosis of Two Facial Papules Using Ex Vivo Fluorescence Confocal Microscopy: Toward a Rapid Bedside Pathology

ANTONI BENNÀSSAR, MD, ANTONIO VILALTA, MD, CRISTINA CARRERA, MD, SUSANA PUIG, MD, PHD, AND JOSEP MALVEHY, MD, PHD*

The authors borrowed a laboratory version of the commercial confocal microscopy from Lucid, Inc.

Fluorescence-mode confocal microscopy (FCM) is a new technique for the ex vivo study of cutaneous lesions. The use of fluorescence with acridine orange instead of reflectance to increase nuclei-to-dermis contrast significantly improves the detectability of all types of tumors because nuclear morphology may be directly imaged, in real time, in freshly excised tissue.¹

An application of interest is the rapid diagnosis of ambiguous lesions under dermoscopy located where in vivo reflectance confocal microscopy (RCM) can not be performed. We report two papules on the face referred for Mohs micrographic surgery (MMS) as basal cell carcinomas (BCCs). Noninvasive RCM diagnosis could not be performed because of the difficult location (nose tip and jaw). A shave biopsy was performed in both cases. The two samples underwent rapid diagnosis with FCM; in each case, we obtained a 10- by 10-mm fluorescence confocal mosaic with high cellular morphologic resolution that enabled us to provide a precise diagnosis in less than 5 minutes. The present report represents a first step toward a rapid bedside pathology.

Case report

Case 1

A 32-year-old woman presented at our outpatient nevus clinic with a dome-shaped pearly brown

papule on the jaw. She was referred to our MMS unit with a clinical diagnosis of BCC. Her medical history was relevant for multiple atypical nevi and a first-degree relative with malignant melanoma. She had first noticed the lesion 2 years before and had noticed that it had grown during the last 6 months. Dermoscopy showed a homogeneous light-pigmented background pattern with the presence of tiny telangiectasias on the surface (Figure 1A). An ex vivo FCM (Vivascope 2500, Lucid Inc., Rochester, NY) mosaic created in 170 seconds had excellent morphologic correlation with conventional histopathology (Figure 1B). Closer observation of the FCM mosaic revealed a dense dermal infiltrate consisting of round homogeneously fluorescent scattered structures surrounding hair follicles corresponding to intradermal nevi melanocytes (Figure 1C). We gently electrodesiccated the surgical wound base without causing more harm. Three months later, the cosmetic outcome was excellent.

Case 2

A 52-year-old woman with a positive history for multiple melanomas was referred to our outpatient clinic for MMS. She presented with an asymptomatic whitish papule on the tip of her nose that had been present for 1 year. Dermoscopy showed a single, tiny, arborescent vessel within a homogeneous brown background (Figure 2A). Under FCM,

*All authors are affiliated with Department of Dermatology, Hospital Clinic, Barcelona, Spain

© 2012 by the American Society for Dermatologic Surgery, Inc. • Published by Wiley Periodicals, Inc. • ISSN: 1076-0512 • Dermatol Surg 2012;38:1548–1551 • DOI: 10.1111/j.1524-4725.2012.02467.x

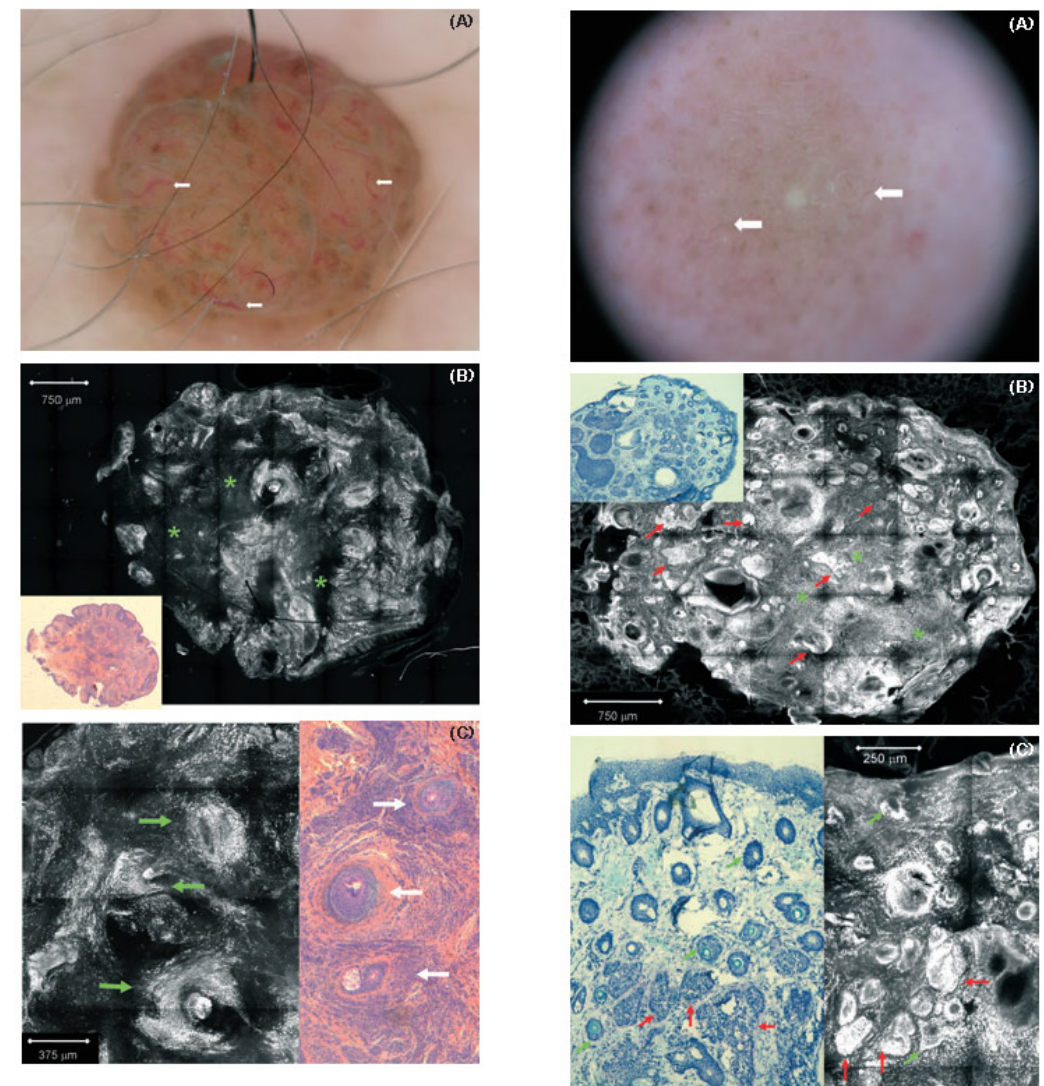


Figure 1. (A) Dermoscopic view showing a homogeneous brown pattern with the presence of focal globules and tiny vessels (arrows). (B) Ex vivo fluorescent confocal microscopy (FCM) mosaic (6 × 4.5-mm field of vision) and low-power histologic (inset) (hematoxylin-eosin [H&E], original × 2 magnification) image of the nevi in a horizontal section. The fluorescent dye (acridine orange) is nuclear-specific, and light emission is collected specifically from nuclei but almost none from the dermis (asterisks). (C) Closer view FCM and its histopathologic counterpart (H&E, original × 4 magnification) revealed dense dermal, sharply demarcated, round, homogeneously fluorescent structures corresponding to nevi melanocytes. In congenital nevi, melanocytes are arranged surrounding hair follicles (arrows). The presence of fluorescent nuclei in the epidermis at the basal layer (not at the stratum corneum) is striking (arrow head).

Figure 2. (A) Dermoscopic image showing small arborescent vessel (arrows) within a homogeneous pearly brown background. (B) Ex vivo fluorescent confocal microscopy (FCM) mosaic (4.8 × 4.0-mm field of vision) and low-power histology (inset) (Toluidine blue, original × 2 magnification) pictures of the shave biopsy bottom. Islands of hyperfluorescent nuclei with peripheral clefting (arrows) are shown within a dense inflammatory infiltrate (asterisks) corresponding to basal cell carcinoma (BCC) nests. (C) At high magnification, FCM mosaic shows a high density of hair follicles (arrows). Unstructured irregular bright nests and strands with nuclear pleomorphism, crowding, and peripheral palisading cells (arrow heads) are seen with high resolution; these structures correspond to infiltrating BCC in the pathology counterpart (Toluidine blue, original × 4 magnification).

the bottom side of a shave biopsy showed islands of crowded hyperfluorescent nuclei within a dense inflammatory infiltrate corresponding to BCC islands (Figure 2B). At high magnification, the FCM mosaic showed irregular bright nests and strands with nuclear pleomorphism, crowding, and peripheral palisading; all of these features corresponded to an infiltrating BCC in the pathology counterpart (Figure 2C). MMS was performed, and the patient was free of tumor in the third stage. Side-to-side closure was possible, with good cosmetic results after stitch removal.

Comment

High-resolution imaging of human skin is possible in ex vivo thick specimens from fresh surgical excisions or biopsies using a confocal microscope.¹ Confocal mosaicing microscopy offers an attractive alternative to histopathology because nuclear and cellular morphology may be directly observed in thin optical sections, in real time, in freshly excised tissue.²

Acetic acid was first used as a contrast agent to “aceto-whiten” or brighten nuclei in RCM. In RCM, large, densely nucleated tumors are easily detected in large field-of-vision mosaics, but tiny strands of micronodular infiltrative tumors such as BCCs or squamous cell carcinomas (remain hidden in mosaics that display large fields of vision because of the bright scattering of the surrounding normal dermis (strong reflectance) interference.³ In fluorescence mode, with a contrast agent that specifically stains nuclei (acridine orange), little light is collected from the dermis. With FCM, acridine orange increases the nuclei-to-dermis contrast of epithelial tumor cells 1,000 times, and only weak fluorescence is collected from the surrounding dermis.⁴

Confocal mosaics display large areas of tissue with high resolution and low magnification in a manner that is analogous to that seen in thin histopathology sections. Confocal images (750 × 750 μm) may be stitched together to create mosaics to display large areas of tissue, as required for surgical pathology.

Modern ex vivo FCM devices are able to display wide field-of-vision mosaics up to 12 by 12 mm, corresponding to a vision with 2× magnification using a standard light microscope,³ but this new imaging technique is entirely different and therefore must be validated. Recent studies have demonstrated an excellent correlation between ex vivo FCM images and histopathology for nonmelanoma skin cancer.⁵ In a blind evaluation, BCCs were detected in fresh excised Mohs tissue with overall high sensitivity and specificity when compared with the criterion standard of frozen sections stained with hematoxylin and eosin (H&E).⁶

FCM has the potential to improve diagnostic accuracy, saving time because mosaics may be created in less than 5 minutes, whereas frozen histopathology is time consuming, requiring 20–45 minutes per excision. Moreover, large-area mosaicing may offer a means for direct rapid examination of BCCs in fresh excisions while also reducing costs.

Ex vivo FCM is a new diagnostic imaging tool that enables rapid diagnosis of skin lesions with cellular resolution. We herein report two whitish papules with similar clinical and dermoscopic features that could not be diagnosed using noninvasive in vivo RCM because of their location. A reliable diagnosis of shave biopsies was obtained in approximately 170 seconds with FCM while the patient remained on the operating table. FCM cellular and tissular images have a striking correspondence with histopathologic counterparts in tumoral and healthy skin architecture.

FCM is the greatest advance toward a rapid surgical bedside pathology, which potentially expedites and guides surgery in skin and other tissues⁴ and may evolve into an entirely new alternative to frozen and formalin histopathology.

References

1. Gonzalez SG, Gill M, Halpern AC, eds. Reflectance Confocal Microscopy of Cutaneous Tumors. London: Informa U.K. Ltd, 2008.

2. Chung VQ, Dwyer PJ, Nehal KS, Rajadhyaksha M, et al. Use of ex vivo confocal scanning laser microscopy during Mohs surgery for nonmelanoma skin cancers. *Dermatol Surg* 2004;30(12 Pt 1):1470-1478.
3. Patel YG, Nehal KS, Aranda I, Li Y, et al. Confocal reflectance mosaicing of basal cell carcinomas in Mohs surgical skin excisions. *J Biomed Opt* 2007;12:034027.
4. Gareau DS, Li Y, Huang B, Eastman Z, et al. J Confocal mosaicing microscopy in Mohs skin excisions: feasibility of rapid surgical pathology. *J Biomed Opt* 2008;13:054001.
5. Rajadhyaksha M, Menaker G, Flotte T, Dwyer PJ, et al. Confocal examination of nonmelanoma cancers in thick skin excisions to

potentially guide Mohs micrographic surgery without frozen histopathology. *J Invest Dermatol* 2001;117:1137-1143.

6. Gareau DS, Karen JK, Dusza SW, Tudisco M, et al. Sensitivity and specificity for detecting basal cell carcinomas in Mohs excisions with confocal fluorescence mosaicing microscopy. *J Biomed Opt* 2009;14:034012.

Address correspondence and reprint requests to: Antoni Bennàssar, MD, Department of Dermatology, Hospital Clinic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain, or e-mail: tbennassar@gmail.com

TREBALL 3

**“Rapid diagnosis of two facial papules with ex-vivo fluorescence confocal microscopy.
Towards a rapid bedside pathology”**

Antoni Bennàssar, Antoni Vilalta, Critsina Carrera,
Susana Puig, Josep Malveyh

Dermatologic Surgery 2012 Sep;38(9):1548-51.

Factor d'impacte: 2,264

RESUM

Fonaments

La microscòpia confocal de fluorescència (MCF) és una nova tècnica d'imatge que permet obtenir imatges tissulars en temps real i amb resolució cel·lular que representa un primer pas cap a una patologia digital computeritzada.

En articles anteriors s'han descrit i validat criteris de CBC a les imatges de MCF i que utilitzant aquests criteris es té una molt bona sensibilitat i especificitat per al diagnòstic de CBC als marges quirúrgics. A més, la MCF és més ràpida que la histologia convencional a l'hora del processament de les mostres.

Objectius / Resultats

Demostrar que la MCF té una aplicabilitat clínica directa en el maneig quirúrgic del CBC i que incorporat a la pràctica diària pot millorar l'eficiència de la cirurgia de Mohs i oferir solucions innovadores.

DISCUSSIÓ

I. VISUALITZACIÓ DEL CARCINOMA BASOCEL·LULAR SOTA LA MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCÈNCIA

I.1. MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCÈNCIA:
CAP A UNA PATOLOGIA DIGITAL EN TEMPS REAL

I.2. DESCRIPCIÓ DE CRITERIS DEFINITORIS DE CBC EN ELS MOSAICS DE MCF

I.3. VALIDACIÓ INTEROBSERVADORS DEL CRITERIS DE CBC

I.4. CAPACITAT DE LA MCF PER A CLASSIFICAR ELS CBC EN ELS PRINCIPALS
SUBTIPUS DE CBC

I.5. DIFERÈNCIES ENTRE ELS SUBTIPUS DE CBC QUANT AL CRITERIS

II. APLICACIÓ DE LA MCF EN LA DETECCIÓ DE CARCINOMA BASOCEL·LULAR ALS MARGES QUIRÚRGICS PER LA TÈCNICA DE MOHS-TROMOVICH

II.1. CAPACITAT DE LA MCF PER A LA DETECCIÓ DE CBC RESIDUAL

II.2. CÀLCUL DEL TEMPS INVERTIT PER AL PROCESSAMENT DE LES MOSTRES

III. APLICACIONS CLÍNiques: PRESENT I FUTUR DE LA MCF EN LA CIRURGIA ONCOLÒGICA CUTÀNIA

I. VISUALITZACIÓ DEL CARCINOMA BASOCEL·LULAR SOTA LA MICROSCÒPIA CONFOCAL DE FLUORESCÈNCIA

I. 1. MICROSCÒPIA CONFOCAL DE FLUORESCÈNCIA: CAP A UNA PATOLOGIA DIGITAL EN TEMPS REAL

El carcinoma basocel·lular (CBC) és la neoplàsia maligna més freqüent de l'espècie humana. Es tracta d'un tumor epitelial que s'origina a partir de les cèl·lules basals de l'infundíbul fol·licular. A partir d'un nucli central tumoral envaeix l'epidermis dels voltants, la dermis i els annexes cutanis que en ella es troben. Si el tumor es deixa evolucionar, i depenent de l'agressivitat intrínseca del tumor, pot envair el teixit subcutani i les estructures subjacents com el cartílag o l'os.

La microscòpia confocal tant de reflectància (MCR) in vivo com de fluorescència (MCF) ex vivo és una nova eina d'imatge capaç de visualitzar digitalment en temps real i amb resolució cel·lular qualsevol teixit de manera anàloga a com ho fa la histologia convencional (84). La MCF podria representar una alternativa real al congelat i posterior tinció que es realitza en el processament de mostres durant la cirurgia microcontrolada de Mohs, car el marges quirúrgics podrien ésser avaluats directament sobre el teixit en fresc així estalviant temps i recursos.

Els primers aparells disponibles utilitzaven la diferent reflectància de les estructures de la pell per a donar una imatge que reproduïa en certa manera la seva arquitectura (74). Emperò, aquelles primeres imatges no representaven amb fidelitat l'arquitectura citològica de les estructures cutànies ja que hi havia molta refracció de "fons" que provenia de la dermis provocant una distorsió en la imatge final (85). No fou fins uns anys després que amb la longitud d'ona de 830 nm del MCR es va demostrar que si la mostra era tractada amb àcid acètic (5% durant 30 segons) millorava considerablement el contrast entre les estructures nucleades (epidermis, CBC, fol·licles...) i la dermis hiprereflectant(79). L'àcid acètic augmenta el contrast dels nuclis fent-los més brillants ja que provoca la condensació de la cromatina. Aquest fet fa que, al incidir una llum làser polaritzada lineal sobre el teixit tingui manco distorsió que la dermis acel·lular i aquesta diferència de polarització fa que augmenti el contrast (75). D'aquesta forma es va demostrar que el tractament previ de les mostres amb àcid acètic millorava la detecció de grans fragments de CBC en les seccions de CMM quan es visualitzaven amb el MCR; emperò els petits cordons de CBC esclerodermiformes romanien sense detectar en la majoria de casos (86).

Amb la tècnica de la fluorescència, el làser emissor hauria de tenir la mateixa longitud d'ona que excita el fluoròfor, que és l'agent amb el qual es processa la mostra. Es van utilitzar fluoròfors coneguts de fa molt temps i àmpliament utilitzats en diferents àmbits de la microbiologia i l'anatomia patològica que s'uneixen de forma selectiva al DNA i al RNA, tenint així específicament les cèl·lules nucleades. Encara que inicialment es van provar amb èxit colorants com el blau de metilè o el blau de toluidina (87), per a la realització dels nostres estudis es va utilitzar el taronja d'acridina. Es va escollir el taronja d'acridina perquè s'havia demostrat en estudis previs (77) que a una concentració d'1 mM és un fluoròfor amb una ràpida difusió en el teixit i que amb una longitud d'ona de 488 nm s'obtenen imatges amb molt bona resolució i contrast. En el mateix estudi, Gareau et al, van demostrar que amb la MCF eren capaços de detectar tant les grans masses dels CBC nodular com les petites digitacions del CBC micronodulars.

El nostre objectiu i premissa inicial era validar una tècnica que permetés una avaluació ràpida dels marges quirúrgics durant la cirurgia de Mohs. Es va escollir la MCF ex vivo, car era la tècnica més validada fins aleshores i que permetia obtenir unes imatges que reproduïen de manera ràpida, fidedigna sobre teixit en fresc del teixit que es pretenia analitzar. Emperò, s'ha de dir que s'estan estudiant una multitud de tècniques d'imatge com la espectroscòpia de Raman (88), la utilització d'àcid aminolevulínic (89), la fluorescència multifotó (90) o la tomografia òptica de coherència (91). El problema d'aquestes tècniques és que no estan prou desenvolupades com per a oferir imatges de la qualitat de la MCF i per aquest motiu es van descartar.

La tecnologia de MCF disponible en el moment de fer els treballs utilitzava, per a la formació dels mosaics, un patró bidimensional en el qual s'anaven adquirint imatges individuals en els dos eixos X i Y formant una quadrícula. Aquestes imatges, encara que de bona qualitat, tenen un "fall-off" perifèric que el software ha de corregir abans de "cosir" les imatges per a la formació del mosaic quedant sempre artefactes d'imatge. En el moment de redactar aquesta Tesi Doctoral, Abeytunge et al (81) ja tenen desenvolupada una tecnologia en la qual el microscopi confocal adquireix les imatges en una sola dimensió en una filera d'imatges que són més fàcilment superposables per a la composició del mosaic final. A més, s'eliminen gran part dels artefactes, es millora la il·luminació i es redueix a la meitat (90 segons) el temps final de processament de la mostra (92) (**Figura 12**). Tots els nostres treballs s'han fet i validat amb els mosaics de dues dimensions, perquè en el moment de fer-los no teníem disponible aquestes millores tecnològiques.

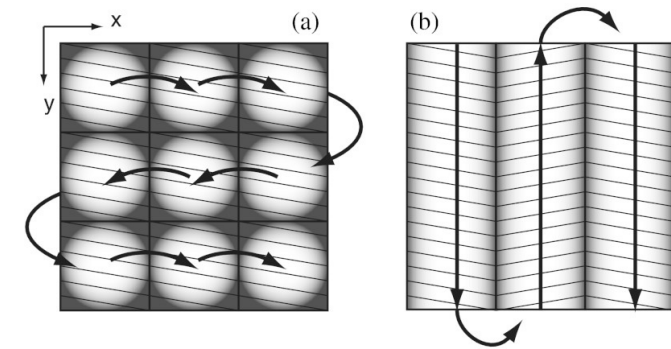


Figura 12. Adquisició de les imatges de microscòpia confocal clàssica (a) per unió d'imatges quadrades comparat amb la tècnica del "striping" (b), més ràpida i amb manco artefactes òptics. Adaptada d'Abeytunge S, et al (92).

Una altre avenç tecnològic que no hem utilitzat és la multilàser desenvolupada per Dan Gareau (93) per a obtenir mosaics resultant de la fusió d'imatges de MCR i MCF de la mateixa mostra. Per una part, el software desenvolupat en les imatges de MCF assigna el color púrpura a les imatges hiperfluorescents que corresponen als nuclis cel·lulars com ho fa la tinció tradicional de l'hematoxilina. Per altra banda, a les imatges de MCR s'assigna el color rosa a les imatges hiperreflectants que corresponen majoritàriament als feixos de col·làgena de la dermis com ho fa l'eosina. D'aquesta forma, la imatge final reproduceix de forma fidedigna l'arquitectura del teixit i pretén imitar com es veuria amb la tinció d'H&E clàssica (**Figura 13**).

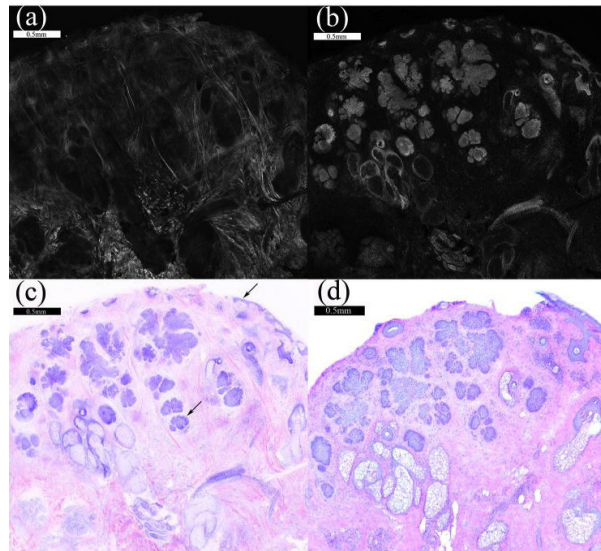


Figura 13. Imatges de MCR (a) on un software ha assignat el color rosat a les estructures reflectants com la col·làgena (c) i de MCF (b) on a les imatges hiperfluorescents com les restes de CBC han estat tenyides digitalment de pòrpora (c) obtenint aquesta imatge híbrida que tant ressalta la histopatologia convencional (d). Adaptada de Gareau D, et al (93).

Emperò, la MCF és una tècnica i un abordatge radicalment nou i diferent de com s'ha estat desenvolupant la tècnica de Mohs en congelat en els darrers 40 anys pel que calen estudis per a validar-la. Existeixen diversos estudis que demostren una bona correlació entre les imatges de MCF i la histopatologia convencional en la visualització de CBC (77). Però no s'han descrit ni validat criteris per a diferenciar les imatges de CBC de les de les estructures annexials ni de la dermis envoltant-lo. Per aquest motiu, en el primer treball d'aquesta tesi es pretenia descriure i validar tant intra com interobservador els mateixos.

I. 2. DESCRIPCIÓ DE CRITERIS DEFINITORS DE CBC EN ELS MOSAICS DE MCF

S'han descrit molts subtipus histològics de CBC (94) i, encara que poden ésser clínicament i histològicament molt diferents uns dels altres, comparteixen unes característiques comunes. En general, a la histopatologia clàssica amb la tinció amb H&E, els CBC es veuen com a proliferacions de cèl·lules basaloïdes (amb afinitat per l'hematoxilina com les cèl·lules de la capa basal de l'epidermis normal) on, des d'una massa central, s'estenen i/o profunditzen nius i cordons més o manco compactes. En general, els nius i cordons de CBC, tenen una alta densitat cel·lular amb atípia citològica amb polarització dels nuclis a la filera més externa (estacada). A més, molt típica és la imatge de fenedura entre el tumor i l'estroma que l'acompanya. Fins fa pocs anys, es creia que aquesta fenedura era un artefacte en la fixació de la peça i posterior processat al laboratori, però recentment s'ha demostrat mitjançant MCR que la fenedura existeix en el tumor in vivo (22). Una altra dada histològica molt típica del CBC és la fibroplàsia (estroma) i l'infiltrat inflamatori que acompanyen amb freqüència el nius i cordons basaloïdes (16).

Com s'ha explicat anteriorment, la MCF recull la fluorescència dels nuclis cel·lulars marcats amb el taronja d'acridina. Com més nuclis conté una estructura tissular, més taronja d'acridina capta i, per tant, més hiperfluorescent es veurà al mosaic de MCF. Quan una estructura té mancança total o conté només uns pocs nuclis dispersos, poc contrast captarà i es veurà com una imatge sense fluorescència negra o gris obscur. Així, quan es visualitzen imatges de mosaics de MCF hom ha de descriure una estructura en primer lloc en relació a la seva fluorescència (hiper o hipofluorescent). En el cas de la MCF no podem descriure imatges segons la seva reflectivitat (com en la MCR) o segons l'apetència per colorants com l'hematoxilina o l'eosina (com a la histopatologia clàssica). Encara que això sembli una obvietat, és la base físicoquímica per la qual s'obtenen imatges amb aquesta nova tècnica d'imatge i, per tant, també s'ha de demostrar que així és realment. En tots els articles precedents sobre la temàtica CBC-MCF descriuen i expliquen que els CBC es veuen com estructures amb alta captació de cromòfor (és una estructura composta d'una gran densitat de cèl·lules nucleades) amb el consegüent augment en la fluorescència veient-se com estructures brillants als mosaics de MCF (75, 77, 81, 86-93). Però no demostren amb dades objectives i reproduïbles que això és realment així. En el nostre primer treball així es descriu i es demostra la hiperfluorescència dels CBC a les imatges de MCF.

Per tant, a les imatges obtingudes mitjançant aquesta tècnica es visualitzaran únicament les estructures nucleades com els nius i cordons de CBC, l'epidermis i les estructures annexials com les unitats pilosebàcies i les glàndules sudorípares ecrines. Per altra banda, la fluorescència de la dermis normal és pràcticament nul·la i només a l'interior de l'estroma tumoral del CBC s'hi poden trobar estructures nucleades que corresponen als limfòcits inflamatoris i a fibroblastes activats.

L'objectiu últim del nostre estudi era avaluar els marges de les mostres de CMM per a detectar d'una forma ràpida i fiable restes de CBC. Per això, vàrem acordar a l'hora de fer el disseny que abans de res havíem de descriure i validar uns criteris que, si es donaven a les imatges de MCF, la probabilitat que es tractés de restes de CBC fos molt alta. Els articles publicats fins a dia d'avui (75, 77, 81, 86-93, 95, 96), expliquen que la MCF és una eina útil en la detecció de restes de CBC. Inclús alguns (80, 95, 97, 98) calculen la sensibilitat i especificitat de la tècnica, però en cap d'ells s'explica ni es demostra en quins paràmetres o criteris es fonamenten per a classificar els mosaics en "positius" o "negatius" per a CBC. Només en 1 article, Gareau et al (77) comenten que criteris histològics clàssics com el pleomorfisme cel·lular, la gran densitat de nuclis i l'estacada perifèrica es poden veure a les imatges de MCF. Emperò, tampoc en aquest cas quantifiquen les seves freqüències ni ho comparen amb les estructures de la pell normal.

Partint d'aquestes premisses en el present estudi es van adaptar les descripcions clàssiques de CBC a la histopatologia convencional amb els trets diferencials a les imatges obtingudes per MCF d'articles precedents (78). Així, es van descriure per primera vegada 8 criteris definitoris de CBC en els mosaics digital de MCF per a la seva posterior validació:

-Fluorescència. Direm que hi ha presència de fluorescència quan a les imatges de MCF s'observin estructures blanques brillants que corresponen a les cèl·lules nucleades tenyides amb taronja d'acridina. L'absència de fluorescència a la MCF es veu com un rerefons negre o gris fosc.

-Delimitació tumoral. L'estructura general del tumors va ésser dividida en 2 categories: ben delimitada quan es podia traçar una línia que separava clarament el tumor de l'estroma envoltant i mal delimitat quan això no era possible.

-Apilament nuclear. Aquest criteri defineix una densitat nuclear augmentada a l'interior dels nius i cordons de CBC en comparació amb l'epidermis i estructures annexials dels voltants.

-Estacada perifèrica. Defineix la tendència de les cèl·lules tumorals del CBC a polaritzar-se i alinear-se en forma d'el·lipses paral·leles hiperfluorescents a la perifèria tumoral.

-Fenedura. Són espais no fluorescents adjacents a la vora tumoral que es visualitzen com a semillunes negres.

-Pleomorfisme nuclear. És l'alteració consistent en la diversitat morfològica dels nuclis tumorals al si dels CBCs desviant-se de la morfologia rodona o ovalada homogènia dels queratinòcits normals de l'epidermis.

-Augment de la relació nucli/citoplasma. Com cèl·lules tumorals que són, les cèl·lules de CBC tenen un nucli molt més gran en comparació amb el volum del citoplasma dels queratinòcits normals. Per tant la relació nucli/citoplasma està augmentada en els nius tumorals de CBC a les imatges de MCF. Així, sota la MCF el CBC es veuria com una massa composta per punts heterogenis de fluorescència apilats sense quasi citoplasma que els separi.

-Estroma tumoral. És la dermis que envolta el CBC que el tumor modifica i necessita per al seu creixement i subsistència. A les imatges de MCF, l'estroma tumoral es veu com una dermis modificada amb una densitat anormalment alta de nuclis que probablement corresponen a fibroblastes activats i limfòcits inflamatoris. Aquesta imatge s'ha descrit com "cel amb estels". La quantitat d'estroma es va avaluar de forma semiquantitativa. Exemples de cadascun d'aquests criteris es mostren a la **figura 14** i les característiques dels pacients i del tumors a la **TAULA I**.

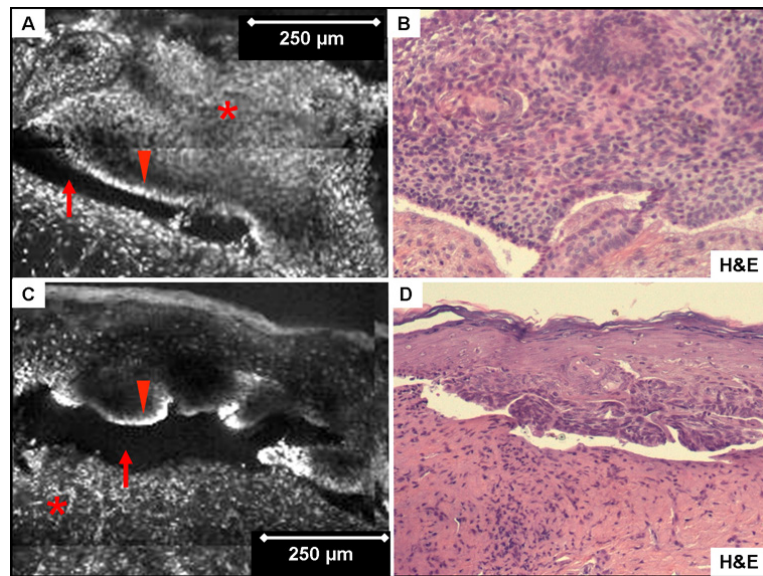


Figura 14. Criteris de CBC sota MCF. A , a la imatge es mostra un CBC vist mitjançant MCF on es poden observar els criteris de presència de fluorescència, apilament nuclear, pleomorfisme nuclear i augment de la relació nucli/citoplasma (asterisc), estacada perifèrica (cap de fletxa) i fenedura (fletxa). B, mostra el mateix tumor amb histopatologia clàssica (hematoxilina-eosina, x100). C, CBC mostrant també els criteris d'estacada perifèrica (punta de fletxa), fenedura (fletxa) i estroma tumoral (asterisc). D, mostra la corresponent imatge histològica (hematoxilina-eosina, x40).

TAULA I

			%
Pacients		69	100%
Edat	Mitjana Interval	71'93 27-96	
Sexe	Homes Dones	44 25	63'8% 36'2%
Localització	Nas Parpelles Front Galta Mentó Orella Tronc Coll	30 2 16 3 2 6 7 3	43'5% 2'9% 23'2% 4'3% 2'9% 8'7% 10'1% 4'3%
Tumor	Primari Recidiva	64 5	92'8% 7'2%
Subtipos histològic	Infiltrat Nodular Superficial	51 12 6	73'9% 17'4% 8'7%

Com s'explica en el primer treball, es van recollir 69 CBC dels quals es va agafar una tira vertical central d'aproximadament 1 mm representativa del tumor. Cadascuna d'elles es va escanejar amb la MCF obtenint-ne un mosaic i posteriorment es va remetre per al seu processament habitual amb fixació per parafina i tinció amb hematoxilina-eosina (H&E). Aquest, també és un fet diferencial amb els treballs publicats abans i després del nostre. En tots els altres treballs (75, 77, 81, 86-93, 95-98) només es van analitzar els marges quirúrgics. Això, és una limitació per la seva part a l'hora d'estudiar l'arquitectura general i concreta del tumor ja que, en els casos en què els mosaics eren positius per CBC només se'n tenia una petita part del tumor. En molts casos, els CBC són multicomponent coexistent diferents subtipus en un mateix tumor (94); d'aquesta forma el component que es veu al marge quirúrgic és probable que no sigui el mateix que existeix en altres zones del tumor, no representant-lo, i fent que no sigui extrapolable al conjunt del CBC.

D'aquesta forma, la importància del nostre treball en el qual amb un tall central tenim tota l'arquitectura del tumor, des de les capes superficials a les profundes així com els annexes i estructures de la pell normal amb les quals es pot comparar la presència o no dels diferents criteris.

A cada imatge es va avaluar la presència o no de cada un dels 8 criteris abans descrits al CBC, a les estructures annexals (fol·licle pilós i glàndula ecrina) així com també a la dermis del voltant i es van comparar les freqüències. En cap altre estudi publicat fins ara, ni experimental ni clínic (75, 77, 81, 86-93, 95-98), s'havia estudiat amb aquest enfocament. El nostre grup considerava cabdalt, un cop descrits el criteris, veure de quina forma es distribuïen en els CBCs però també a les estructures normals de la pell. Perquè, així com amb la histologia convencional hi casos en els quals sorgeixen dubtes de si una estructura és una resta de CBC o bé és un annex cutani, quan apliquéssim aquesta nova tecnologia a la pràctica real aquests dubtes també aflorarien. D'aquí la importància que es va donar en descriure i validar bé uns criteris que posteriorment hauríem d'aplicar quan utilitzéssim la MCF durant la CMM a la pràctica diària per a identificar possibles restes de CBC al segon treball.

El CBC és una proliferació de cèl·lules basaloïdes de nucli prominent; per tant, es veurà com una estructura hiperfluorescent a les imatges de MCF com també ho seran els fol·licles pilosos (FP) i les glàndules ecrines (GE). L'estroma tumoral pràcticament no té fluorescència al ser una dermis modificada i només les cèl·lules inflamatòries o fibroblastes activats en tindran. Només, en alguns treballs (92, 95) es menciona en qualque apartat l'aspecte d'aquests annexos cutanis. Són descripcions aïllades i parcials sense que es comparin amb els CBCs. No hi ha fins a dia d'avui cap sèrie, a part de la nostra, que hagi fet una comparativa quantificada d'aquestes estructures i quins són els trets diferencials entre ells i les estructures tumorals.

En relació a la delimitació dels tumors, aproximadament dos terços dels CBCs es van considerar ben delimitats així com el 91% dels FP i GE. En canvi la dermis peritumoral en tots els casos es va identificar com una estructura mal delimitada. Aquestes diferències foren estadísticament significatives.

Els criteris d'apilament nuclear (91%), estacada perifèrica (96%) i pleomorfisme nuclear (100%) estaven presents en gairebé tots els CBCs. L'apilament nuclear estava també pre-

sent en els FP, en especial als bulbs però no en les GE ni a la dermis. L'estacada perifèrica és un dels criteris més definitoris de CBC ja que al estar present en gairebé tots els CBC però absent en la resta d'estructures té una alta sensibilitat (S), especificitat (E), valor predictiu positiu (VPP) i valor predictiu negatiu (VPN).

Pel que fa a l'existència de fenedura, encara que només estava present en la meitat dels CBC, aquest criteri té una E i VPP del 100% al no estar present en cap de les altres estructures estudiades.

El pleomorfisme nuclear estava present en tots els casos de CBC, emperò només en la meitat dels fibroblastes de la dermis i en el 6% dels FP. A cap GE es va observar aquest criteri. Per això la S i el VPN foren del 100%.

L'augment de la relació nucli/citoplasma (N/C) estava present en tots els casos als CBCs, a les cèl·lules de la dermis, a les GE i en alguns casos als bulbs fol·liculars. Emperò els infundíbuls fol·liculars tenen una relació N/C baixa, igual al de l'epidermis del voltant.

Es va observar algun grau d'estroma tumoral en el 94% dels CBCs, criteri que no es va veure que acompanyés a cap dels FP ni GE. Per tant, l'estroma es un criteri amb una E i VPP del 100%. Totes aquestes dades estan resumides i ampliades a la **TAULA II**.

TAULA II

CRITERIS MCF	CBC N=69 (%)	SD N=138 (%)	p	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)	FP N=138 (%)		p	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)	GE N=138 (%)	p	S (%)	E (%)	VPP (%)
Presència de fluorescència	69 (100)	130 (94.2)	n.s.	-	-	-	-	138 (100)		n.s.	-	-	-	-	138 (100)	n.s.	-	-	-
Bona delimitació	43 (62.3)	0 (0)	<0.005	62.3	100	100	84.1	125 (90.6)		<0.005	62.3	9.4	25.6	33.3	138 (100)	<0.005	62.3	0	23.8
Apilament nuclear	63 (91.3)	98 (71)	0.001	91.3	29	39.1	87	130 (94.2)		n.s.	-	-	-	-	10 (7.2)	<0.005	91.3	92.8	86.3
Estacada	66 (95.6)	0 (0)	<0.005	95.7	100	100	97.9	5 (3.6)		<0.005	95.7	96.4	93	97.8	13 (9.4)	<0.005	95.7	90.6	83.5
Fenedura	36 (52.2)	0 (0)	<0.005	61	100	100	85.7	0 (0)		<0.005	61	100	100	85.7	0 (0)	<0.005	61	100	100
Pleomorfisme nuclear	69 (100)	74 (53.6)	<0.005	100	46.4	48.3	100	8 (5.8)		<0.005	100	94.2	89.6	100	0 (0)	<0.005	100	100	100
Augment rati N/C	69 (100)	138 (100)	n.s.	-	-	-	-	11 (8)		<0.005	100	92	86.2	100	138 (100)	n.s.	-	-	-
Presència estroma	65 (94.2)	130 (94.2)	n.s.	-	-	-	-	0 (0)		<0.005	94.2	100	100	97.2	0 (0)	<0.005	94.2	100	100

Els 4 criteris més definitoris de CBC a les imatges de MCF amb diferències estadística-ment significatives ($p < 0.005$) foren l'estacada perifèrica, la fenedura, el pleomorfisme nuclear i la presència d'estroma tumoral.

Es va demostrar que l'estacada perifèrica i la fenedura són els criteris que més bé defi-niexen la presència de CBC a les imatges de MCF. L'estacada perifèrica es va visualitzar en tots els casos de CBC i, encara que només el 50% del CBC mostraren presència de fenedura aquest criteri es va demostrar patognomònic amb un VPP del 100% ja que no estava present a cap altra de les estructures cutànies analitzades.

En quant al pleomorfisme nuclear, encara que també pot estar present en altres estructu-res, és un criteri molt significatiu, perquè és la visualització digital a la MCF de l'atípia cel-lular que es veu habitualment al si dels CBC en la histopatologia clàssica amb tinció per H&E. En resum, quan estam analitzant imatges de MCF a la recerca de restes de CBC, si tenim una estructura ben delimitada composta per una massa o cordons de punts pleomòrfics

Taula II. Criteris de microscòpia confocal de fluorescència (MCF). Es descriuen les freqüències de cada un dels criteris descrits en el carcinoma basocel·lular (CBC) i es comparen amb les presents a les estructures de la pell normal com són la dermis peritumoral (SD), els fol·licles pilosos (FP) i les glàndules ecrines (GE). A més, es calculen la sensibilitat (S), especificitat (E), valor predictiu positiu (VPP) i valor predictiu negatiu (VPN) de cada criteri alhora de discriminar el CBC de la resta d'estructures.

hiperfluorescents, amb una tendència a arranjar-se en estacada perifèrica amb presència d'una fenedura fluorescent, les probabilitats que correspongui a un CBC són molt altes. Aquesta descripció, ja apareix en un dels primers articles sobre MCF i CBC, emperò els autors ho mencionen com una observació sense que es demostrï estadísticament que això certament es compleix (77).

En relació a l'estroma tumoral, es tracta d'un criteri de molt valor, car que la seva E i VPP són del 100% no trobant-se en cap altra estructura cutània. Quan veiem la imatge anteriorment descrita com en "cel amb estels" hom ha d'extremar l'alerta, perquè ens indica que el tumor està prop. Encara que hi ha qualche article (78, 95) que comenta quelcom de l'estroma tumoral no es troba a la literatura cap descripció de com es visualitza als mosaics de MCF ni de quina és la seva freqüència. El nostre grup ha estat el primer en descriure i publicar les característiques morfo-fluorescents de l'estroma tumoral del CBC. Com es veu en altres apartats d'aquest treball, el nostre grup dona una importància cabdalt a l'estroma tumoral, ja que el CBC és un tumor molt estroma-dependent especialment aquelles varietats més agressives com són els infiltrants, micronodulars i esclerodermiformes.

El CBC, indueix canvis en la dermis mitjançant alteració del perfil d'expressió de determinades molècules en els fibroblastes que faciliten el seu creixement i infiltració (99). Com en la histopatologia clàssica, en les imatges de MCF aquests canvis de textura i composició de la dermis es poden observar amb claredat i solen anar acompanyats d'un augment dels fibroblastes activats i d'un component inflamatori més o manco important. Per això, quan evaluem els marges tumorals de la CMM és molt important observar possibles canvis en la textura i densitat de la dermis perquè ens podria indicar amb un VPP i E del 100% que estam prop del tumor. És més, durant la nostra experiència en l'aplicació de la MCF a la CMM s'ha donat el cas que s'han observat aquests canvis típics de l'estroma tumoral, emperò no s'ha visualitzat cap niu ni cordó de CBC. En el posterior estudi amb H&E en congelat, al retallar la mostra unes micres ha aparegut com a positiu per CBC en el mateix lloc on s'havien observat els canvis al MCF (observació personal, no publicada).

En alguns articles de la literatura s'explica que els nius i cordons de CBC es poden confondre fàcilment amb annexos cutanis (78, 95); si en aquests estudis s'haguessin aplicat els criteris aquí descrits haurien pogut discriminar amb una més alta especificitat aquestes estructures dels CBCs.

En un article publicat per Longo et al (95) posteriorment als nostres treballs, descriuen uns criteris simplificats de CBC (fluorescència, fenedura, estacada perifèrica, illes basaloïdes i reacció estromal) basats en els descrits en el nostre primer treball. Conclouen que el criteri que millor defineix el CBC són les "illes tumorals" que segons la nostra classificació vendria a agrupar el criteris de fluorescència, bona delimitació, apilament nuclear, augment del rati N/C i pleomorfisme nuclear, estant aquests resultats en certa forma en concordança amb les nostres troballes. Emperò no els comparen amb altres estructures de la pell normal per a poder diferenciar-les en la pràctica habitual.

I. 3. VALIDACIÓ INTEROBSERVADOR DELS CRITERIS DE CBC

Un cop descrits els criteris i definits aquells que millor defineixen els CBC en comparació a les estructures normals de la pell era necessari validar-los. La primera fase va córrer a càrrec de l'autor del present treball, però calia que aquests criteris fossin validats per observadors externs.

Així, després d'un tutorial on l'autor exposava amb imatges de MCF i la corresponent d'H&E cadascun dels diferents criteris abans descrits es va passar un test de 20 imatges on 2 observadors independents havien d'avaluar-les per a cadascun dels criteris en relació amb l'autor. Aquests observadors no tenien experiència en l'avaluació d'imatges de MCF però si una àmplia experiència en el maneig de la MCR i dermatoscòpia. En aquest aspecte, el nostre grup també fou pioner en la validació externa dels resultats. Als estudis previs (77,78,97), l'avaluació de les imatges es dugué a terme exclusivament per cirurgians de Mohs sense experiència prèvia en microscòpia confocal. En el nostre grup vàrem voler demostrar la validesa externa d'aquest criteri per a demostrar que el que veia el cirurgià de Mohs amb experiència amb MCF també era reproduïble amb dos observadors externs sense experiència prèvia en talls de CMM ni en mosaics de MCF. Aquest fet dona més validesa i consistència als criteris descrits i demostra que són reproduïbles a observadors sense experiència prèvia facilitant així la corba d'aprenentatge en l'adaptació a aquesta nova tecnologia.

Només a l'estudi abans mencionat (95), es va realitzar una validació externa dels criteris i estructures visualitzades als mosaics de MCF amb una molt bona correlació ($\kappa > 0.75$) per a la majoria de criteris que ells van descriure de CBC. Per altra banda, també en aquest article es descriuen les principals estructures que es poden veure a les seccions de CMM (epidermis, dermis, glandes ecrines, unitats pilosebàcies, múscul

estriat i teixit adipós) i es demostra una correlació molt alta quan es compara amb la histopatologia clàssica ($\kappa > 0.8$).

Es va veure una bona correlació interobservador amb valors de kappa superiors a 0.7, així demostrant que aquests criteris eren vàlids i reproduïbles.

Els resultats s'exposen a la **TAULA III**:

TAULA III

Observadors	# 1	# 2
Fluorescència	1	1
Bona delimitació	.78	.68
Apilament nuclear	.78	.68
Estacada	.9	.76
Fenedura	.9	.7
Pleomorfisme nuclear	.86	.86
Augment rati N/C	.7	.74
Presència d'estroma	.87	.87

I. 4. CAPACITAT DE LA MCF PER A CLASSIFICAR ELS CBC EN ELS PRINCIPALS SUBTIPUS DE CBC

Per altra banda es va voler analitzar quina capacitat tenien les imatges de MCF per a classificar cada CBC en un dels subtipus principals: superficial, nodular i infiltratiu-microcordonal.

Per això, en cada un dels anteriors casos l'investigador principal els va classificar en un dels 3 grups a les imatges de MCF. Posteriorment, de forma independent i a cegues, el metge patòleg encarregat de llegir les laminetes en H&E va fer el mateix com es fa de rutina considerant aquesta lectura el "patró or" amb què comparar.

Es va demostrar una molt bona correlació morfològica per a la classificació dels CBCs entre el cirurgià de Mohs amb els mosaics de MCF i el patòleg amb la H&E (coeficient de correlació $\kappa = 0.9$).

No es troba a la literatura cap altre article que demostrï que la MCF és una bona eina per a diferenciar els diferents subtipus de CBC. Longo et al (95), descriuen les característiques morfològiques de cada un dels subtipus de CBC però sense demostrar que a partir de les imatges de MCF es pugui predir de quin subtipus de CBC es tracta. A més, aquest estudi com els altres està fet amb els marges quirúrgics de cirurgies de Mohs pel que la morfologia del CBC que s'observa només és parcial en el millor dels casos.

I. 5. DIFERÈNCIES ENTRE ELS SUBTIPUS DE CBC EN QUAN AL CRITERIS DE MCF

Una vegada identificats els criteris que millor definien un CBC als mosaics de MCF amb diferències estadísticament significatives en relació a les estructures normals de la pell es van voler estratificar i analitzar per a cada un dels tres principals subtipus histològics de CBC: superficial (sCBC), nodular (nCBC) i infiltrant (iCBC).

Com es pot veure amb més detall a la **TAULA IV**, no es van observar diferències estadísticament significatives entre els subtipus de CBC en quant a fluorescència, estacada, pleomorfisme nuclear i augment de la relació N/C, ja que tots aquest criteris estaven presents de forma més o manco homogènia en tots els casos. De tots els altres articles publicats a la literatura sobre la temàtica, només Longo et al (95) descriuen uns criteris de CBC com s'ha dit abans i calculen les seves freqüències en cadascun dels subtipus de CBC. Però no ho fan a partir de les imatges de MCF, sinó que un cop determinat el subtipus de CBC en les seccions histològiques convencionals, després miren quins criteris tenen cadascun en els mosaics de la MCF.

TAULA IV

FCM criteria	BCC 69 (100%)	sBCC 7 (10.1%)	Chi-Quadrada	p		nBCC 10 (14.5%)	Chi-Quadrada	p	iBCC 52 (75.4%)	Chi-Quadrada	p
Bona delimitació	27 (39.1%)	1 (14.3%)	18.9	<0.0005		10 (100%)	18.9	<0.0005	16 (30.8%)	18.9	<0.0005
Apilament nuclear	63 (91%)	1 (14.3%)	58.2	<0.0005		10 (100%)	58.2	<0.0005	52 (100%)	58.2	<0.0005
Estacada	66 (95.7%)	7 (100%)	n.s.	-		10 (100%)	n.s.	-	49 (94.2%)	n.s.	-
Fenedura	36 (52.2%)	7 (100%)	16.07	<0.0005		9 (90%)	16.07	<0.0005	20 (38.5%)	16.07	<0.0005
Pleomorfisme nuclear	69 (100%)	7 (100%)	n.s.	-		10 (100%)	n.s.	-	51 (98.1%)	n.s.	-
Augment del rati N/C	69 (100%)	7 (100%)	n.s.	-		10 (100%)	n.s.	-	52 (100%)	n.s.	-
Estroma Absent	4 (5.8%)	2 (28.6%)	15.78	<0.005		1 (10%)	15.78	<0.0005	1 (1.9%)	15.78	<0.005
< 50%	16 (23.2%)	4 (57.1%)				1 (10%)			11 (21.1%)		
> 50%	49 (71%)	1 (14.3%)				8 (80%)			40 (77%)		

Taula IV. Subtipus de CBC.

Comparació de la diferent distribució del criteris entre els principals subtipus histològics de CBC.

A les imatges de MCF els **sCBC (Figura 15)** es veuen com apilaments de nuclis hiperfluorescents pleomòrfics al llarg de la capa basal de l'epidermis; a causa de la dificultat per a veure els seus marges exactes i com que molts cops són lesions multifocals els sCBC són lesions mal delimitades en la seva immensa majoria. Per altra banda la fenedura es va observar en tots els casos de sCBC però tenien manco reacció estromal que els altres subtipus de CBC. Aquests resultats concorden amb l'article recentment publicat per Longo et al (95) en el qual veuen que en els sCBC no hi ha presència d'illes tumorals (no hi ha apilament) i que el 100% d'ells presenten estacada perifèrica, fenedura així com augment del rati N/C.

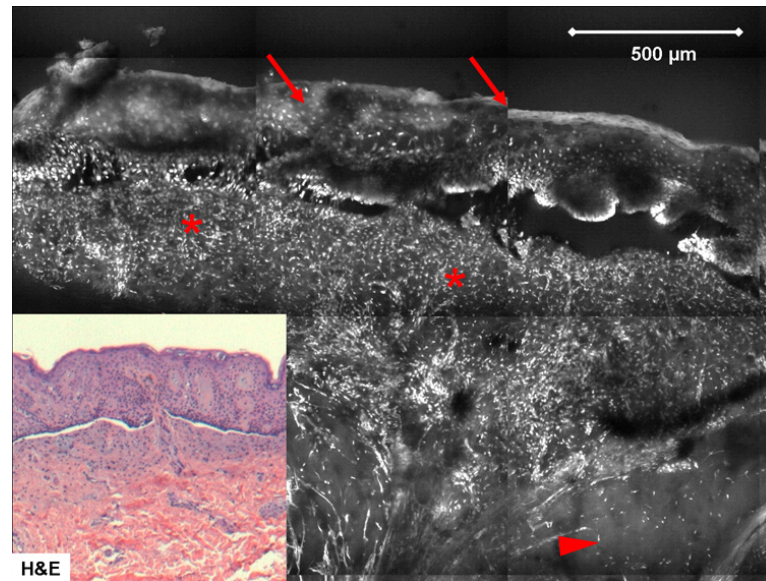


Figura 15. Mosaic de MCF d'un CBC superficial. Es pot observar una proliferació mal delimitada a la capa basal de l'epidermis de punts pleomòrfics hiperfluorescents en una densitat major que en l'epidermis suprajacent (fletxes). Aquests punts corresponen als nuclis tumorals que ahora estan arranats formant estacada perifèrica. A continuació es veu un espai negre (aflorescent) que separa el tumor del seu estroma i que correspon a la fenedura. Es pot observar l'estroma tumoral (asteriscos) com en un fons aflorescent on es veuen multitud de nuclis dispersos que corresponen a limfòcits inflamatoris i fibroblastes activats. Molt diferent de la dermis normal (cap de fletxa) on s'observen de color gris els feixos de col·làgena amb una densitat molt menor de nuclis. Al quadre es veu la corresponent imatge histopatològica (H&E, x40).

En els **nCBC** els marges es poden delimitar correctament, per tant i a diferència dels altres subtipus de CBC, es consideren com a ben delimitats a les imatges de MCF. Tots els nCBC presentaven apilament nuclear i a la majoria es podia observar fenedura. Com mostra la **Figura 16**, un nCBC es veu als mosaics de MCF com a una massa ben delimitada de nuclis hiperfluorescents pleomòrfics apilats i amb una relació N/C augmentada. A la perifèria de la lesió s'observa estacada perifèrica, fenedura tot envoltat d'estroma tumoral. Aquests resultats també coincideixen en gran mesura amb els 20 nCBC que en van analitzar a l'estudi de Longo et al (95). En aquest estudi, tots els nCBC presentaven illes tumorals hiperfluorescents (massa hiperfluorescent de cèl·lules apilades segons la nostra nomenclatura). També en el 100% de casos es va observar estacada perifèrica i fenedura amb una relació N/C augmentada.

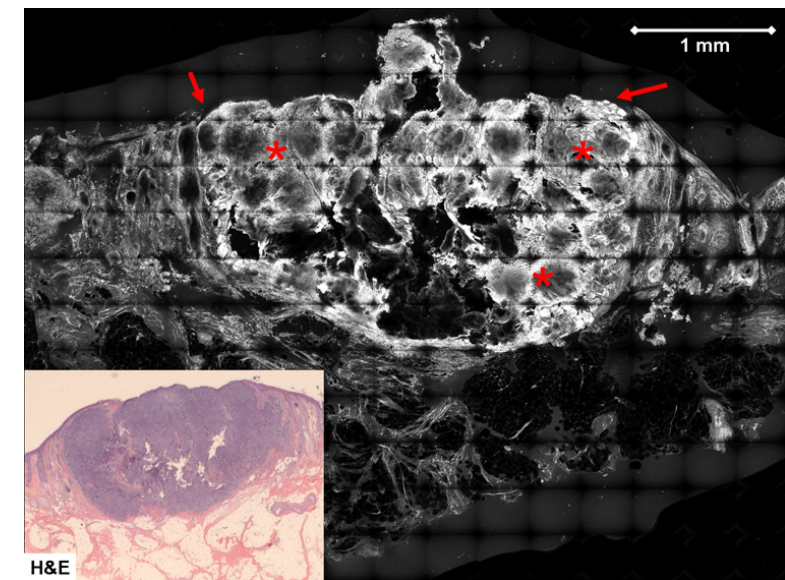


Figura 16. Mosaic de MCF d'un CBC nodular. S'observa una proliferació tumoral composta per una massa central formada per múltiples nòduls de nuclis apilats hiperfluorescents, pleomòrfics amb tendència a formar estacada perifèrica (asteriscos). Un espai sense fluorescència correspon a la fenedura que separa el tumor de la dermis del voltant que presenta poca reacció estromal. Es pot veure en aquest cas la ulceració tumoral de l'epidermis (fletxes). Al requadre es mostra la corresponent imatge histopatològica (H&E, x20).

Els **iCBC** són lesions mal delimitades en un 70% dels casos on no es pot dir amb certesa on comença i on acaba la lesió. La majoria dels **iCBC** presenten apilament nuclear però només en el 38% s'observa fenedura. En canvi en el 98% dels casos els **iCBC** es troben immersos en un dens estroma tumoral en comparació al 29% dels **sCBC**, essent aquestes diferències estadísticament significatives. En general, els **iCBC** sota la MCF es veuen com a masses mal delimitades de nuclis hiperfluorescents, pleomòrfics i apilats. A partir de la massa central s'observen cordons tumorals que envaeixen la dermis i es van aprimant com més profundes són. A més, com més fins són aquests cordons tumorals manco apilament nuclear, estacada i fenedura presenten. La **figura 17** mostra un exemple d'un mosaic de **iCBC** visualitzat al MCF. Longo et al (95), posteriorment van arribar a conclusions similars. Van demostrar que a tots (31/31) els **iCBC** (incloent els microcordons) que van estudiar hi havia presència de cordons hiperfluorescents més o manco gruixuts amb apilament nuclear. També concordants són les xifres que demostren que en el 100% dels casos hi havia un augment de la ràtio N/C i que només a un terç dels casos s'observés fenedura. En quant a l'estacada perifèrica, les xifres són discordants; al nostre estudi es va demostrar que estava present en el 94 dels casos, mentre que només en 13/24 a l'altre estudi. Això es podria explicar perquè el nostre grup va analitzar el total del tumor i es va observar que si bé en la massa central existia aquest criteri, a mesura que els cordons s'anaven fent més prims aquest criteri desapareixia. Per això, és raonable pensar que a l'analitzar només les seccions més perifèriques del tumor la proporció d'aquest criteri fos més baix.

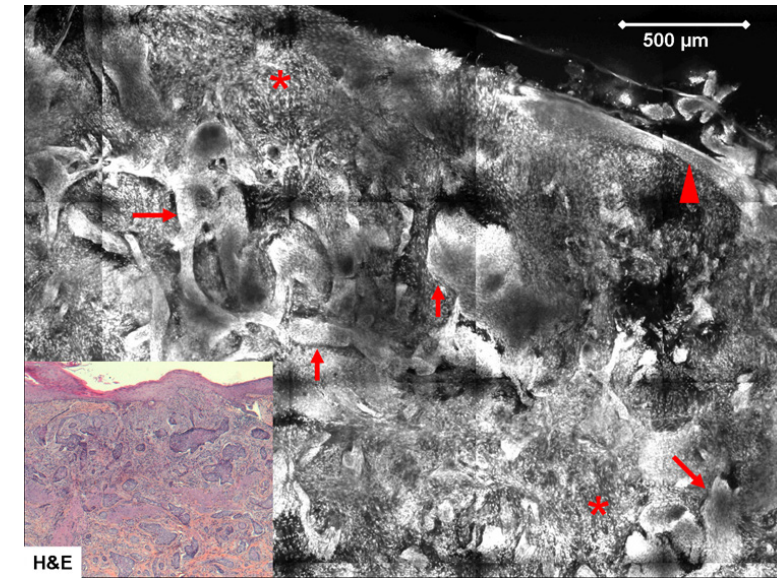


Figura 17. Mosaic de MCF d'un **CBC** infiltrant. Es pot observar una proliferació de nius i cordons (fletxes) formats per nuclis pleomòrfics hiperfluorescents molt densament empaquetats que infiltrin tot l'espessor de la dermis sense uns marges ben delimitats. A resaltar en aquest cas que com més a la perifèria mirem, més fins són els cordons tumorals on es perden les imatges d'estacada i fenedura. Tot el tumor es troba immers en una dermis modificada, molt cel·lular que correspon a l'estroma tumoral (asteriscos) format predominantment per infiltrat inflamatori. Encara que a la part central de la imatge s'observa ulceració, la epidermis restant té una aparença normal (cap de fletxa). Al requadre es mostra la corresponent imatge histològica (H&E, x40).

II. APLICACIÓ DE LA MCF EN LA DETECCIÓ DE CARCINOMA BASOCEL·LULAR ALS MARGES QUIRÚRGICS PER LA TÈCNICA DE MOHS-TROMOVICH

En el primer treball es van descriure i validar criteris per a la detecció precisa de restes de CBC als mosaics de MCF. Per tant, la MCF seria una tècnica d'imatge vàlida per a examinar els marges quirúrgics durant la CMM en temps real i que requeriria una manipulació mínima de la mostra. A més, com que la peça s'examinaria en el mateix quiròfan pel cirurgià de Mohs es podria disminuir els temps i el personal involucrat en el processat de les mostres respecte a la tècnica actual o "clàssica" en congelat, disminuint així els costos de la tècnica.

Emperò, no es disposaven d'estudis previs prospectius que demostrassin aquestes premisses. En els estudis previs on s'ha intentat demostrar la utilitat de la MCF en la detecció de restes de CBC als marges de CMM tant amb blau de toluïdina (87) com amb taronja d'acridina (77) sempre s'han utilitzat totalment (78, 97, 98) o parcialment (95) mostres rebutjades després de fer el diagnòstic histològic en congelat. Per aquest motiu es va dissenyar un estudi prospectiu on es pretenia recollir de forma prospectiva pacients amb CBC tributari de tractament mitjançant CMM en els que cada peça quirúrgica s'examinaria per MCF en primera instància i posteriorment es compararia amb les seccions histològiques en congelat considerades el "patró or".

Per a cada una de les mostres es va determinar la capacitat de la MCF per a la detecció de restes de CBC; l'autor principal amb la peça en fresc tenyida amb taronja d'acridina determinava prospectivament dins el quiròfan si era positiva o negativa per CBC. Posteriorment cada peça es processava en congelat i tenyida amb H&E i es comparaven els resultats. Per altra banda també es va quantificar el temps invertit en cadascuna de les tècniques fins a l'obtenció dels mosaics en el cas de la MCF o de les laminetes en el cas de la tècnica "clàssica".

La manipulació de les mostres de teixit en fresc de les CMM amb taronja d'acridina ha demostrat repetidament no alterar les propietats físicoquímiques de tinció ni citològiques del teixit (77,95). Per això, i per reproduir el més fidelment possible les condicions habituals en una unitat de CMM el nostre grup va optar per a escanejar amb la MCF el teixit en fresc tot just després de ressecar-lo del pacient abans de qualsevol processament en congelat. Creiem que aquest fet és molt important perquè el procés de conge-

lació altera en certa manera l'arquitectura de les cèl·lules i les seves propietats tintorials ulteriors. Per aquest motiu, creiem que els nostres resultats són 100% extrapolables a la pràctica clínica diària en una unitat de cirurgia de Mohs, perquè estan fets en condicions reals amb el teixit en fresc i escanejat a la capçalera del llit de quiròfan.

Així, la MCF podria ésser una alternativa fiable a la histopatologia convencional per a l'avaluació dels marges quirúrgics durant la CMM i podria reduir el temps de processat de les mostres així com els costos.

II. 1. CAPACITAT DE LA MCF PER A LA DETECCIÓ DE CBC RESIDUAL

Es van reclutar 80 CBC procedents de 74 pacients tributaris de tractament amb CMM. Per a cada lesió es van recollir imatges prequirúrgiques clíniques i dermatoscòpiques del tumor primari així com es van escanejar els marges quirúrgics mitjançant MCF del primer estadi de la CMM. A més, es van recollir dades epidemiològiques dels pacients i dels tumors que s'exposen a la **TAULA V**:

TAULA V

Pacients		74 (100%)
CBC		80 (100%)
Sexe	Homes Dones	44 (59%) 29 (41%)
Localització	Cap i coll Tronc	73 (91%) 7(9%)
Tumor	Primari Recidiva	63 (78%) 17 (22%)
Subtipus histològic	Infiltrant Nodular Superficial	67 (84%) 9 (11%) 4 (5%)

Les característiques dels pacients i dels tumors del nostre estudi són comparables als les altres sèries publicades (80,95); en especial a la distribució asimètrica dels subtipus histològics de CBC. A totes les sèries, inclosa la nostra, hi ha una proporció molt elevada de CBC infiltrants, car es tracten de sèries de pacients tributaris de CMM.

La MCF crea mosaics que reproduïxen l'arquitectura de la pell normal i la forma del tumor en temps real i amb resolució cel·lular. Però a l'hora d'interpretar i avaluar aquests mosaics no podem utilitzar la terminologia de colors de l'histopatologia convencional perquè aquesta es fonamenta en la diferent apetència pels colorants que en cada cas s'utilitzin. Així, les imatges de MCF es componen a partir de la fluorescència emesa

pels nuclis cel·lulars que prèviament han captat el taronja d'acridina. Per aquest motiu és que quan descrivim una imatge de MCF parlarem d'estructures hiperfluorescents o hipofluorescentes en cada cas.

En el treball previ, l'autor va descriure, avaluar i validar 8 criteris que es van demostrar útils per a la detecció de CBC i diferenciar-les de les estructures de la pell normal. Així, als mosaics de MCF els CBC es veurien com una massa més o manco ben delimitada de punts hiperfluorescents (nuclis) pleomòrfics i apilats amb una tendència a arranjar-se en estacada perifèrica. La presència d'una fenedura que el separa de l'estroma tumoral són imatges molt suggestives de CBC. Així, quan els mosaics i submosaics foren avaluats a la recerca de restes de CBC es van seguir aquests criteris per a determinar si una estructura era o no suggestiva de CBC.

De forma prospectiva, l'autor principal va escanejar directament el teixit en fresc recent extirpat de les 80 CMM, creant un total de 120 mosaics de MCF de 12 x 12 mm al quiròfan. Cada mosaic es va dividir en 4 per a la seva avaluació, obtenint-se 480 submosaics. Així, es va seguir la metodologia utilitzada a la primera sèrie publicada per Karen et al (78), en la qual de 48 tumors escanejats els dividien en submosaics i el número final era de 149 que contaven per l'estudi estadístic i que després han reproduït en altres publicacions (98).

En el nostre estudi cal destacar que totes les cirurgies es van dur a terme pel mateix cirurgià de Mohs i van ser escanejades i avaluades per la mateixa persona amb el mateix equip de MCF: el doctorant. Aquest fet dona als estudis una homogeneïtat en els mètodes i procediments que no trobam en la resta de la bibliografia consultada. Totes les cirurgies de Mohs, com es comenta es van fer seguint la metodologia habitual de l'ACMS (American Academy of Mohs Surgeons); es a dir, fent els talls a 45° de la superfície cutània i aplanant la peça de tal forma que les 3 dimensions de la pell queden convertides en 2 per al seu estudi confocal i histològic. Aquesta homogeneïtat no es troba a l'estudi de Ziefle et al (97), on mesclen fins a 4 formes diferents d'avaluació preoperatòria dels marges quirúrgics. En un altra estudi (95) es mesclen imatges de mostres extretes per 2 cirurgians diferents i 2 avaluadors de les imatges diferents. A més, està fet en dos centres diferents que utilitzen aparells de MCF diferents amb longituds d'ona diferents que, encara que les imatges són similars, no són idèntiques i es pot criticar la seva reproductibilitat.

L'avaluació es va fer in situ buscant restes de CBC primer a 20 augments i després a 40 augments utilitzant l'eina panzoom en cada un dels 480 submosaics, reproduint així la manera habitual de llegir les laminetes histològiques en congelat durant la cirurgia de Mohs. En alguns casos, per aclarir dubtes augments de 100 a 300 van ésser necessaris en alguns submosaics. Cada submosaic va ésser classificat com a positiu o negatiu per CBC i es va comparar amb l'histopatologia en congelat (tenyida amb H&E o BT) que va ésser avaluada de forma independent i a cegues per un dels dermatopatòlegs de l'Hospital Clínic de Barcelona. L'autor té experiència tant en la lectura de les laminetes en congelat com en la interpretació dels mosaics de MCF, car ha tingut una bona formació en ambdós camps.

En aquest sentit, els estudis que estan fets amb una metodologia més acurada i semblant a la nostra són els publicats per Karen et al (78) i Larson et al (98); perquè hi ha una bona homogeneïtat tan en els procediments quirúrgics com en la metodologia d'adquisició de les imatges. Emperò, totes les mostres escanejades provenen de peces de CMM rebutjades i descongelades.

Així, la S, E, el VPP i VPN foren de 88%, 99%, 98% i 97% respectivament de la MCF en la detecció de restes de CBC en els marges quirúrgics de CMM comparat amb el "patró or" que és la histopatologia en congelat. Els resultats es detallen a la taula de contingència a la **TAULA VI**:

TAULA VI

	H&E + (%)	H&E - (%)	N (%)
FCM +	79 (88.76%)	1 (0.25%)	80 (16.67%)
FCM -	10 (11.24%)	390 (99.75%)	400 (83.33%)
N	89 (18.54%)	391 (81.46%)	480 (100%)

Dels 89 positius vertaders per CBC provat per l'histologia en congelat (H&E), se'n van detectar 79 a les imatges de MCF, no detectant-se'n 10 (falsos negatius). Com que el que es pretenia era validar una nova eina diagnòstica era imprescindible saber on i com havíem errat aquests 10 casos que repercutien negativament en la sensibilitat de la nova tècnica. Es van revisar retrospectivament cada un d'aquests casos i es va veure que corresponien tots a les varietats de CBC microcordonals o esclerodermiformes que formaven cordons de 2 a 4 cèl·lules molt difícils de detectar inclús amb la tècnica habitual "clàssica". Fent autocrítica, pensam que hi pot haver varies raons per les quals no es van detectar aquests 10 casos. En primer lloc hi ha raons tècniques, car que es tracta d'una tècnica nova i que l'aparell que disposem és un prototip, pel que no existeixen programes específics de formació. És per això que vam haver de descriure i protocolitzar els procediments per a l'estudi del marge en fresc durant la CMM i la nostra experiència no era gaire àmplia al principi i com totes les tècniques requereix d'una corba d'aprenentatge (78). Encara que els nostres 10 falsos negatius estaven repartits al llarg de tot l'estudi, la majoria (7) es van detectar dins de la primera meitat de l'estudi i, encara que no s'ha fet l'estudi estadístic, aquestes diferències es podrien explicar en part per la corba d'aprenentatge. Karen et al (78), també van revisar els casos discordants i encara que tampoc ho van poder demostrar estadísticament comentem en aquesta publicació que s'observa un augment de la S i de la E d'ambdós avaluadors a mesura que l'estudi avança.

No seria impossible pensar que alguns d'aquests casos corresponguin a falsos positius de l'H&E i no a falsos negatius de la MCF. Es a dir, quan es manipula la mostra en congelat en el criòtom abans d'agafar la secció útil per al seu ulterior preprocessament de tinció sempre es malbaraten algunes micres de teixit. Així, podria ser que encara que el marge vertader que és el que s'avalua amb la MCF sigui negatiu per CBC, al profunditzar amb el criòtom un tumor que es troba a poques micres del marge es vegi com a positiu a les laminetes d'H&E.

Per altra banda, dels 391 mosaics negatius per CBC, la MCF només es va detectar erròniament 1 (fals positiu). Aquestes dades suporten la idea de que la MCF és una eina útil i fiable que quan es detecta una imatge suggestiva de CBC en un mosaic tenim gairebé la certesa de que realment aquest marge és positiu a la CMM. Així, quan realitzam una CMM, la MCF és capaç de, en menys de 3 minuts, donar-nos uns mosaics capaços de detectar restes de CBC amb una especificitat propera al 100%. Per això que aquest estudi posa les bases perquè la MCF es converteixi en una alternativa real a la tècnica en

congelat i esdevingui una eina per a l'avaluació en temps real i sobre teixit fresc durant la CMM. Així es podrien estudiar els marges sense que el malalt s'aixequés del llit operatori, cosa que s'ha anomenat "patologia a la capçalera del llit".

Encara que els VPP i el PPN foren del 98% i del 97% respectivament no se'ls pot donar rellevància en el gruix de l'estudi, car la prevalença d'un marge positiu a les mostres era baixa.

Quan comparem els nostres resultats amb els treballs semblants que es troben a la literatura veiem que, salvant les diferències metodològiques, són semblants.

Quan a la sensibilitat, Karen et al (78) i Larson et al (98), reporten resultats una mica millors que els nostres de 96.6% i de 94% respectivament (comparat amb el 88% del nostre estudi). Aquests resultats creiem que es poden explicar almanco parcialment perquè els dos estudis citats es van fer en unes condicions experimentals en les quals les mostres s'escanejaven després d'haver-les congelades i tallades amb el criòtom. Aquest processament aplanava la mostra, la fa més homogènia i retira possibles interferències (sang, limfa...). Per aquest motiu i perquè les imatges foren agafades en condicions de laboratori probablement eren més clares i els detalls de petits cordons de CBC es podrien haver observat amb més claredat que en el nostre on les mostres van ser analitzades en el mateix quiròfan amb múltiples interferències i artefactes. Una altra explicació, seria que a l'aplicar el MCF després de realitzar els talls de congelació, en realitat s'ha aprofundit en el teixit i s'ha fet que els cordons tumorals aflorin i siguin més fàcilment reconeixadors. En canvi, a l'estudi de Ziefle et al (97), la sensibilitat mitjana només fou del 82%. Creiem que aquests resultats també es poden explicar perquè els autors fan servir mètodes de control tridimensional intraoperatori com el "muffin", tècnica en la qual és molt difícil aplanar la mostra i visualitzar el 100% del marge. Per altra banda, aquest autors utilitzaren blau de toluïdina com a fluoròfor, cosa que podria haver influït en una pitjor qualitat de les imatges (observació personal basada en les imatges publicades). Longo et al (95), no calculen directament la sensibilitat de la MCF per a la detecció de CBC però reporta que la correlació entre la MCF i la histopatologia convencional per dir si hi ha o no presència de CBC fou molt alta (κ 0.9).

Posteriorment, Larson et al (98), en un estudi semblant al de Karen et al (78) però utilitzant un nou model d'adquisició d'imatges més ràpid i eficient, reporten una sensibilitat del 94%, emperò aquest és una sèrie molt curta (17 pacients) encaminada a provar aquesta millora tecnològica.

En relació a la especificitat, en el nostre estudi (99%) va resultar esser la més alta de tots els treballs publicats (78,97,98) . Els estudis metodològicament més semblants als nostres són els de Karen et al (78) i Larson et al (98), on es va demostrar una E del 89.2% i del 94% respectivament; resultats aquests una mica inferiors als nostres però encara molt bons per tractar-se d'una nova eina diagnòstica en fase de validació. A l'estudi de Ziefle et al (97), la especificitat fou molt més baixa: 61%. Aquestes diferències es podrien explicar per diversos motius. En cap dels estudis anteriors es varen basar en uns criteris validats per a la detecció d'imatges de CBC com vam fer en el nostre grup. Per això, si apliquem els criteris descrits al nostre primer article la possibilitat de cometre un fals positiu és gairebé nul·la perquè l'especificitat és del 99%. Un altre motiu pel qual es podria explicar aquest fet en els dos primers articles és el fet que les imatges de MCF estaven preses després de descongelar les mostres i, per tant, podria ser que es formin artefactes que duguin a confusió amb més falsos positius. Per altra banda, a l'article de Ziefle et al (97), és molt probable que aquesta especificitat tan baixa amb una mitjana de 61% (i en alguns mètodes de processament de les peces com les seccions mitjanes tan sols del 36.8%) s'expliqui per problemes tècnics i de procediment. En aquest article utilitzen fins a 4 mètodes per al processament i orientació de les mostres per a estudiar peroperatòriament, en algunes de les quals com el "muffin" és vertaderament molt difícil aconseguir aplanar la peça en 2 dimensions com requereix l'estudi amb la MCF. Per altra banda, la utilització d'àcid acètic com a agent de contrast i la utilització de reflectància en lloc de fluorescència fa molt menys precisa la tècnica amb imatges manco nítides i contrastades. A l'article de Longo et al, es demostra que la concordança entre la MCF i la histopatologia convencional en congelat a l'hora de dir si és "positiu o negatiu" per CBC és quasi absoluta ($\kappa = 0.9$), emperò no es donen explícitament la S ni la E.

II. 2. CÀLCUL DEL TEMPS INVERTIT PER AL PROCESSAMENT DE LES MOSTRES

La cirurgia de Mohs és la millor tècnica de la que disposam actualment per al tractament de CBC d'alt risc, car assegura les més altes taxes de curació amb el mínim malbaratament de la pell sana perilesional (100,101).

Emperò, és una tècnica que consumeix temps i recursos per la qual en la majoria d'hospitals públics europeus no disposen de la infraestructura ni la logística necessària (102). En primer lloc hi ha molt pocs centres que disposin del laboratori d'histopatologia dins de l'àrea quirúrgica. Normalment el laboratori es troba centralitzat amb tota la patologia general en una àrea que pot distar molts minuts (5-10) per al transport del material de la CMM. No és només una qüestió de temps, sinó que perquè el tècnic estigui present en l'acte operatori, que seria allò ideal, s'ha de canviar de roba mentrestant i durant el camí la mostra pot sofrir qualsevol tipus d'accident que alteri o faci perdre l'orientació de la mateixa traient tot sentit a la CMM. A més, quan la mostra està processada, el cirurgià de Mohs s'ha de desplaçar als laboratoris centrals per a la lectura de les laminetes juntament amb el metge especialista en patologia, ja que a Europa no hi ha legislació específica i per tant qualsevol informe patològic l'ha de signar l'especialista citat.

Tot això fa que la CMM sigui una tècnica excessivament lenta que, en alguns casos pot arribar a trigar 45 minuts per estadi, i excessivament cara pel nombre de personal i la manca d'infraestructures que facilitin la logística pròpia de la CMM als centres públics europeus. A més, a causa del trànsit entre àrees estèrils i no estèrils pot comprometre l'eficient asèpsia de les àrees quirúrgiques.

En tots els articles sobre la temàtica (75, 77, 81, 86-93, 95-98), es comenta també que la CMM és una tècnica útil i eficaç però que quan es du a terme amb la metodologia convencional amb histopatologia en congelat pot trigar entre 30 i 45 per a la obtenció de les laminetes en cada estadi mentre que quan això es fa mitjançant la MCF els temps es redueix fins a només 9-12 minuts. Emperò en cap dels articles publicats es va calcular el temps emprat amb cada una de les tècniques, cas per cas, ni es facilita una mitjana calculada objectivament. Per això, encara que es mencioni repetidament que és una tècnica ràpida, ningú no havia demostrat estadísticament que quan les mostres es processen per MCF el temps emprat fins a l'obtenció de les imatges és estadísticament inferior que quan es fa amb els talls en congelat.

Per això que es va aprofitar la metodologia abans descrita per a calcular prospectivament en els 80 casos anteriors el temps invertit per a l'obtenció de mosaics en el cas de la MCF i es va comparar amb el temps invertit fins tenir les laminetes processades en congelat i tenyides amb H&E.

En el cas de la MCF, el temps mitjà invertit per al processament de la mostra fou de 10.1 minuts. Aquest temps inclou la tinció amb taronja d'acridina, la manipulació de la mostra perquè quedi ben orientada a la placa del microscopi confocal, i l'obtenció en si mateix del mosaics. Aquest temps fou inferior als 28.2 minuts de mitjana que es van invertir en el processament en congelat; aquestes diferències foren estadísticament significatives ($p < 0.001$). La **figura 18** esquematitza aquests resultats:

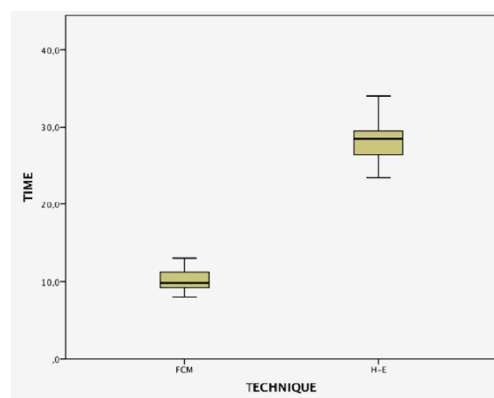


Figura 18. Temps mitjà invertit amb la MCF en comparació a la histopatologia clàssica en congelat amb tinció per H&E.

Així, s'ha demostrat per primer cop que la MCF és una eina que amb una alta fiabilitat i reproduïbilitat és capaç de reduir el temps de processament de les mostres durant la CMM. D'aquesta manera s'estalviaria temps de quiròfan, del cirurgià, dels tècnics i altres professionals involucrats en la CMM fent-la un procediment més àgil, disminuint costos i reduint el temps operatori que, donada l'avançada edat dels pacients en molts cops, acaba repercutint també en la qualitat assistencial de tot el procés.

Tot això permetrà una visualització millor i més ràpida dels marges quirúrgics en la cirurgia de Mohs del CBC en la pràctica clínica diària reduint el temps total de la cirurgia beneficiant al pacient, al cirurgià i a l'hospital. A més es reduirà la infraestructura necessària així com el personal auxiliar necessari per a la cirurgia fent el procediment més àgil i eficient disminuint també els costos directes i indirectes de la CMM.

S'ha demostrat repetidament que la CMM és la tècnica quirúrgica que assegura unes taxes més baixes de recurrències en el CBC (100), per tant evitant ulteriors cirurgies més agressives, mutilants, complexes i costoses. També s'ha demostrat que és una tècnica que estavia al màxim la pell sana perilesional disminuint la morbiditat i millorant els resultats estètics (101). Emperò, encara tenint uns beneficis tan clars segueix essent una tècnica molt costosa i els estudis de cost-eficàcia, que són la pedra angular que avalua una tècnica mèdica, diagnòstica o quirúrgica en la medicina actual basada en l'evidència científica donen resultats discordants (103-109).

La majoria d'articles que trobem a la literatura (103, 105, 106, 108) incloent una revisió recent (104), coincideixen que la CMM és una tècnica cost-efectiva, en especial en aquells tumors d'alt risc. Emperò també afimen que és molt difícil fer estudis d'aquest tipus a causa de la diversitat de tècniques que entren dins del control intraoperatori de marges que es generalitza com CMM i l'heterogeneïtat de criteri i de qualificació dels metges anomenats "cirurgians de Mohs". També dificulta la diferent retribució de l'acte quirúrgic, tant del cirurgià, infermeria i tècnics de laboratori i, sobretot, les diferències en el cost segons es realitzi la cirurgia en un quiròfan d'un hospital universitari o en una sala de procediments d'un consultori ambulatori. També dificulta la estandardització de procediments el fet de que no hi hagi estudis prospectius metodològicament ben elaborats que comparin la cirurgia de Mohs amb altres tècniques quirúrgiques (exèresi simple) o destructives (electrofulguració, curetatge, criocirurgia). Això és així perquè es faria difícil de justificar èticament el tractament d'un CBC d'alt risc en una zona funcional o estèticament compromesa (zona H) amb mètodes destructius o la despesa innecessària de recursos tractant, per exemple, un CBC superficial de petit tamany a l'esquena mitjançant CMM (110).

Emperò, en els últims anys, han aparegut una sèrie d'articles prospectius, randomitzats i ben estructurats metodològicament duts a terme tant als EUA (109) com a Europa (107) que, encara que veuen que la CMM és lleugerament superior a la cirurgia convencional no troben diferències estadísticament significatives. Altres articles publicats en revistes de prestigi, també conclouen que, si es selecciona bé la tècnica terapèutica segons els tipus tumoral, la localització i les característiques inherents al propi pacient, les diferències entre ells no són significatives (110).

Per aquest motiu, creiem que la MCF podria en un futur no molt llunyà jugar un paper clau per a la reducció del costos de la CMM i, aprofitant la seva superioritat en quant

als resultats oncològics, funcionals i estètics així com també la superior qualitat de vida del pacients (105, 108) tractats amb aquesta tècnica. A més, el nostre estudi obre les portes a futurs estudis que puguin demostrar que es tracta d'una tècnica cost-eficaç per a generalitzar-ne l'ús.

Així, el nostre estudi obriria les portes a futurs treballs en què es demostrï que l'aplicació de la MCF en la CMM és un procediment més cost-efectiu que la CMM convencional.

III. APLICACIONS CLÍNiques: PRESENT I FUTUR DE LA MCF EN LA CIRUR- GIA ONCOLÒGICA CUTÀNIA

La MCF ex vivo és una tecnologia recentment desenvolupada amb possibilitats reals d'esdevenir una alternativa atractiva al processament clàssic de les mostres en congelat i posterior tinció amb H&E en les seccions histològiques durant la cirurgia de Mohs.

La MCF permet el processament en temps real de mostres tissulars en fresc i, com s'ha explicat anteriorment, té una alta fiabilitat per a la detecció de CBC als marges quirúrgics a més de disminuir significativament el temps fins al diagnòstic. Per això representa un primer pas cap a una patologia ràpida "a la capçalera del quiròfan".

En el primer treball s'han descrit i validat uns criteris morfològics per al diagnòstic de CBC en els mosaics de CBC que han estat el fonament per a demostrar la fiabilitat d'aquesta eina quan l'apliquen a la CMM en el segon treball.

Aquest projecte ha permès al nostre equip incorporar la microscòpia confocal de fluorescència ex vivo a la cirurgia de Mohs i ofereix com a principal novetat que totes les imatges s'han pres en el mateix quiròfan abans de procedir al congelat i processat de les peces. Està demostrat que la immersió en taronja d'acridina no afecta l'ulterior processat de la mostra en congelat però en tots els estudis precedents, les imatges de MCF s'havien pres després de descongelar les peces.

El nostre grup va apostar des del principi per adquirir prospectivament els mosaics de MCF ex vivo immediatament després de l'extracció de la peça quirúrgica intentant imitar al màxim el procediment habitual d'estudi dels marges en la CMM. Aquest fet pensem que és de gran importància, ja que, a més d'evitar els possibles artefactes propis de tot procés de congelació-descongelat és un primer pas cap a la implementació d'aquesta tècnica en la pràctica diària de la CMM.

A més, durant aquest any d'experiència aplicant la MCF ex vivo a l'estudi dels marges quirúrgics durant la CMM s'ha demostrat que si el professional té una sòlida base de coneixements en dermatopatologia, cirurgia dermatològica en general i en CMM en particular, així com en microscòpia confocal, la corba d'aprenentatge és relativament ràpida. Amb un període d'aprenentatge que va incloure els primers 8-12 casos i algunes proves prèvies amb deixalles de pell normal d'altres cirurgies es va obtenir una bona S, E, VPP i VPN durant l'estudi i una bona qualitat dels mosaics.

Per això és que els present estudi pretén establir les bases per a un futur estudi de cost-eficàcia que donaria llum verda a la implementació d'aquesta tecnologia en la pràctica diària durant la cirurgia de Mohs fent-la més àgil i disminuint els costos.

En la tercera publicació es demostra que l'aplicabilitat clínica de la MCF ex vivo va més enllà de la pura avaluació dels marges quirúrgics durant la CMM. S'explica que, com que amb la MCF es poden obtenir imatges en pocs minuts amb molt bona correlació morfològica de l'arquitectura tissular i amb resolució tissular també es pot utilitzar com una eina per a obtenir una biòpsia ràpida en cas de dubte raonable. En el cas concret es descriuen dos casos de dues pàpules blanquinoses amb característiques clíniques i dermatoscòpiques semblants i inespecífiques que foren remesos per a CMM. Per evitar ulteriors morbiditats en els pacients i demorar el diagnòstic i donat que la punta nasal és un lloc on la MCR (VIVASCOPE® 1500) no es pot realitzar correctament es va decidir fer una biòpsia per afaitat de cadascuna d'elles. En el mateix quiròfan, i en menys de 5 minuts es van obtenir els mosaics que permeteren establir el diagnòstic de CBC en un cas i, per tant, prosseguir amb la CMM i de nevus dèrmic en l'altre no requerint altre tractament. Per tant, a part de l'aplicabilitat en les biòpsies ràpides de pell el nostre grup pensa que això només és l'inici d'una nova era per a la patologia general i quirúrgica en concret en què el processament ràpid i digitalitzat de les mostres s'imposarà. Emperò, això serà un llarg camí en el qual s'hauran de resoldre moltes qüestions tècniques, legals i de personal abans de que sigui un fet generalitzat.

A més, hem començat a treballar en un projecte de gran envergadura en el qual es pretenen lligar a les molècules fluorescents anticossos teixit o cèl·lula-específics que ens permetin en el futur poder diferenciar determinats tipus cel·lulars, inclús diversos alhora com es fa avui en dia amb les tècniques d'immunohistoquímica.

A dia d'avui, i amb l'evidència científica demostrada en aquest article i d'altres que l'han precedit podem afirmar que:

- Donada la E propera al 100%, si al analitzar els marges quirúrgics durant la CMM mitjançant la MCF hi observem un positiu per CBC, podríem donar-ho com a bo i continuar amb el següent estadi. Estalviant el seu processament habitual, reduint temps i personal i per tant els costos generals de la CMM.

- Si per altra banda, a les imatges dels mosaics de MCF no observem cap rastre de CBC hauríem de fer la comprovació amb la tècnica clàssica en congelat per assegurar el negatiu. Això té una importància cabdalt així com implicacions legals en l'últim estadi quan s'ha de certificar la negativitat del 100% dels marges que encara avui dia s'hauria de fer en congelat i signat per un metge patòleg.

Aquests treballs han servit per a descriure i validar uns criteris i demostrar la capacitat de la MCF per a la detecció de CBC en els marges quirúrgics de CBC. Però, calen més estudis per a tenir una evidència més àmplia i sòlida sobre la seva aplicabilitat. En concret, s'haurien de fer esforços per a familiaritzar els departaments de Patologia general en aquesta nova tècnica, perquè són ells el que tindran l'oportunitat de generalitzar el seu ús a tots els altres teixits.

CONCLUSIONS

1. Els 8 criteris definitoris de CBC en els mosaics de MCF que s'han descrit, són criteris vàlids i reproduïbles (interobservador) per a diferenciar el tumor de la resta d'estructures de la pell normal.
2. Hi ha uns criteris comuns per a tots els subtipus de CBC on no hi ha diferències significatives (fluorescència, estacada, pleomorfisme nuclear i augment de la relació N/C); la resta de criteris (fenedura, apilament nuclear, presència d'estroma i delimitació tumoral) es troben en freqüències diferents (estadísticament significatives) entre els subtipus de CBC.
3. Hi ha un alt grau de correlació ($\kappa = 0.9$) entre la MCF i l'estudi histològic de rutina en la classificació entre els diferents subtipus histològics de CBC (superficial, nodular i infiltrant-micronodular)
4. La MCF ex vivo ha demostrat una alta S, E, VPP i VPN (88%, 99%, 98% i 97% respectivament) en la detecció de CBC residual als marges quirúrgics de la cirurgia de Mohs en comparació amb el "patró or" que és la histologia en congelat i tenyida amb H&E.
5. S'ha demostrat que la MCF disminueix significativament els temps invertit en el processament de la mostra fins a obtenir les imatges comparant-lo amb el processament en congelat clàssic.

BIBLIOGRAFIA

1. Pontén F, Lundeberg J, Asplund A. *Principles of tumor biology and pathogenesis of BCCs and SCCs*. A: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP, eds. *Dermatology*, 2ona edició. Elsevier; 2008: 1627.
2. Carter DM. *Basal cell carcinoma*. A: Fitzpatrick TB, Freedberg IM, Eisen AZ, et al. eds. *Dermatology in General Medicine*, 3a edició New York, NY. McGraw-Hill; 1987: 759.
3. Ting PT, Kasper R, Arlette JP. Metastatic basal cell carcinoma: report of two cases and literature review. *J Cutan Med Surg* 2005; 9: 10–15.
4. Wysong A, Aasi SZ, Tang JY. Update on metastatic basal cell carcinoma: a summary of published cases from 1981 through 2011. *JAMA Dermatol* 2013; May; 149 (5): 615-6.
5. Jackson R, Adams RH. Horrifying basal cell carcinoma: a study of 33 cases and comparison with 435 non-horror cases and report on four metastatic cases. *J Surg Oncol* 1973; 5:431-436.
6. Jacob A. Observations respecting an ulcer of peculiar character, which attacks the eyelids and other parts of the face. *Dublin Hospital Rep Common Med Surg* 1827; 4:232-239.
7. Krompecker D. *Der Basalzellenkrebs*. Jena: Gustav Fischer; 1903.
8. Mallory FB. Recent progress in the microscopic anatomy and differentiation of cancer. *JAMA* 1910;55(18):1513-16.
9. Ten Seldam REJ, Helwig EB. *Histological typing of skin tumors*. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1974.
10. Gilbody JS, Aitken J, Green A. What causes basal cell carcinoma to be the commonest cancer? *Aust J Public Health* 1994; 18: 218–21.
11. Miller DL, Weinstock MA. Nonmelanoma skin cancer in the United States: incidence. *J Am Acad Dermatol* 1994; 30: 774–8.

12. Rubin AI, Chen EH, Ratner D. Basal-Cell Carcinoma. *N Eng J Med* 2005; 353: 2262-9.
13. Marks R. Trends in non melanocytic skin cancer treated in Australia: the second national survey. *Int J Cancer* 1993; 53: 585-590.
14. Reinau D, Surber C, Jick SS, Meier CR. Epidemiology of basal cell carcinoma in the United Kingdom: incidence, lifestyle factors and comorbidities. *Br J Cancer* 2014; 1-4.
15. Ko CB. The emerging epidemic of skin cancer. *Br J Derm* 1994; 130: 269-272.
16. Miller DL, Weinstock MA. Non melanoma skin cancer in the United States: Incidence. *J Am Acad Derm* 1994; 30: 774-780.
17. Diffey BL, Langtry JA. Skin cancer incidence and the ageing population. *Br J Dermatol* 2005; 153: 679-80.
18. Lang PG, Maize JC. Basal cell carcinoma A: Riegel DS. *Cancer of the skin. Elsevier*: 2005: 101-132.
19. Crowson AN. Basal cell carcinoma: biology, morphology and clinical implications. *Modern Pathology* 2006; 19: S127-S147.
20. Niazi ZBM, Lamberty BGH. Perineural infiltration in basal cell carcinomas. *Br J Plast Surg* 1993; 6: 156-157.
21. Cuellar F, Vilalta A, Puig S, et al. Dermoscopy of early recurrent basal cell carcinoma. *Arch Dermatol* 2008 Sep; 144 (9): 1254.
22. Segura S, Puig S, Carrera C, et al. Dendritic cells in pigmented basal cell carcinoma: a relevant finding by reflectance-mode confocal microscopy. *Arch Dermatol* 2007; 143 (7):883-6.
23. Carrera C, Puig S, Malvey J. In vivo confocal reflectance microscopy in melanoma. *Dermatol Ther* 2012; 25 (5): 410-22.
24. Segura S, Puig S, Carrera C, et al. Development of a two-step method for the diagnosis of melanoma by reflectance confocal microscopy. *J Am Acad Dermatol* 2009; 61 (2): 216-29.
25. Lo JS, Snow SN, Reizner GT, et al. Metastatic basal cell carcinoma: report of twelve cases with a review of the literature. *J Am Acad Dermatol* 1991; 24: 715-719.
26. Sahl WJ. Basal cell carcinoma: Influence of tumor size on mortality and morbidity. *Int J Dermatol* 1995; 34: 319-321.
27. Russell EB, Carrington PR, Smoller BR. Basal cell carcinoma: a comparison of shave biopsy versus punch biopsy techniques in subtype diagnosis. *J Am Acad Dermatol* 1999; 41: 69-71.
28. Sexton M, Jones DB, Maloney ME. Histologic pattern analysis of basal cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 1990; 23: 1118-1126.
29. Kore-eda S, Horiguchi Y, Ueda M, et al. Basal cell carcinoma cells resemble follicular matrix cells rather than follicular bulge cells: Immunohistochemical and ultrastructural studies. *Am J Dermatopathol* 1998; 20: 362-369.
30. Goldberg LH. Basal cell carcinoma. *Lancet* 1996; 347: 663-667.
31. Rivas M, Araya MC, Caba F, et al. Ultraviolet light exposure influences skin cancer in association with latitude. *Oncol Rep* 2011; 25 (4): 1153-9.
32. Melnikova VO, Ananthaswamy HN. Cellular and molecular events leading to the development of skin cancer. *Mutation Research* 2005; 571 (1-2): 91-106.
33. Carrera C. Efectos de la radiación ultravioleta en lesiones melanocíticas. Implicaciones en el diagnóstico precoz y prevención del melanoma. Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona 2013.
34. Mouret S, Leccia M-T, Bourrain J-L, et al. Individual photosensitivity of human skin and UVA-induced pyrimidine dimers in DNA. *J Invest Derm* 2011; 131 (7): 1539-46.
35. Zak-Prelich M, Narbutt J, Sysa-Jedrzejowska A. Environmental risk factors predisposing to the development of basal cell carcinoma. *Dermatol Surg* 2004; 30: 248-52.
36. Franceschi S, Levi F, Randimbison L, et al. Site distribution of different types of skin cancer. New aetiological clues. *In J Cancer* 1996; 67: 24-28.
37. Shea CR, McNutt NS, Volkenandt M, et al. Overexpression of p53 protein in basal cell carcinomas of human skin. *Am J Pathol* 1992; 141: 25-29.
38. De Rosa G, Saibano S, Barra E, et al. p53 protein in aggressive and non-aggressive basal cell carcinoma. *J Cutan Pathol* 1993; 20: 429-434.
39. Reifemberger J, Wolter M, Knobbe SB, et al. Somatic mutations in the PTCH, SMOH, SUFUH and TP53 genes in sporadic basal cell carcinomas. *Br J Dermatol* 2005; 152: 43-53.
40. Epstein EH. Basal cell carcinomas: attack of the hedgehog. *Nat Rev Cancer* 2008; 8 (10): 743-54.
41. McCormack CJ, Kelly JW, Dorevitch AP. Differences in age and body site distribution of the histological subtypes of basal cell carcinoma. A possible indicator of different causes. *Arch Dermatol* 1997; 133: 593-596.
42. Twombly R. New carcinogen list includes estrogen, UV radiation. *Journal of the National Cancer Institute* 2003; 95: 185-6.
43. Cuperus E, Leguit R, Albrechts M, et al. Post radiation skin tumors: basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma and angiosarcomas. A review of this late effect of radiotherapy. *Eur J Dermatol* 2013; 23: 749-57.
44. Sordu S, Fitzgerald EF, Bloom MS, et al. Occupational exposure to arsenic and risk of nonmelanoma skin cancer in a multinational European study. *Int J Cancer* 2013; 133 (9): 2182-91.

45. Franseen CC, Taylor GW. Arsenical keratoses and carcinomas. *Am J Cancer* 1934; 22: 287.
46. Li C, Srivastava RK, Elmatz CA, et al. Arsenic-induced cutaneous hyperplastic lesions are associated with the dysregulation of Yap, a Hippo signaling-related protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2013; 438: 607-612.
47. Jarisch W. Zur Lehre von den Hautgeschwulsten. *Arch Dermatol Syphild* (Berlin) 1894; 28: 162-222.
48. White JC. Multiple benign cystic epitheliomas. *J Cutan Genitourin Dis* 1894;12:477-484.
49. Howell JB, Caro MR. The basal-cell nevus: its relationship to multiple cutaneous cancers and associated anomalies of development. *Arch Derm* 1959; 79 (1): 67-77.
50. Gorlin RJ, Goltz RW. Multiple nevoid basal-cell epithelioma, jaw cysts and bifid rib. A syndrome. *N Engl J Med* 1960; 262: 908-912.
51. Johnson RL, Rothman AL, Xie J. Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science* 1996; 272 (5268): 1668-1671.
52. Wilkie AO, Morriss-Kay GM. Genetics of craniofacial development and malformation. *Nat Rev Genet* 2001 Jun; 2 (6): 458-68.
53. Atwood SX, Whitson RJ, Oro AE. "Patch"ing up uor tumor signaling knowledge. *J Invest Dermatol* 2013; 133: 1131-33.
54. The MT, Blaidon D, Chaplin T. Genomewide single nucleotide polymorphism microarray mapping in basal cell carcinomas unveils uniparental disomy as a key somatic event. *Cancer Res* 2005; 65: 8597-603.
55. McMahon AP, Ingham PW, Tabin CJ. Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. *Curr Top Dev Biol* 2003; 53: 1-114.
56. Sobjanek M, Zablotna M, Lesiak A et al. The -1154 G/A gene polymorphism is associated with the incidence of basal cell carcinoma in patients from northern Poland. *Arch Dermatol Res* 2014; 2014 Aug; 306 (6): 539-44.
57. Ziegler A, Leffell DJ, Kunala S, et al. Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 4216-20.
58. Reifenberger J, Wolter M, Knobbe CB, et al. Somatic mutations in the PTCH, SMOH, SUFUH and TP53 genes in sporadic basal cell carcinomas. *Br J Dermatol* 2005; 152: 43-51.
59. El-Bahrawy M, El-Masry N, Alison M, et al. Expression of beta-catenin in basal cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2003; 148 (5): 964-70.
60. Kwasniak LA, García-Zuazaga J. Basal cell carcinoma: evidence-based medicine and review of treatment modalities. *In J Dermatol* 2011; 50(6): 645-658.
61. Sekulic A, Migden MR, Oro AE, et al. Efficacy and safety of vismodegib in advanced basal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2012 Jun 7; 366 (23): 2171-9.
62. Tang JY, Mackay-Wiggan JM, Aszterbaum M, et al. An investigator-initiated, phase II randomized, double-blind, placebo-controlled trial of GDC-0049 for prevention of BCCs in basal cell nevus syndrome patients. *Proceedings of the 102th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research* 2011; abstract nr LB-1.
63. Ally MS, Aasi S, Wysong A, et al. An investigator-initiated open-label clinical trial of vismodegib as a neoadjuvant to surgery for high-risk basal cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 2014 Jun 11. pii: S0190-9622 (14) 01475-3.
64. Walker P, Hill D. Surgical treatment of basal cell carcinomas using standard postoperative histological assessment. *Australas J Dermatol* 2006; 47: 1-12.
65. Kimyai-Asadi A, Goldberg LH, Jih MH. Accuracy of serial transverse cross-sections in detecting residual basal cell carcinoma at the surgical margins of an elliptical excision specimen. *J Am Acad Dermatol* 2005; 53: 469-74.
66. Macfarlane L, Waters A, Evans A, et al. Seven years' experience of Mohs micrographic surgery in a UK centre, and development of a UK minimum dataset and audit standards. *Clin Exper Dermatol* 2013; 38 (3): 262-9.
67. Rowe DE, Carroll RJ, Day CL. Mohs surgery is the treatment of choice for recurrent (previously treated) basal cell carcinoma. *J Dermatol Surg Oncol* 1989; 15:424-31.
68. Essers BA, Dirksen CD, Nieman FH, et al. Cost-effectiveness of Mohs micrographic surgery vs surgical excision for basal cell carcinoma of the face. *Arch Dermatol* 2006; 142: 187-94.
69. Frederic E. Mohs. *Chemosurgery in Cancer, Gangrene and Infections*. Charles C Thomas Eds. Springfield,IL. USA. 1947.
70. Tromovitch TA, Stegman SJ. Microscopie-controlled excision of cutaneous tumors: chemosurgery, fresh tissue technique. *Cancer* 1978 Feb; 41 (2): 653-8.
71. Braun RP, Klumb F, Girard C, et al. Three-dimensional reconstruction of basal cell carcinomas. *Dermatol Surg* 2005; 31: 562-6.
72. Ziefle S, Schüle D, Breuninger H, et al. Confocal Laser Scanning Microscopy vs 3-Dimensional Histologic Imaging in Basal Cell Carcinoma. *Arch Dermatol* 2010 ;146 (8): 843-847
73. Schüle D, Breuninger H, Schippert W, et al. Confocal laser scanning microscopy in micrographic surgery (three-dimensional histology) of basal cell carcinomas. *Br J Dermatol* 2009; 161 (3): 698-700.
74. González SG, Gill M, Halpern AC (eds). *Reflectance confocal microscopy of cutaneous tumors*. London: Informa U.K. Ltd, 2008.

75. Patel YG, Nehal KS, Aranda I, et al. Confocal reflectance mosaicing of basal cell carcinomas in Mohs surgical skin excisions. *J Biomed Opt.* 2007 May-Jun; 12 (3): 034027.
76. Rajadhyaksha M, Menaker G, Flotte T, et al. Confocal examination of non-melanoma cancers in thick skin excisions to potentially guide Mohs micrographic surgery without frozen histopathology. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 1137-43.
77. Gareau DS, Li Y, Huang B, et al. J Confocal mosaicing microscopy in Mohs skin excisions: feasibility of rapid surgical pathology. *J Biomed Opt.* 2008 Sep-Oct; 13 (5): 054001.
78. Karen JK, Gareau DS, Dusza SW, et al. Detection of basal cell carcinomas in Mohs excisions with fluorescence confocal mosaicing microscopy. *Br J Dermatol* 2009; 160: 1242-50.
79. Chung VQ, Dwyer PJ, Nehal KS, et al. Use of ex vivo confocal scanning laser microscopy during Mohs surgery for nonmelanoma skin cancers. *Dermatol Surg* 2004; 30: 1470-8.
80. Gareau DS, Karen JK, Dusza SW, et al. Sensitivity and specificity for detecting basal cell carcinomas in Mohs excisions with confocal fluorescence mosaicing microscopy. *J Biomed Opt* 2009; 14 (3): 034012
81. Abeytunge S, Li Y, Larson B, et al. Rapid confocal imaging of large areas of excised tissue with strip mosaicing. *J Biomed Opt* 2011; 16 (5): 050504.
82. Larson B, Abeytunge S, Seltzer E, et al. Detection of skin cancer margins in Mohs excisions with high-speed strip mosaicing confocal microscopy: a feasibility study. *Br J Dermatol* 2013 Oct; 169 (4): 922-6.
83. Stern RS. Cost effectiveness of mohs micrographic surgery. *J Invest Dermatol.* 2013; 133 (5): 1129-31.
84. Gareau DS, Patel YG, Li Y, et al. Confocal mosaicing microscopy in skin excisions: a demonstration of rapid surgical pathology. *J Microsc* 2009; 233 (1): 149-159.
85. Rajadhyaksha M, Menaker M, Flotte G, et al. Rapid confocal examination of non-melanoma cancers in skin excisions to potentially guide Mohs micrographic surgery. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 1137-1143.
86. Gareau DS, Patel YG, Li Y, et al. Confocal mosaicing microscopy in skin excisions: a demonstration of rapid surgical pathology. *J Microsc* 2009; 233: 149-159.
87. Al-Arashi M, Salomatina E, Yaroslavsky AN. Multimodal confocal microscopy for diagnosis of nonmelanoma skin cancers. *Lasers Surg Med* 2007; 39: 696-705.
88. Nijssen A, Maquelin K, Santos LF, et al. Discriminating basal cell carcinoma from perilesional skin using high wave-number Raman spectroscopy. *J Biomed Opt* 2007; 12: 034004.
89. Yaroslavski AN, Salomatina EV, Neel V, et al. Fluorescence polarization of tetracycline derivatives as a technique for mapping nonmelanoma skin cancers. *J Biomed Opt* 2007; 12: 1-9.
90. Lin SJ, Jee SH, Kuo CJ, et al. Discrimination of basal cell carcinoma from normal dermal stoma by quantitative multiphoton imaging. *Opt Lett* 2006; 31: 2756-2758.
91. Olmedo JM, Warschaw KE, Schmitt JM, et al. Optical coherence tomography for the characterization of basal cell carcinoma in vivo: a pilot study. *J Am Acad Dermatol* 2006; 55: 408-412.
92. Abeytunge S, Li Y, Larson B, et al. Confocal microscopy with strip mosaicing for rapid imaging over large areas of excised tissue. *J Biomed Opt* 2013; 18 (6): 061227.
93. Gareau DS. The feasibility of digitally stained multimodal confocal mosaics to simulate histopathology. *J Biomed Opt* 2009; 14 (3): 034050.
94. Wade TR, Ackerman AB. The many faces of basal-cell carcinoma. *J Dermatol Surg Oncol.* 1978 Jan; 4 (1): 23-8.
95. Longo C, Rajadhyaksha M, Ragazzi M, et al. Evaluating ex vivo fluorescence confocal microscopy images of basal cell carcinomas in Mohs excised tissue. *Br J Dermatol* 2014; 17 (3): 561-70.
96. Longo C, Ragazzi M, Castegnetti F, et al. Inserting ex vivo fluorescence confocal microscopy perioperatively in Mohs micrographic surgery expedites bedside assessment of excision margins in recurrent basal cell carcinoma. *Dermatology* 2013; 227: 89-92.
97. Ziafle S, Schüle D, Breuninger H, et al. Confocal laser scanning microscopy vs 3-Dimensional histologic imaging in basal cell carcinoma. *Arch Dermatol* 2010; 146 (8): 843-47
98. Larson B, Abeytunge S, Seltzer E, et al. Detection of skin cancer margins in Mohs excisions with high-speed strip mosaicing confocal microscopy: a feasibility study. *Br J Dermatol* 2013; 169: 922-926.
99. Quan T, Xu Y, Qin Z, et al. Elevated YAP and its downstream targets CCN1 and CCN2 in basal cell carcinoma: impact on keratinocyte proliferation and stromal cell activation. *Am J Pathol.* 2014 Apr; 184 (4): 937-43.
100. Rowe DE, Carroll RJ, Day Jr. J CL. Long-term recurrence rates in previously untreated (primary) basal cell carcinoma: implications for patient follow-up. *Dermatol Surg Oncol* 1989; 15: 315--28.
101. Smeets NW, Krekels GA, Ostertag JU, et al. Surgical excision vs Mohs' micrographic surgery for basal-cell carcinoma of the face: randomised controlled trial. *Lancet* 2004; 364: 1766-72.

102. Toll A. The Implantation of Mohs Micrographic Surgery in Spain: a Work Still in Progress. *Actas Dermosifiliogr* 2012; 103 (9): 759-761.
103. Blázquez-Sánchez N, de Troya-Martín M, Frieyro-Elicegui M, et al. Cost analysis of Mohs micrographic surgery in high-risk facial basal cell carcinoma. *Actas Dermosifiliogr* 2010; 101: 622–8.
104. Tierney EP, Hanke CW. Cost effectiveness of Mohs micrographic surgery: review of the literature. *J Drugs Dermatol* 2009 Oct; 8 (10): 914-22.
105. Seidler AM, Bramlette TB, Washington CV, et al. Mohs versus traditional surgical excision for facial and auricular nonmelanoma skin cancer: an analysis of cost-effectiveness. *Dermatol Surg* 2009 Nov; 35 (11): 1776-87.
106. Otley CC. Cost-effectiveness of Mohs micrographic surgery vs surgical excision for basal cell carcinoma of the face. *Arch Dermatol* 2006 Sep; 142 (9): 1235-6.
107. Essers BA, Dirksen CD, Nieman FH, et al. Cost-effectiveness of Mohs Micrographic Surgery vs Surgical Excision for Basal Cell Carcinoma of the Face. *Arch Dermatol* 2006 Feb; 142 (2): 187-94.
108. Chren MM, Sahay AP, Bertenthal DS, et al. Quality-of-life outcomes of treatments for cutaneous basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma. *J Invest Dermatol* 2007 Jun; 127 (6): 1351-7.
109. Chren MM, Linos E, Torres JS, et al. Tumor recurrence 5 years after treatment of cutaneous basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma. *J Invest Dermatol* 2013 May; 133 (5): 1188-96.
110. Rogers HW, Armbrecht E, Coldiron BM, et al. Properly selected skin cancer treatments are very effective. *J Invest Dermatol* 2014 Apr; 134 (4): 1133-5.
111. Connolly SM, Baker DR, Coldiron BM, et al. AAD/ACMS/ASDSA/ASMS 2012 appropriate use criteria for Mohs micrographic surgery: a report of the American Academy of Dermatology, American College of Mohs Surgery, American Society for Dermatologic Surgery Association, and the American Society for Mohs Surgery. *J Am Acad Dermatol* 2012; 67 (4): 531-50.

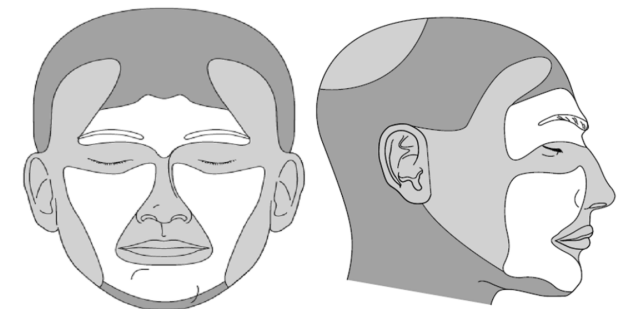
ANNEXOS

ANNEX I

INDICACIONS DE LA CIRURGIA MICROCONTROLADA DE MOHS

(adaptat de Connelly et al (111))

1. Localització d'alt risc de recidiva: zona "H" de la cara.
2. Diàmetre de la lesió:
 - a. > 10 mm a la cara
 - b. > 20 mm a la resta de la superfície corporal
3. Subtipus histològics agressius: morfeiforme, infiltrant, micronodular o basoescatós.
4. Invasió perineural o perivascular demostrada a l'estudi histològic previ (biòpsia).
5. Marges de la lesió clínicament i/o dermatoscòpicament mal delimitats
6. Carcinoma recidivant prèviament tractat mitjançant una altra tècnica.



● Zona H

ANNEX II

ASPECTES ÈTICS

Aquest estudi té com a única mostra biològica la manipulació de pell humana de les reseccions rutinàries de CMMS del Servei de Dermatologia de l'Hospital Clínic de Barcelona. Abans de l'estudi histopatològic peroperatori en congelat es procedirà a l'obtenció de les imatges de MCF i posteriorment les peces es remetran al departament d'Anatomia Patològica per al seu processat en congelat la seva inclusió en parafina seguint el circuit habitual. Les decisions terapèutiques no es veuran afectades pel resultat de l'estudi de MCF, sinó que es basaran en les seccions histològiques habituals.

No es realitzaran més proves complementàries invasives ni es realitzarà cap tipus d'experimentació amb animals.

La selecció dels pacients es realitzarà per part de l'investigador principal a partir de la història clínica del pacient. Tots els pacients seran degudament informats dels objectius de l'estudi, lliurant per escrit el Full Informatiu i obtenint el Consentiment Informat (veure ANNEX III) de tots els subjectes que entrin en l'estudi.

El teixit romanent així com les laminetes histològiques seran finalment emmagatzemades pel departament d'Anatomia Patològica de l'HCB seguint el seu circuit habitual.

Les dades clíniques dels subjectes a estudi seran recopilats en una base de dades en format Microsoft Access, a la qual només tindran accés els investigadors del projecte. No es divulgaran les dades personals dels subjectes participants en l'estudi, assignant-los un número codificat segons es vagin incorporant.

Els resultats d'aquest estudi, així com les conclusions seran utilitzades exclusivament amb finalitats científiques, assistencials i acadèmiques.

El projecte aquí referit va ser aprovat per la direcció del Comitè Ètic d'Investigacions Clíniques (CEIC) de l'Hospital Clínic Barcelona en presentar la candidatura als "Premis Emili Letang" el 2010 (número de registre 2010/5492).

ANNEX III

HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del proyecto: "Detección de carcinoma basocelular mediante microscopía confocal multimodal ex vivo en secciones de cirugía de Mohs. Correlación con los cortes convencionales en congelado y en parafina para su validación".

Cirugía Micrográfica de Mohs La cirugía micrográfica de Mohs (CMM) es un tratamiento quirúrgico altamente especializado para el cáncer cutáneo que proporciona el más elevado índice de curación comparado con las técnicas tradicionales. La técnica de la CMM se puede resumir en 3 pasos básicos:

1 - Extirpación del tejido tumoral.

En primer lugar se procede a anestesiarse la zona afectada de manera que el procedimiento no se inicia hasta conseguir una total insensibilidad de toda la zona. Una vez comprobada la anestesia el médico extirpa la capa de piel afectada por la tumoración.

2 - Preparación sofisticada de pequeñas porciones del tejido extirpado para su examen al microscopio y determinación de si el tumor ha sido eliminado o no en su totalidad. Se practica hemostasia para evitar el sangrado y se cura provisionalmente la herida a la espera del resultado del laboratorio. Durante el tiempo de espera del análisis microscópico el paciente puede estar acompañado, leer una revista o ver la televisión en un box de hospital. La duración aproximada de esta fase es de unos 30-45 minutos. Los cortes de las porciones se realizan en congelación en un criostato debidamente identificados para su posterior análisis al microscopio.

3 - Si se detecta alguna célula cancerosa se repite todo el procedimiento anterior, pero sólo en el área afectada, hasta conseguir la curación total. En condiciones normales el número medio de etapas es de una a tres (lo que suele requerir unas 2-4 horas hasta la curación completa), aunque depende mucho de cada tumor en particular, de su localización y de si ha sido o no tratado con anterioridad. Una vez se ha eliminado completamente el tumor, se decide la mejor solución para cerrar el defecto quirúrgico.

AGRAÏMENTS

Moltes són les persones a les quals hauria d'agrair en major o menor mesura que aquesta Tesi Doctoral hagi arribat a bon port, car ha estat una singladura de més de 4 anys. Algunes m'han acompanyat durant tota la travessa, i d'altres en algun moment puntual. Però amb totes hem compartit feina i riures.

Començaré cronològicament. Era un dissabte de Juliol de 1999. Jo dormia tranquil·lament al Port d'Andratx quan em va despertar sobre les 11am una telefonada. Era de Barcelona, de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona. Em comunicaven que el proper dilluns (en 2 dies) havia de presentar-me a l'Aula 2 del Claustre de la Facultat de Medicina del Campus Casanovas. Jo què sabia un dissabte calorós de Juliol de claustres, de campus, de l'Eixample i d'aules!!! Amb el sol de juliol esclafant-me la cara, vàrem partir amb mon pare i ma mare a una agència de viatges (si, si.... aquells establiments on abans de l'era internet i low cost els mallorquins exiliats havíem d'anar a comprar qual-sevol bitllet d'avió o vaixell per sortir o tornar de l'illa!!). Era la meva primera experiència viatjant completament sol. Idò bé, camina que caminaràs un bon dilluns del mes de Juliol me present allà on em digueren. Una vegada allà ens van rebre el que era aleshores Degà de la Facultat de Medicina (Dr. Bombí) i la Vice-degada, la Dra. Estrach. Moltes són les coses que he d'agrair a la Dra. Maria Teresa Estrach que ha estat Degana, Professora, adjunta i Cap de Servei meva i crec que en cada una d'aquestes èpoques m'ha ajudat d'una forma o d'una altra.

Tampoc res hauria arribat a bon port sense la feina en equip de tota la Unitat de Melanoma de l'HCBP i molt especialment als directors de la present Tesi els Drs. Josep Malvehy

i Susana Puig. Ells van crear i engrandir un projecte que ens ha permès a molts créixer tant en la vessant mèdica com en la de recerca. Sense aquesta base que tant esforç, treball, dedicació i passió que ha suposat per la seva part hauria estat impossible dur a terme aquest projecte.

Al meu mestre Dr. Antoni Vilalta un agraïment especial. A la medicina en general i la cirurgia en particular, encara que hi hagi una ingent quantitat de publicacions, llibres, articles, revisions, tractats, vídeos, congressos, cursos...no s'hauria de perdre la tradició del mestre. Un mestre és molt més que un professor. És trist, però avui dia s'està perdent de forma accelerada la manera de transmetre els coneixements a la medicina. S'està deshumanitzant el tracte al pacient però també el tracte entre companys, el respecte pels que porten anys d'experiència. Perquè només escoltant-los es poden aprendre aquelles coses que no estan escrites aquelles subtileses que ningú tret del teu mestre et pot transmetre i ensenyar. I és per això que em sento tan orgullós d'haver tingut un mestre quan, a més a més, el meu és el millor en cirurgia oncològica cutània. Totes les hores dins i fora del quiròfans em serviran (de fet, ja em serveixen) per a ser millor metge i millor persona.

A les meves amigues i companyes: Irene, Cristina, Paula, Susana. Gràcies pel vostre suport i la vostra amistat per sobre de tot.

A tota la resta de metges del Servei de Dermatologia presents i a aquells que ja no hi són, de tots i cadascun de vosaltres he après quelcom valuós i em sento orgullós de pertànyer a un Servei centenari amb tanta tradició i pel qual hi han passat tans personatges insignes.

A tots els residents actuals i passats; al personal d'infermeria, en especial na Lourdes, Marta, Conchita i Rosalia de totes elles també he après molt i són un suport imprescindible per la cirurgia que desenvolupam. I a totes les altres persones amb què he conviscut aquests 14 anys des que vaig arribar a Barcelona.

A tota la meva família, als meus cosins, al meu fillolet, al meus germans, pares i molt especialment a les meves padrines Maria i Catalina i als padrins Toni(s) que aconseguirem una fita molt més alta que qualsevol tesi doctoral: construir una família gran i ben avinguda, la millor terra per a recollir bons fruits.