

Artigo de revisão

Perspectivas no uso da microscopia confocal *in vivo* na prática do cirurgião dermatológico

In vivo confocal microscopy in the daily practice of the dermatologic surgeon

Autores:

Thais Helena Bello Di Giacomo¹
 Adriana Vanella D'Agostino Santiago¹
 Juliana Casagrande Tavoloni Braga¹
 Tatiana Cristina Moraes Pinto Blumetti¹
 Juliana Arêas de S. Lima Beltrame Ferreira¹
 Juliana Machado Canosa¹
 David Serra²
 Gisele Gargantini Rezze³

¹ Pós-graduanda em dermatologia do departamento de oncologia cutânea do Hospital A.C. Camargo – São Paulo (SP), Brasil.

² Médico assistente de dermatologia na Universidade de Coimbra – Porto, Portugal.

³ Coordenadora da pós-graduação em oncologia cutânea do Hospital A.C. Camargo – São Paulo (SP), Brasil.

Correspondência para:

Hospital A.C. Camargo
 Departamento de Oncologia Cutânea
 A/C. Thais Helena Bello Di Giacomo
 R. Professor Antônio Prudente, 211,
 Liberdade
 01509-010 - São Paulo - SP

Recebido em: 24/10/2011

Aprovado em: 22/11/2011

Trabalho realizado no Departamento de Oncologia Cutânea do Hospital A.C. Camargo – São Paulo (SP), Brasil.

Suporte Financeiro: A realização deste trabalho foi possível graças ao apoio da SBCD e da International Society of Dermatology, através da concessão de bolsa do Fellowship Program. Atualmente, o Grupo de Diagnóstico por Imagem da Pele do Departamento de Oncologia Cutânea do Hospital A.C. Camargo conta com o auxílio da Fapesp (Projeto 2010- 06455-1).

Conflito de Interesses: Nenhum

RESUMO

Novos métodos de imagem, como a tomografia óptica de coerência, a ressonância magnética e a ultrassonografia de alta frequência vem sendo desenvolvidos para uso na dermatologia. Entre estes novos métodos, destacamos a microscopia confocal de reflectância *in vivo* (MCR) como a que mais tem se difundido nos grandes centros de oncologia cutânea e que recentemente mais tem gerado publicações nos grandes periódicos, por permitir resolução semelhante à histológica. A microscopia confocal *in vivo* tem encontrado espaço nas muitas limitações que ainda se impõem ao diagnóstico dermatoscópico das neoplasias cutâneas, especialmente lesões acrômicas ou hipopigmentadas, lesões na face ou em mucosas. Ainda, alguns estudos tem sugerido grande utilidade na avaliação de margens cirúrgicas e na determinação do melhor local para a realização de biópsias excisionais. Este trabalho pretende descrever brevemente o funcionamento do microscópio confocal de reflectância a laser e discutir algumas perspectivas que despontam para seu uso na prática cotidiana do cirurgião dermatológico.

Palavras-chave: microscopia confocal; detecção precoce de câncer; neoplasias cutâneas.

ABSTRACT

New imaging methods, such as optical coherence tomography, magnetic resonance and high frequency ultrasonography, have been developed for use in dermatology. Among the new methods, in vivo reflectance confocal microscopy, has presented the fastest growth in large cutaneous oncology centers and has generated the greatest number of articles in the literature recently, due to its resolution – similar to histological resolution. In vivo confocal microscopy has been particularly useful given the many limitations of the dermoscopic diagnosis of cutaneous neoplasias, especially of achromic or hypopigmented lesions, lesions in the face or in mucous membranes. Some studies have also suggested considerable utility in the assessment of surgical margins and in determining the best area of the body for carrying out excisional biopsies. This study briefly describes how the confocal laser reflectance microscope works and discusses some of the issues that arise in its use in the daily practice of dermatologic surgeons.

Keywords: microscopy, confocal; early detection of cancer; skin neoplasms.

INTRODUÇÃO

Melhoras significativas na qualidade de imagens e em sua aplicabilidade clínica permitem hoje ao cirurgião dermatológico vislumbrar promissor horizonte no que diz respeito às técnicas não invasivas para diagnóstico e screening dos tumores cutâneos.¹

Grandes avanços já foram obtidos com o largo uso da dermatoscopia, que dos estudos ganhou os consultórios dermatológicos e tornou-se ferramenta indispensável na avaliação de lesões pigmentadas. Sabe-se que o uso do dermatoscópio aumentou significativamente a sensibilidade do exame clínico para o diagnóstico precoce do melanoma, aumentando a acurácia do diagnóstico em até 20%^{2,3} em relação ao exame a olho nu.

As lesões melanocíticas, todavia, permanecem um desafio diagnóstico. Frente à possibilidade de melanoma, os ideais 100% de sensibilidade devem ser sempre almejados. A fim de evitar procedimentos, biópsias e principalmente cirurgias desnecessárias, a especificidade dos métodos diagnósticos tampouco pode ser baixa.^{4,5}

Com a finalidade de melhorar a acurácia diagnóstica, práticas como a dermatoscopia digital e o mapeamento corporal total têm sido utilizadas. Essas técnicas permitem a análise evolutiva de lesões suspeitas ou de todo o tegumento de pacientes de alto risco, possibilitando que o diagnóstico precoce de melanoma seja feito com base em análise pontual, comparativa, da mesma região em momentos distintos.⁴

Novos métodos de imagem, como a tomografia óptica de coerência, a ressonância magnética e a ultrassonografia de alta frequência, vêm sendo desenvolvidos para uso na dermatologia, ainda no âmbito das pesquisas.^{3,5} Dentre esses novos métodos, destaca-se a microscopia confocal de reflectância *in vivo* (MCR) como a que mais se tem difundido nos grandes centros de oncologia cutânea e que recentemente mais tem gerado publicações nos grandes periódicos, por permitir resolução semelhante à histológica.⁵⁻⁹ No Brasil, cunhou-se apenas a ampla expressão microscopia confocal que, vale ressaltar, pode referir-se a outros métodos, com finalidades distintas daquela descrita neste texto, e que na literatura em inglês é denominada *In Vivo Reflectance Confocal Microscopy* (RCM).

A microscopia confocal *in vivo* tem encontrado espaço nas muitas limitações que ainda se impõem ao diagnóstico dermatoscópico das neoplasias cutâneas, especialmente lesões acrômicas ou hipopigmentadas. Alguns estudos têm sugerido ainda grande utilidade na avaliação de margens cirúrgicas e na determinação do melhor local para a realização de biópsias excisionais, concretamente nas lesões extensas faciais.^{1,9}

A seguir, descrevemos brevemente o funcionamento do microscópio confocal de reflectância a laser e discutimos as perspectivas que despontam para seu uso na prática cotidiana do cirurgião dermatológico.

A microscopia confocal *in vivo*

Desde sua descrição, em 1995, por Rajadhyaksha, a técnica de microscopia confocal reflectante a laser e suas aplicações na dermatologia têm sido amplamente estudadas. Através desse

método, tecidos não processados são opticamente seccionados e visualizados com resolução e contraste suficientes para permitir o exame *in vivo* de lesões cutâneas em nível celular, com imagens próximas da histologia de cortes transversais.⁶

A fonte de luz é laser de 830nm e 35mW de potência, que ilumina zona restrita, sem provocar qualquer dano tecidual. Conjugado num mesmo plano óptico, um diafragma com detector recebe apenas os fótons refletidos por aquela porção de tecido em foco. Quanto menor esse diafragma, maior a resolução e menor a espessura do “corte” obtido.¹⁰

A formação das imagens baseia-se nas diferenças na reflexão da luz proporcionadas pelos diversos componentes da pele, como consequência de distintos tamanhos de estrutura e índices de refração (teoria de Mie). São considerados contrastes naturais a melanina, a queratina e o colágeno, pois refletem mais a luz incidente e aparecem como estruturas brilhantes ao exame.¹¹

O microscópio comercialmente disponível é o Vivascope, da Lucid Inc. O exame se inicia com a fixação de um anel metálico à pele do paciente e uma imagem dermatoscópica da lesão é tomada com câmera dermatoscópica já conectada ao aparelho (VivaCam) (Figura 1). O braço rígido (Vivascope 1500) permite que o microscópio seja acoplado a esse anel de maneira precisa, seguindo orientação igual à da foto dermatoscópica, que assim pode ser utilizada como mapa de navegação, guiando a tomada de imagens pelo microscópio nos locais de maior interesse. Esse sistema de fixação é o que garante a imobilização da pele e a estabilidade da imagem (Figuras 2 e 3).

Imagens horizontais são registradas nos diversos planos no tegumento. Para melhor caracterização e documentação, é recomendado estudo com imagens seriadas de toda a lesão no nível da camada córnea, da epiderme, da junção dermoepidérmica e da derme papilar. Este estudo fornece informações relevantes sobre a arquitetura da lesão e evidencia locais em que um exame mais minucioso deve ser realizado.



Figura 1 - Um anel metálico é fixado sobre a pele do paciente e a câmera dermatoscópica do aparelho (VivaCam) é acoplada, para a tomada de imagem dermatoscópica inicial.

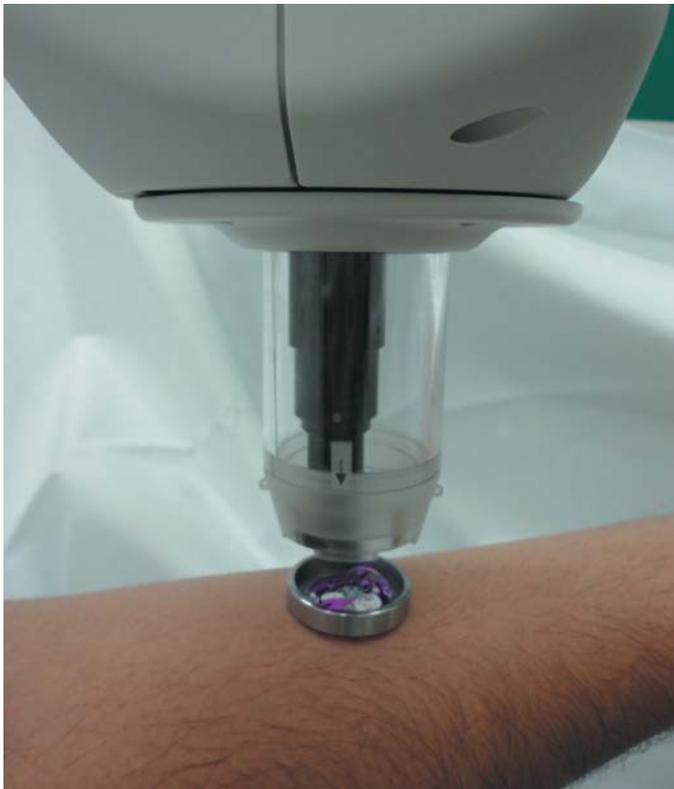


Figura 2 - Após a aplicação de gel específico, o microscópio é acoplado ao anel metálico por meio de um ímã, seguindo a mesma orientação da imagem dermatoscópica.



Figura 3 - O aparelho permite a aquisição de imagens histológicas *in vivo* e navegação precisa e estável por toda a lesão, de maneira não invasiva.

Para cada plano, são adquiridas imagens adjacentes de 500 x 500µm, formando mosaicos de até 8 x 8mm, representativos de toda a extensão da lesão a ser estudada. Os mosaicos obtidos permitem que se tenha um panorama da lesão e que locais com maior desorganização arquitetural sejam detectados. Nesses locais, a navegação vertical permite aprofundar ou superficializar os cortes ópticos, tornando mais provável o encontro de padrões ou estruturas diagnósticas.

No exame de uma lesão melanocítica suspeita à dermatoscopia, pode-se aprofundar o estudo em zona com estrias radiadas, ou pseudópodes, por exemplo, e registrar os ninhos de melanócitos atípicos.¹²

Em comparação ao exame histopatológico convencional, a microscopia confocal *in vivo* apresenta algumas vantagens. Pelo fato de ser realizada em tempo real, a presença do paciente no momento do exame pode ser de grande valia. Além de dados da anamnese e do exame dermatológico, que muitas vezes são suprimidos dos pedidos de anatomopatológico, tem-se à disposição toda a lesão – e toda a pele – para estudo imediato, não apenas o fragmento de tecido extirpado. Não é necessário o processamento ou a coloração dos tecidos ou a presença de técnicos e montagem de lâminas, e a não agressão ao tecido estudado permite que a evolução histológica do processo seja observada, se assim se desejar. A captação de imagens em tempo real permite também avaliação dinâmica dos processos examinados, sendo possível a observação, por exemplo, de fenômenos micro-

vasculares na derme papilar, como o fluxo leucocitário e o *rolling* de leucócitos aderidos ao endotélio vascular.

A qualidade das imagens e a carência de estudos ainda são, porém, fatores limitantes ao largo uso da microscopia confocal para a tomada de decisões. Dessa maneira, o exame anatomopatológico permanece indiscutivelmente como *gold standard* para o diagnóstico definitivo das lesões cutâneas.

Aplicações da microscopia confocal no cotidiano do cirurgião dermatológico

Muitas são as possibilidades de utilização da microscopia confocal na prática diária do cirurgião dermatológico, e, à medida que o estudo do método se aprofunda, novas aplicações são vislumbradas.

DIAGNÓSTICO NÃO INVASIVO

O diagnóstico não invasivo é a função primeira da microscopia confocal *in vivo*. Características específicas e não específicas da microscopia confocal já foram descritas para diversos processos cutâneos, tumorais e inflamatórios. Critérios diagnósticos bem definidos são aceitos para muitos tumores cutâneos, como carcinoma basocelular,¹³⁻¹⁵ dermatofibroma,¹⁶ nevos, lentigo maligno e melanoma.¹⁷⁻²⁵ Aspectos observados à MCR para outros tumores e lesões, como angioma,²⁶ queratose seborreica,²⁷ queratose actínica, carcinoma espinocelular,^{28,29} queratose liquefocitária,³⁰ acantoma de células claras,³¹ tricoepitelioma,³² porokeratose,³³ hiperplasia sebácea³⁴ e micose fungoide³⁵ também foram

descritos. A maior parte dos grupos de estudos de MCR, contudo, concentra seus esforços para o diagnóstico diferencial das lesões melanocíticas. A avaliação desse tipo de lesão é favorecida pelo forte contraste proporcionado pela melanina na MCR, que facilita a observação dos melanócitos.⁶

As limitações da dermatoscopia no reconhecimento de alguns tipos de melanoma denominados *featureless* (sem estruturas) são conhecidas, e diversos algoritmos foram desenvolvidos e revisados na tentativa de diminuir os falso-negativos.^{1,36,37} Apesar de não apresentar pigmento visível, os melanossomas são refráteis na microscopia confocal, fazendo desse método valiosa ferramenta, complementar ao exame clínico e dermatoscópico das lesões acrômicas ou hipopigmentadas.

Em muitos desses casos, a MCR tem-se mostrado adjuvante valioso ao diagnóstico não invasivo. Nos casos clínica e dermatoscopicamente equívocos, a MCR contribui incrementando a suspeita de que se trata de lesão maligna, como, por exemplo, no caso de melanoma *in situ* que apresente padrão atípico à dermatoscopia, porém ainda sem critérios diagnósticos de melanoma (aumento da sensibilidade).³⁷ Naqueles casos de lesão clínica e dermatoscopicamente sugestiva de benignidade, a MCR pode aumentar a certeza de que se trata de lesão benigna, como no caso de nevo composto, queratose liquenoide ou angioma trombosado (aumento da especificidade).³⁸ Nas lesões incharacterísticas, com tamanho muito reduzido ou com padrão “sem estruturas”, a MCR pode fornecer informações complementares e relevantes para o diagnóstico, impactando a abordagem cirúrgica.⁹ A abordagem de lesões na face e em mucosas, locais em que a dermatoscopia é desafiadora, também se beneficia com esse método.³⁹ Dessa maneira, muitas biópsias diagnósticas desnecessárias podem ser evitadas, e abordagem terapêutica já mais assertiva pode ser instituída desde o início, nos casos pertinentes.

Realizou-se análise multivariada de todos os parâmetros visualizados pela microscopia confocal, e, com base naqueles que se mostraram estatisticamente significativos na diferenciação de nevus e melanomas,⁴⁰ foram estabelecidos algoritmos diagnósticos. Na série de Barcelona,²¹ encontram-se dois critérios protetores ou negativos de melanoma (papilas dérmicas bem delimitadas por células refrateis ou *edged papillae*, e células típicas na camada basal), e dois critérios positivos para melanoma (células pagetoides redondas intraepidérmicas e células atípicas dentro das papilas dérmicas). Estabelecendo ponto de corte em -2 benignidades, e a partir de -1, 0, 1, 2 - maligno, obtém-se sensibilidade de 100% (se detectam todos os melanomas) com especificidade de 57% (reduzindo 57% das extirpações de lesões clínica e dermatoscopicamente duvidosas).

O algoritmo do grupo de Módena avalia parâmetros equivalentes na derme e epiderme, mas estabelece critérios maiores e menores; ao examinar série de 351 lesões, Pellacani e colaboradores alcançam menor sensibilidade com maior especificidade.

SEGUIMENTO PÓS-OPERATÓRIO

Da possibilidade de realizar o diagnóstico primário das neoplasias cutâneas, a detecção de eventuais recorrências locais após excisões cirúrgicas é uma consequência.

O benefício dessa aplicação da MCR é evidente em muitas situações, em especial nos casos de tumores recidivantes, como o Paget extramamário.⁴¹

No caso dos carcinomas basocelulares excisados com margem lateral comprometida, por exemplo, o acompanhamento com MCR traz mais segurança ao cirurgião e ao paciente para se optar pela conduta expectante e permite a detecção precoce de recidiva, que é esperada em cerca de 27% dos casos de ressecção incompleta, estando livres as margens profundas.⁴²

RESPOSTA A TERAPÊUTICAS CONSERVADORAS E CONTROLE DE TRATAMENTO

As modalidades terapêuticas não invasivas foram muito bem recebidas pelos cirurgiões dermatológicos, que hoje as empregam largamente para diversas neoplasias, seja na realização da terapia fotodinâmica, na utilização do imiquimod ou fluouracil tópico, ou mesmo da fototerapia. Essas modalidades de tratamento poupam o paciente de procedimentos invasivos, consideravelmente dolorosos, por vezes não factíveis pela extensão e localização das lesões, e de cicatrizes inestéticas.

Antes da MCR, no entanto, o sucesso terapêutico dessas intervenções só poderia ser comprovado por exame anatomopatológico, realizado através de biópsia de pele.

Recentemente, estudo com 72 pacientes com carcinomas basocelulares histologicamente comprovados, submetidos à cirurgia micrográfica de Mohs e imiquimod tópico adjuvante e seguidos com MCR, mostrou concordância com a histopatologia e maior valor preditivo positivo do que o exame clínico isolado para o controle de tratamento.⁴²

Para o controle de tratamento de lentigo maligno e queratoses actínicas com imiquimod a 5%, a MCR também parece ser ferramenta de grande utilidade.⁴³⁻⁴⁵

ZONAS ACTÍNICAS CANCERIZÁVEIS

Para a avaliação de zonas actínicas cancerizáveis, a microscopia confocal vem preencher importante lacuna na prática diária do cirurgião dermatológico. A pele idosa, com muitos sinais de dano actínico, cicatrizes de procedimentos prévios ou poiquilodermia é de difícil manejo, e identificar neoplasias incipientes nesse tipo de pele, com zonas denominadas cancerizáveis constitui desafio. Ainda que se valendo da dermatoscopia, a distinção entre queratose actínica, carcinoma espinocelular invasivo, doença de Bowen, carcinoma basocelular, queratose liquenoide e dermatite seborreica, nessas áreas, pode muitas vezes recair apenas na histopatologia.

A utilidade da MCR para avaliação desse tipo de pele tem sido ressaltada em estudos recentes, principalmente na atualidade, com o incremento de opções terapêuticas não invasivas e preventivas em áreas com intenso dano solar.⁴⁴

MAPEAMENTO DE MARGENS CIRÚRGICAS *IN VIVO*

Não raro, a determinação precisa das fronteiras entre a pele normal e o tecido tumoral pode ser de impossível estabelecimento clínico. Lesões do tipo lentigo maligno e lentigo malig-

no melanoma, carcinoma basocelular não pigmentado ou esclerosante, melanoma amelanótico, entre outros, podem apresentar bordos mal definidos ou mesmo confundir-se com a pele adjacente, actinicamente lesada. Ainda, em alguns casos de neoplasias cutâneas previamente operadas e recidivadas, a presença da cicatriz e o crescimento irregular do tumor também dificultam a avaliação precisa dos limites da lesão.

Nesses casos, a MCR parece ter grande valor para o planejamento cirúrgico, como sugere estudo no qual a MCR mostrou acurácia superior à do exame com a lâmpada de Wood e à da dermatoscopia, e comparável aos resultados de histopatologia para melhor delineamento de margens de LMM.^{46,47}

Os pontos para a realização do exame devem ser selecionados com base no exame clínico, dermatoscópico ou também com o auxílio da lâmpada de Wood. A delimitação mais precisa das margens pode ser feita com biópsias por punch, guiadas pela MCR, com a vantagem de estas últimas serem feitas em pontos pré-selecionados e em menor quantidade, e confirmáveis por imuno-histoquímica.^{47,48}

Recentemente foi relatado o uso da MCR para avaliação de margens cirúrgicas em doença de Paget extramamária.⁴¹

O exame intraoperatório de margens em shavings foi descrito no ano passado por grupo de Nova York que empregou o cloreto de alumínio a 35%, tal como utilizado com a finalidade de hemostasia, para realçar o contraste das estruturas in vivo.⁴⁹

A MCR também tem sido apontada como mais uma ferramenta útil ao cirurgião de Mohs, tanto in vivo, como ex vivo.⁵⁰⁻⁵²

SELEÇÃO DO MELHOR LOCAL PARA BIÓPSIA

A representatividade das biópsias incisionais é preocupação pertinente na prática cotidiana do cirurgião dermatológico. Para que se tenha diagnóstico acurado e definitivo, além de adequado processamento do tecido e da correta interpretação do patologista, é essencial que o material enviado para análise seja representativo do processo em questão.⁹

Em se tratando de lesões extensas e com possíveis focos isolados de alterações que de fato permitam o diagnóstico, o questionamento sobre o melhor ponto a ser biopsiado é imprescindível.

Os casos em que a extensão ou localização da lesão tumoral inviabilizam a realização de biópsia excisional como abordagem inicial constituem também desafio à realização de biópsia incisional. Máculas hipercrômicas isoladas na face de idosos, por exemplo, comportam os diagnósticos de lentigo solar, lentigo maligno ou mesmo lentigo maligno melanoma. Uma lesão de lentigo maligno melanoma pode apresentar características histológicas dessas três entidades, em pontos distintos. A dermatoscopia da face, pela retificação dos cones epiteliais e poiquilodermia própria do dano actínico pode mostrar-se difícil, e nesses casos a MCR pode ser muito útil para auxiliar na escolha do melhor local para biópsia.⁴⁴

Após a confirmação do diagnóstico, a MCR ainda pode ser utilizada para seguimento e controle de tratamento, caso a opção seja uma modalidade terapêutica não invasiva.^{44,45}

Lesões de micose fungoide também podem constituir desafio, e muitas biópsias podem ser necessárias antes que o diagnóstico possa ser confirmado. Através da MCR, podemos encontrar e biopsiar focos de alterações epidérmicas mais significativas, com eventuais microabscessos de Pautrier, incrementando muito a probabilidade de conseguir exame anatomopatológico conclusivo.³⁵

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A microscopia confocal in vivo desponta hoje como ferramenta promissora e versátil para auxiliar o cirurgião dermatológico no diagnóstico e abordagem dos tumores cutâneos. Em comparação com a dermatoscopia, aumentou comprovadamente a sensibilidade e especificidade no diagnóstico das lesões melanocíticas clínica e dermatoscopicamente duvidosas, e tem sido estudada em inúmeras outras aplicações. É relevante frisar, no entanto, que a histopatologia tradicional permanece gold standard para o diagnóstico definitivo das lesões cutâneas.

O método apresenta ainda muitas limitações, que vêm sendo reduzidas ao passo que cada vez mais estudos são realizados, e o aparelho, melhorado. Em 2007, foi organizado consenso para uniformizar os conceitos, e, em 2009, um estudo via internet com seis centros de referência para avaliar a reprodutibilidade dessa terminologia.^{53,54}

O exame de lesão única leva de cinco a 15 minutos. A clínica e a dermatoscopia são essenciais para triar o que deve ser examinado pela MCR, e lesões com poucas alterações nessas análises iniciais têm maior probabilidade de apresentar menos achados característicos na MCR.⁴⁰

Outra importante limitação, a ser transposta com a melhoria técnica num futuro próximo, é a visualização da derme, uma vez que a reflexão da luz só permite visualização até a profundidade de 350µm, ou seja, derme papilar ou reticular superficial.

No entanto, enquanto a dermatoscopia provavelmente já alcançou o potencial de acurácia diagnóstica inerente ao método, espera-se da MCR grandes avanços nos próximos anos.¹ Assim como a dermatoscopia, esperamos que ganhe a prática do dermatologista como método auxiliar no diagnóstico e tratamento das neoplasias cutâneas.

AGRADECIMENTOS

Aos Drs. Cristina Carrera, Susana Puig e Josep Malvehy, da Unitat de Melanoma – Hospital Clínic de Barcelona, pelos valiosos comentários e pela acolhida em seu serviço, em que foi realizado este trabalho. Ao Dr. Luiz Guilherme Martins Castro pelo compartilhamento de sua expertise na revisão do texto, e ao Dr. Joaquim Xavier de Sousa Junior pelo auxílio com a consulta bibliográfica. ●

REFERÊNCIAS

- Hofmann-Wellenhof R, Wurm EM, Ahlgrim-Siess V, Richtig E, Koller S, Smolle J, et al. Reflectance confocal microscopy--state-of-art and research overview. *Semin Cutan Med Surg.* 2009;28(3):172-9.
- Vestergaard ME, Macaskill P, Holt PE, Menzies SW. Dermoscopy compared with naked eye examination for the diagnosis of primary melanoma: a meta-analysis of studies performed in a clinical setting. *Br J Dermatol.* 2008;159(3):669-76.
- Marghoob AA, Swindle LD, Sanchez Negron FA, Slue B, Halpern AC, Kopf AW. "Instruments and New Technologies for the In Vivo Diagnosis of Melanoma". *J Am Acad Dermatol.* 2003;49(5):777-97.
- Menzies SW. On reducing the need to excise nevi. *Arch Dermatol.* 2011;147(1):105-6.
- Rigel DS, Russak J, Friedman R. The evolution of melanoma diagnosis: 25 years beyond the ABCDs. *CA Cancer J Clin.* 2010;60(5):301-16.
- Rajadhyaksha M, Grossman M, Esterowitz D, Webb RH, Anderson RR. In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin: melanin provides strong contrast. *J Invest Dermatol.* 1995;104(6):946-52.
- González S. Confocal reflectance microscopy in dermatology: promise and reality of non-invasive diagnosis and monitoring. *Actas Dermosifiliogr.* 2009;100 (Suppl 2): 59-69.
- Astner S, Ulrich M. Confocal laser scanning microscopy. *Hautarzt.* 2010;61(5):421-8.
- Gonzalez S, Gill M, Halpern AC. Reflectance Confocal Microscopy of Cutaneous Tumours: An Atlas with Clinical, Dermoscopic and Histological Correlations. USA: Informa Healthcare, 2008.
- Malvey J, Puig S. Principios de Dermatoscopia. In: Principios de Dermatoscopia. Barcelona: CEGE, 2002. p. 472.
- Rajadhyaksha M, Gonzalez S, Zavislan JM. Detectability of contrast agents for confocal reflectance imaging of skin and microcirculation. *J Biomed Opt.* 2004;9(2):323-31.
- Scope A, Gill M, Benvenuto-Andrade C, Halpern AC, Gonzalez S, Marghoob AA. Correlation of dermoscopy with in vivo reflectance confocal microscopy of streaks in melanocytic lesions. *Arch Dermatol.* 2007;143(6):727-34.
- González S, Tannous Z. Real-time, in vivo confocal reflectance microscopy of basal cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol.* 2002;47(6):869-74.
- Ulrich M, Roewert-Huber J, González S, Rius-Diaz F, Stockfleth E, Kanitakis J. Peritumoral clefting in basal cell carcinoma: correlation of in vivo reflectance confocal microscopy and routine histology. *J Cutan Pathol.* 2011;38(2):190-5.
- Segura S, Puig S, Carrera C, Palou J, Malvey J. Dendritic cells in pigmented basal cell carcinoma: a relevant finding by reflectance-mode confocal microscopy. *Arch Dermatol.* 2007;143(7):883-6.
- Scope A, Ardigo M, Marghoob AA. Correlation of dermoscopic globule-like structures of dermatofibroma using reflectance confocal microscopy. *Dermatology.* 2008;216(1):81-2.
- Scope A, Benvenuto-Andrade C, Agero AL, Malvey J, Puig S, Rajadhyaksha M, et al. In vivo reflectance confocal microscopy imaging of melanocytic skin lesions: consensus terminology glossary and illustrative images. *J Am Acad Dermatol.* 2007;57(4):644-658.
- Casari A, Pellacani G, Seidenari S, Cesinaro AM, Beretti F, Pepe P, et al. Pigmented nodular Basal cell carcinomas in differential diagnosis with nodular melanomas: confocal microscopy as a reliable tool for in vivo histologic diagnosis. *J Skin Cancer.* 2011;2011:406859.
- Tannous ZS, Mihm MC, Flotte TJ, González S. In vivo examination of lentigo maligna and malignant melanoma *in situ*, lentigo maligna type by near-infrared reflectance confocal microscopy: comparison of in vivo confocal images with histologic sections. *J Am Acad Dermatol.* 2002;46(2):260-3.
- Guitera P, Pellacani G, Crotty KA, Scolyer RA, Li LX, Bassoli S, et al. The impact of in vivo reflectance confocal microscopy on the diagnostic accuracy of lentigo maligna and equivocal pigmented and nonpigmented macules of the face. *J Invest Dermatol.* 2010;130(8):2080-91.
- Segura S, Puig S, Carrera C, Palou J, Malvey J. Development of a two-step method for the diagnosis of melanoma by reflectance confocal microscopy. *J Am Acad Dermatol.* 2009;61(2):216-29.
- Segura S, Pellacani G, Puig S, Longo C, Bassoli S, Guitera P, et al. In vivo microscopic features of nodular melanomas: dermoscopy, confocal microscopy, and histopathologic correlates. *Arch Dermatol.* 2008;144(1):1311-20. Erratum in: *Arch Dermatol.* 2009;145(5):556.
- Nobre Moura F, Dalle S, Depaepae L, Durupt F, Balme B, Thomas L. Melanoma: early diagnosis using in vivo reflectance confocal microscopy. *Clin Exp Dermatol.* 2011;36(2):209-11.
- Pellacani G, Scope A, Ferrari B, Pupelli G, Bassoli S, Longo C, et al. New insights into nevogenesis: in vivo characterization and follow-up of melanocytic nevi by reflectance confocal microscopy. *J Am Acad Dermatol.* 2009;61(6):1001-13.
- Pellacani G, Longo C, Malvey J, Puig S, Carrera C, Segura S, et al. In vivo confocal microscopic and histopathologic correlations of dermoscopic features in 202 melanocytic lesions. *Arch Dermatol.* 2008;144(12):1597-1608.
- Aghassi D, Anderson RR, González S. Time-sequence histologic imaging of laser-treated cherry angiomas with in vivo confocal microscopy. *J Am Acad Dermatol.* 2000;43(1 Pt 1):37-41.
- Ahlgrim-Siess V, Cao T, Oliviero M, Hofmann-Wellenhof R, Rabinovitz HS, Scope A. The vasculature of nonmelanocytic skin tumors in reflectance confocal microscopy, II: Vascular features of seborrheic keratosis. *Arch Dermatol.* 2010;146(6):694-5.
- Rishpon A, Kim N, Scope A, Porges L, Oliviero MC, Braun R, et al. Reflectance confocal microscopy criteria for squamous cell carcinomas and actinic keratoses. *Arch Dermatol.* 2009;145(7):766-72.
- Ulrich M, Maltusch A, Rius-Diaz F, Röwert-Huber J, González S, Sterry W, et al. Clinical applicability of in vivo reflectance confocal microscopy for the diagnosis of actinic keratoses. *Dermatol Surg.* 2008;34(5):610-19.
- Bassoli S, Rabinovitz HS, Pellacani G, Porges L, Oliviero MC, Braun RP, et al. Reflectance confocal microscopy criteria of lichen planus-like keratosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2011 May 24. [Epub ahead of print].
- Ardigo M, Buffon RB, Scope A, Cota C, Buccini P, Berardesca E, et al. Comparing in vivo reflectance confocal microscopy, dermoscopy, and histology of clear-cell acanthoma. *Dermatol Surg.* 2009;35(6):952-9.
- Trico-Ardigo M, Zieff J, Scope A, Gill M, Spencer P, Deng L, Marghoob AA. Dermoscopic and reflectance confocal microscope findings of trichoeptelioma. *Dermatology.* 2007;215(4):354-8.
- Ulrich M, Forschner T, Röwert-Huber J, González S, Stockfleth E, Sterry W, et al. Differentiation between actinic keratoses and disseminated superficial actinic porokeratoses with reflectance confocal microscopy. *Br J Dermatol.* 2007;156 (Suppl 3):47-52.
- Propperova I, Langley RG. Reflectance-mode confocal microscopy for the diagnosis of sebaceous hyperplasia in vivo. *Arch Dermatol.* 2007;143(1):134.
- Agero AL, Gill M, Ardigo M, Myskowski P, Halpern AC, González S. In vivo reflectance confocal microscopy of mycosis fungoides: A preliminary study. *J Am Acad Dermatol.* 2007;57(3):435-41.
- Skvara H, Teban L, Fiebiger M, Binder M, Kittler H. Limitations of dermoscopy in the recognition of melanoma. *Arch Dermatol.* 2005;141(2):155-60.
- Lucas CR, Sanders LL, Murray JC, Myers SA, Hall RP, Grichnik JM. Early melanoma detection: nonuniform dermoscopic features and growth. *J Am Acad Dermatol.* 2003;48(5):663-71.
- Pellacani G, Cesinaro AM, Seidenari S. Reflectance-mode confocal

- microscopy of pigmented skin lesions--improvement in melanoma diagnostic specificity. *J Am Acad Dermatol.* 2005;53(6):979-85.
39. Guitera P, Pellacani G, Crotty KA, Scolyer RA, Li LX, Bassoli S, et al. The impact of in vivo reflectance confocal microscopy on the diagnostic accuracy of lentigo maligna and equivocal pigmented and nonpigmented macules of the face. *J Invest Dermatol.* 2010;130(8):2080-91.
 40. Pellacani G, Guitera P, Longo C, Avramidis M, Seidenari S, Menzies S. The impact of in vivo reflectance confocal microscopy for the diagnostic accuracy of melanoma and equivocal melanocytic lesions. *J Invest Dermatol.* 2007;127(12):2759-65.
 41. Pan ZY, Liang J, Zhang QA, Lin JR, Zheng ZZ. In vivo reflectance confocal microscopy of extramammary Paget disease: Diagnostic evaluation and surgical management. *J Am Acad Dermatol.* 2011 May 25. [Epub ahead of print].
 42. Torres A, Niemeyer A, Berkes B, Marra D, Schanbacher C, González S, Owens M, Morgan B. 5% imiquimod cream and reflectance-mode confocal microscopy as adjunct modalities to Mohs micrographic surgery for treatment of basal cell carcinoma. *Dermatol Surg.* 2004;30(12 Pt 1):1462-9.
 43. Nadiminti H, Scope A, Marghoob AA, Busam K, Nehal KS. Use of reflectance confocal microscopy to monitor response of lentigo maligna to nonsurgical treatment. *Dermatol Surg.* 2010;36(2):177-84.
 44. Ulrich M, Krueger-Corcoran D, Roewert-Huber J, Sterry W, Stockfleth E, Astner S. Reflectance confocal microscopy for noninvasive monitoring of therapy and detection of subclinical actinic keratoses. *Dermatology.* 2010;220(1):15-24.
 45. Curiel-Lewandrowski C, Williams C, Swindells K, Tahan S, Astner S, Frankenthaler R, et al. Use of in vivo confocal microscopy in malignant melanoma: an aid in diagnosis and assessment of surgical and nonsurgical therapeutic approaches. *Arch Dermatol* 2004;140(9):1127-32.
 46. Paraskevas LR, Halpern AC, Marghoob AA. Utility of the Wood's light: five cases from a pigmented lesion clinic. *Br J Dermatol.* 2005;152(5):1039-44.
 47. Chen CS, Elias M, Busam K, Rajadhyaksha M, Marghoob AA. Multimodal in vivo optical imaging, including confocal microscopy, facilitates pre-surgical margin mapping for clinically complex lentigo maligna melanoma. *Br J Dermatol.* 2005;153(5):1031-6.
 48. Busam KJ, Hester K, Charles C, Sachs DL, Antonescu CR, Gonzalez S, et al. Detection of clinically amelanotic malignant melanoma and assessment of its margins by in vivo confocal scanning laser microscopy. *Arch Dermatol* 2001;137(7):923-9.
 49. Scope A, Mahmood U, Gareau DS, Kenkre M, Lieb JA, Nehal KS, et al. In vivo reflectance confocal microscopy of shave biopsy wounds: feasibility of intraoperative mapping of cancer margins. *Br J Dermatol.* 2010;163(6):1218-28.
 50. Tannous Z, Torres A, González S. In vivo real-time confocal reflectance microscopy: a noninvasive guide for Mohs micrographic surgery facilitated by aluminum chloride, an excellent contrast enhancer. *Dermatol Surg.* 2003;29(8):839-46.
 51. Pellacani G, Vinceti M, Bassoli S, Braun R, Gonzalez S, Guitera P, et al. Reflectance confocal microscopy and features of melanocytic lesions: an internet-based study of the reproducibility of terminology. *Arch Dermatol.* 2009;145(10):1137-43.
 52. Kaeb S, Landthaler M, Hohenleutner U. Confocal laser scanning microscopy--evaluation of native tissue sections in micrographic surgery. *Lasers Med Sci.* 2009;24(5):819-23.
 53. Scope A, Benvenuto-Andrade C, Agero AL, Malvehy J, Puig S, Rajadhyaksha M, et al. In vivo reflectance confocal microscopy imaging of melanocytic skin lesions: consensus terminology glossary and illustrative images. *J Am Acad Dermatol.* 2007;57(4):644-58.
 54. Pellacani G, Vinceti M, Bassoli S, Braun R, Gonzalez S, Guitera P, et al. Reflectance confocal microscopy and features of melanocytic lesions: an internet-based study of the reproducibility of terminology. *Arch Dermatol.* 2009;145(10):1137-43.