



Universitat
de les Illes Balears

TRABAJO DE FIN DE GRADO

MICROSCOPIA LÁSER CONFOCAL: APLICACIONES EN UROLOGÍA PARA EL ESTUDIO IN VIVO.

María Villalba Moya

Grado en Medicina

Facultad de Medicina

Año Académico 2022-23

MICROSCOPIA LÁSER CONFOCAL: APLICACIONES EN UROLOGÍA PARA EL ESTUDIO IN VIVO.

María Villalba Moya

Trabajo de Fin de Grado

Facultad de Medicina

Universitat de les Illes Balears

Año Académico 2022-23

Palabras clave del trabajo:

Endomicroscopía láser confocal, aplicaciones, in vivo, urología

Nombre del Tutor / la Tutora del Trabajo: Dr. Enrique Pieras Ayala.

Se autoriza a la Universidad a incluir este trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con fines exclusivamente académicos y de investigación.

Autor/a		Tutor/a	
Sí	No	Sí	No
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	x	<input type="checkbox"/>

Resumen

La microscopía láser confocal es una técnica microscópica que se puede aplicar *in vivo* para conseguir imágenes de alta resolución de tejidos gruesos por medio de muestras que emiten fluorescencia o reflejan la luz, y forámenes estenopeicos con los que se obtiene únicamente un haz emitido desde un punto focal. Desde su diseño por Minsky en 1955 ha evolucionado de forma que se han desarrollado distintos tipos de microscopio confocal, así como aplicaciones en varias áreas, como a nivel endoscópico constituyendo la endomicroscopía láser confocal (CLE) ampliamente aplicada en diversas áreas como digestivo.

En este trabajo se pretende determinar y revisar las aplicaciones actuales de CLE *in vivo* en varios campos de la urología por medio de un conjunto de búsquedas bibliográficas realizadas en PubMed. De las mismas se concluye que la CLE permite estudiar de forma eficaz y segura los márgenes quirúrgicos y la integridad del paquete vasculonervioso en prostatectomías radicales. Así como también, tanto a nivel vesical como del tracto urinario superior, se han establecido una serie de criterios para el diagnóstico y gradación de los tumores uroteliales, y su posible aplicación en la decisión del manejo de estas lesiones. Finalmente, a pesar de no hallarse estudios *in vivo* en cuanto a patología renal, se plantea su aplicación en la evaluación de masas renales sólidas descubiertas de forma incidental y posibles implicaciones futuras en la patología litíásica.

Índice

1. Introducción	pág. 5
2. Objetivos	pág. 12
3. Metodología	pág. 12
4. Resultados	pág. 13
5. Discusión.....	pág. 18
6. Conclusiones	pág. 38
7. Bibliografía	pág. 39

1. Introducción

1.1. Técnica

La microscopía confocal es una técnica con la que es posible adquirir imágenes de alta resolución de tejidos gruesos y estudiar muestras *in vivo*, a diferencia de la microscopía convencional, que requiere cortes finos de muestras previamente fijadas o congeladas (1,2).

Este hecho es debido a que, mientras que en la microscopía convencional se ilumina y visualiza toda la muestra simultáneamente recibiendo iluminación de otras partes además de la del punto focal de la lente produciéndose una borrosidad que disminuye la resolución de la imagen, la confocal rechaza esa luz permitiendo obtener imágenes de alta calidad con mayor contraste y detalle, además de posibilitar la reconstrucción de imágenes tridimensionales (1,2).

Para su correcto funcionamiento requiere epiluminación, es decir, que las muestras emitan fluorescencia o reflejen la luz. A su vez, para filtrar la luz, el microscopio confocal emite un haz que se enfoca a través del objetivo en un punto determinado y recoge, por el mismo objetivo, la luz reflejada pasando por un agujero estenopeico o diafragma (o *pinhole*, en inglés) que consiste en una ranura por la que solo permite acceder de la luz emitida desde el punto focal deseado (2).

Una vez ha pasado por el agujero estenopeico, la luz emitida desde la muestra es detectada gracias a un detector fotomultiplicador que multiplica la corriente que produce la luz, facilitando la detección de fotones individuales y moléculas fluorescentes aunque se encuentren en bajas cantidades (1,3). Entonces, solo se obtienen imágenes de un único punto durante el escaneo confocal, así que este punto debe moverse sobre la muestra (concretamente en los ejes x, y) con el fin de poder recopilar los datos necesarios que son enviados a un ordenador que compila todas las imágenes puntuales para obtener una imagen completa (1,2).

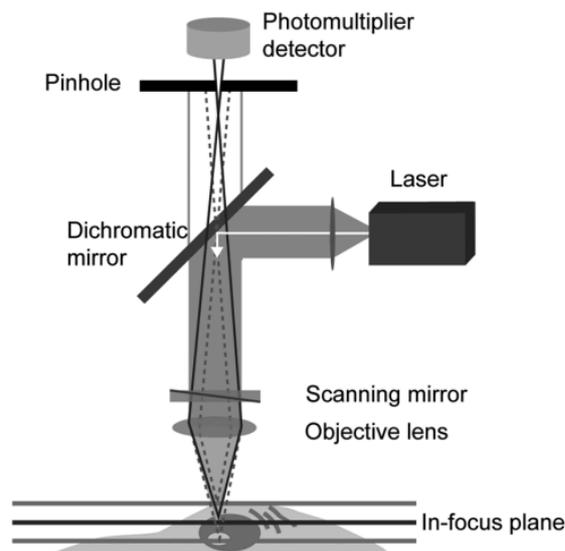


Imagen 1. Extraída de Elliot AD (1): estructura y funcionamiento de un microscopio de escaneo láser confocal.

El diseño del microscopio confocal fue ideado por Marvin Minsky en 1955 y patentado en 1957 mientras estudiaba como obtener imágenes de las conexiones entre las neuronas cuando descubrió que podía mejorar la resolución de las imágenes iluminando únicamente una pequeña sección de la muestra y escaneándola punto por punto. De forma que, el primer microscopio confocal estaba compuesto por una lámpara con un diafragma delante para reducir la dispersión de la luz de excitación, la lente del objetivo, otro diafragma (para rechazar la luz de fuera del plano focal) frente al detector fotomultiplicador y una pantalla de radar antigua (1,4). A pesar de las ventajas que ofrecía esta nueva técnica no fue tan ampliamente recibida en su momento como cabría esperar debido a que requería de tecnologías que estaban subdesarrolladas o aún no se habían inventado (como los láseres, que se desarrollaron en la década de 1960) y no existía una necesidad por parte de la comunidad científica para su uso. El interés sobre esta técnica creció tras el desarrollo del uso de los anticuerpos marcados con fluorescencia para marcar diferentes proteínas de interés, momento en que empezaron a necesitar una forma de obtener imágenes de mayor calidad de muestras gruesas (4).

El primer microscopio láser confocal moderno fue desarrollado por Brad Amos y John White en la Universidad de Cambridge. Este microscopio contaba con un láser de iones argón como fuente de luz que se escaneaba a través del campo de visión del objetivo de la imagen mediante dos galvanómetros, uno para el eje x y otro para el y, de esta forma redujeron las vibraciones y mejoraron la precisión y velocidad (4).

En la actualidad los microscopios confocales cuentan, además de con los elementos básicos del microscopio de Minsky (diafragma, lente objetivo, detectores), con espejos de escaneo rápido, filtros para la selección de longitud de onda e iluminación láser como fuente de luz. En cuanto a esto último, cada vez se usan más láseres de diodo, de fibra y de estado sólido por su mayor uniformidad y estabilidad además de emitir una amplia gama de longitudes de onda y menos calor, aunque los láseres de gas se siguen empleando (1).

1.2. Tipos

Debido a que la imagen se obtiene desplazando el punto de iluminación por la muestra, se han ido desarrollando diferentes estrategias para ello, por lo que existen varios tipos de microscopía confocal a parte de la original que escanea un punto cada vez, como la de disco giratorio y la híbrida (1).

La microscopía láser confocal utiliza un láser como fuente de iluminación que se barre por la muestra. Este láser es dirigido hacia una serie de espejos que permiten que el haz realice un barrido en las direcciones x e y de un único campo de visión que se va desplazando por la muestra para producir la imagen de un corte (1). Este proceso se puede ir repitiendo cambiando el punto focal para recopilar imágenes de diversos cortes que permiten reconstruir una imagen tridimensional (1). La mayoría de estos microscopios permiten ajustar el tamaño del diafragma para adecuar el grosor de la sección óptica, seleccionar la zona de interés a estudiar y acomodar tanto tejidos vivos como fijos (1).

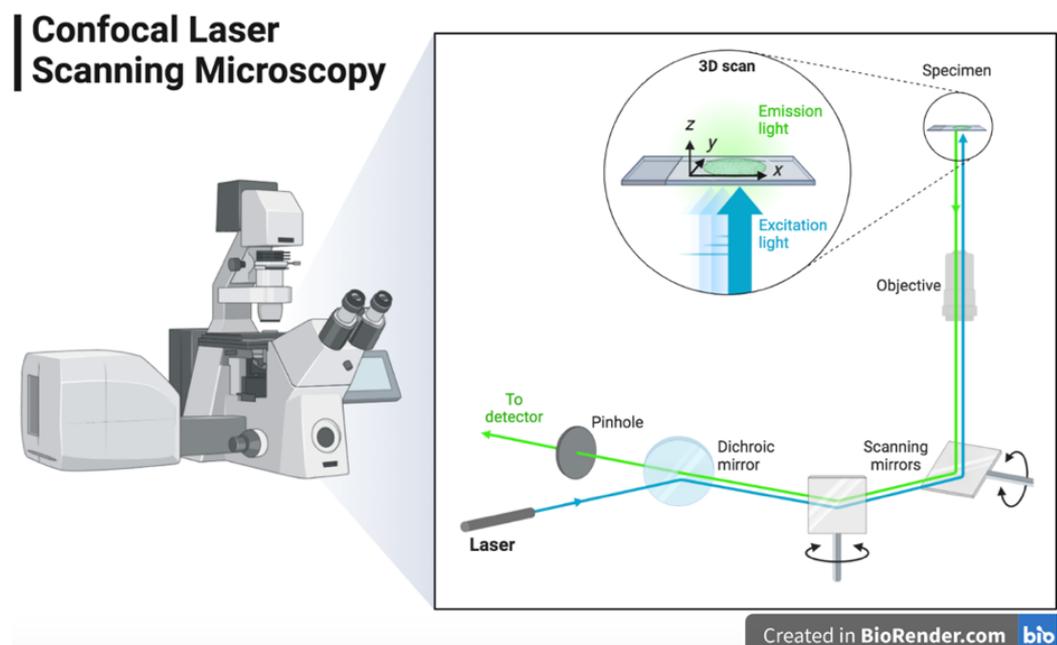


Imagen 2. Obtenida con Biorender: microscopio de escaneo láser confocal.

La microscopía confocal de disco giratorio permite un barrido de múltiples puntos con el que la muestra no ha de moverse a través de la iluminación ya que utiliza un disco giratorio que tiene *pinholes* concéntricos situados en la trayectoria del haz de excitación con lo que se generan múltiples puntos de excitación y detección a la vez permitiendo escanear rápidamente un campo de visión por completo (1).

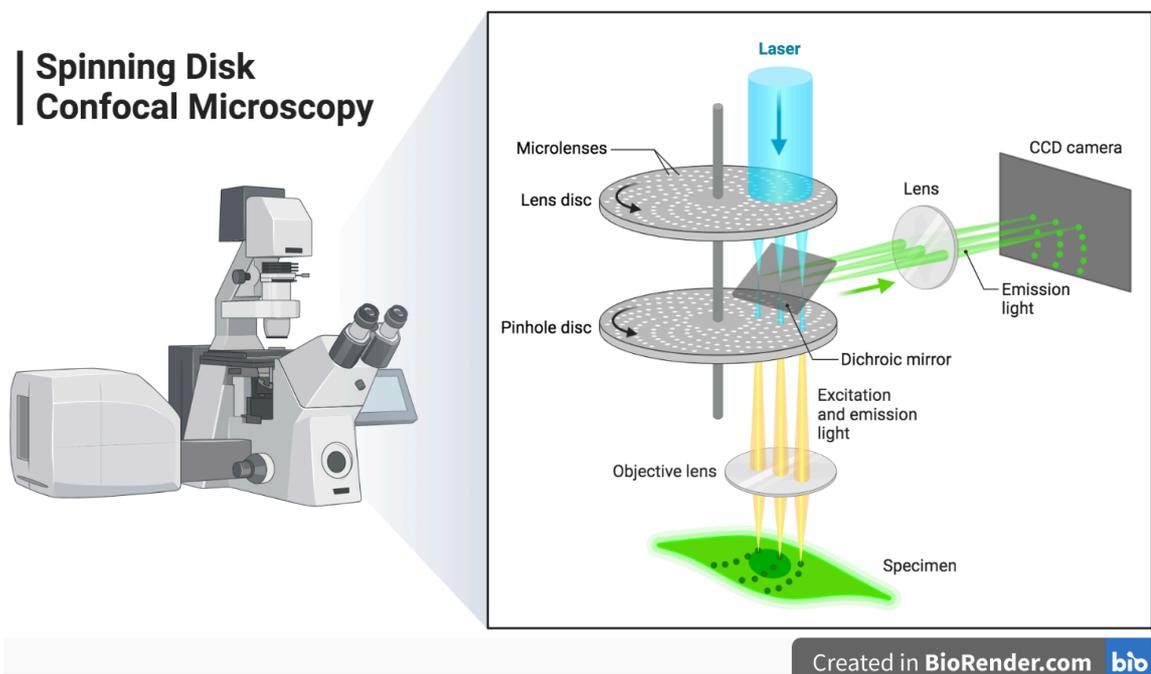


Imagen 3. Obtenida con Biorender: microscopio confocal de disco giratorio.

Finalmente, la microscopía híbrida se basa en un enfoque intermedio entre el barrido de un punto (como el de la microscopía láser confocal) y el multipunto (como el de la microscopía confocal de disco giratorio) siendo un ejemplo el llamado *swept-field confocal microscope* que puede usar tanto diafragmas, anteriormente comentados, como rendijas que no se mueven si no que son los galvanómetros y los espejos los que permiten que el haz se barra sobre la muestra (1,4).

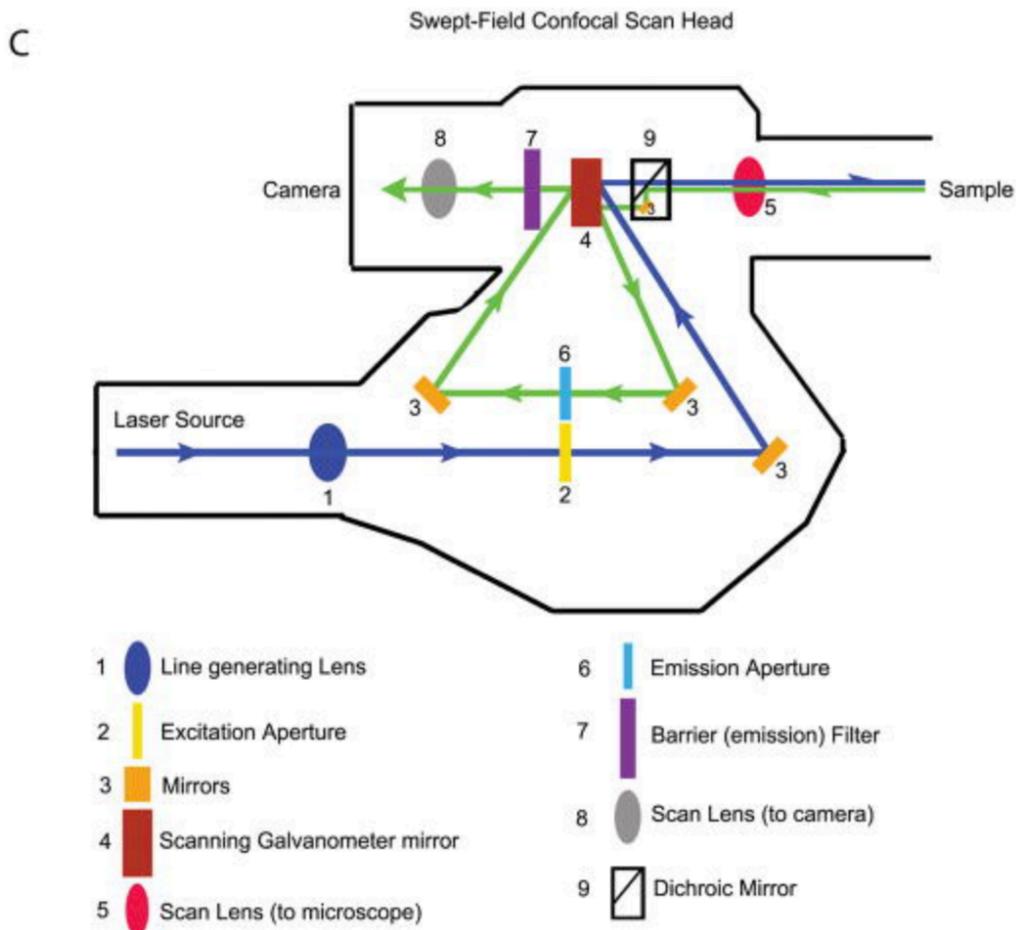


Imagen 4. Obtenida de Castellano M et al. (5): swept-field confocal microscope.

El tipo de microscopía confocal que se va a desarrollar a lo largo de este trabajo es la primera, de barrido láser, ya que es una de las más estudiadas en diferentes ámbitos de la medicina, además de ser la que permite obtener las imágenes con mayor resolución; entre sus aplicaciones destaca la posibilidad de introducirse a través de endoscopios conformando la endomicroscopía láser confocal (CLE), con la que se pueden obtener imágenes de forma intraoperatoria *in vivo* en varios ámbitos.

1.3. Aplicaciones de la microscopía láser confocal

Esta técnica de microscopía permite el estudio de procesos celulares muy variados como, por ejemplo, la apoptosis, actividades enzimáticas, fagocitosis, etc., de forma que, en la actualidad, presenta aplicaciones muy diversas en diferentes áreas de la medicina (3).

Al ser una técnica no invasiva, la microscopía láser confocal constituye un método ágil para explorar la córnea en sus estados fisiológico, patológico y postquirúrgico además de permitir analizar capas, nervios, células, presencia de elementos fúngicos, así como la densidad y profundidad de dichas estructuras (6). De forma que en oftalmología se aplica en el diagnóstico de queratitis infecciosas permitiendo, concretamente, visualizar *Acanthamoebas* y filamentos fúngicos, siendo en este último caso especialmente útil ya que se puede tardar una serie de días en obtener los resultados de los cultivos pudiendo llegar a ser incluso negativos según a la profundidad a la que se encuentren, por lo que la detección temprana por microscopía confocal posibilita el tratamiento precoz de la infección (6). Otros usos clínicos en este campo son la medición de la profundidad de depósitos corneales, de la vasculatura del limbo ocular, la degeneración macular y de la densidad de células endoteliales además de la evaluación de la eficacia del tratamiento del ojo seco (estudiando además de la córnea, las glándulas lacrimales, de meibomio y la conjuntiva), así como cambios corneales en el Síndrome de Stevens-Johnson y en la necrosis tóxico-epidérmica (6,7). Como se trata de una técnica útil para el estudio de la respuesta celular frente a tratamientos farmacológicos y quirúrgicos se emplea, a su vez, en investigación, principalmente de cirugía y enfermedades corneales (5).

En dermatología es muy utilizada para el diagnóstico de lesiones melanocíticas, cáncer no melanoma y, también, lesiones inflamatorias benignas (8). En cuanto al diagnóstico de patologías malignas su utilidad radica, principalmente, en la importancia de detectar de forma temprana estas lesiones, para extirparlas generando mínimas cicatrices, y en su monitorización y seguimiento terapéutico (8). En el diagnóstico del melanoma se estima que puede aumentar la especificidad lo que podría comportar la reducción de biopsias innecesarias. Sin embargo, puede hallar subtipos poco frecuentes del melanoma como el melanoma spitzoide (8). En cuanto al carcinoma de células basales también presenta una elevada especificidad y sensibilidad, además de haberse estudiado su aplicabilidad como una herramienta complementaria para la cirugía micrográfica de Mohs y la monitorización de la respuesta frente a Imiquimod y crioterapia (8). En la dermatitis de contacto ayuda en la distinción entre la alérgica y la dermatitis de contacto irritante por medio de la observación de una serie de características como son la espongirosis epidérmica, la exocitosis, formación de vesículas y ruptura de la capa corneal por irritantes exógenos, siendo ésta la más característica de la dermatitis irritante (8). Otro de sus usos en este campo es el de la investigación en la industria cosmética para el estudio de la eficacia, tolerabilidad y respuestas fisiológicas y patológicas de la piel a los productos de aplicación tópica. A su vez, permite investigar los efectos de tratamientos con láser sobre la piel como, por ejemplo, el del hemangioma cereza observándose la desaparición de asas capilares dilatadas.

Así mismo, podría ser útil en la evaluación de alteraciones de la piel relacionadas con los tatuajes ya que permite visualizar depósitos subepidérmicos de gránulos de pigmento densos de hasta aproximadamente 3µm de tamaño (8).

Como se ha comentado anteriormente, debido a que este tipo de microscopía utiliza un láser como señal, esta técnica puede aplicarse a la endoscopia obteniendo en tiempo real una evaluación histológica *in vivo* de superficies mucosas. Razón por la cual se han realizado muchos estudios sobre la utilidad de esta técnica en digestivo, para evaluar el tracto gastrointestinal. En dichos estudios ha demostrado ser una técnica segura, y que con el uso de agentes fluorescentes, ayuda en la diferenciación y clasificación de pólipos colorrectales, estenosis biliares indeterminadas y lesiones quísticas pancreáticas, además de permitir una mayor detección de esófago de Barrett displásico, neoplasias intraepiteliales gástricas y displasias asociadas a enfermedades inflamatorias intestinales que los protocolos de detección estándar (9).

La microscopía láser confocal se puede aplicar también al estudio de osteonecrosis y osteorradionecrosis mandibular. En pacientes con osteoartritis sirve para evaluar cambios morfológicos de los condrocitos y en la microestructura cartilaginosa. A su vez, ha facilitado el estudio de la regeneración tisular y la evaluación del estado de lubricación articular (3).

En lo referente al diagnóstico genético ha sido útil, junto con la técnica FISH, para evidenciar genes involucrados en enfermedades hereditarias (3). En células infectadas por VIH, Aspergillus y herpes virus entre otros, permite monitorizar procesos de fagocitosis, autofagia y apoptosis (3).

Así mismo es una técnica aplicada en oncología para el estudio de neovasos, permeabilidad celular y las anomalías estructurales presentes en la progresión tumoral (3).

1.4. Aplicaciones en urología

A pesar de no existir un consenso sobre sus indicaciones en urología, se han llevado a cabo varios estudios sobre la utilidad de la microscopía láser confocal en tumores de vejiga y tracto urinario superior, además de en próstata y riñón.

La microscopía láser confocal aplicada a la endoscopia se está estudiando para su uso en cáncer vesical y lesiones malignas de las vías urinarias altas, ya que proporciona imágenes a nivel celular que podrían usarse para la clasificación intraoperatoria de los tejidos; su principal problema radica en que carece de la penetración necesaria para poder evaluar con precisión la profundidad de la lesión (10). En cuanto a las neoplasias vesicales, como la CLE es capaz de

distinguir entre microestructuras y células individuales, posibilita la detección y gradación de carcinomas uroteliales, además de la evaluación de la eficacia de su tratamiento por medio de resecciones transuretrales (11). De la misma manera, se plantea su uso en la evaluación de neoplasias del tracto urinario superior por medio de la ureteroscopia obteniendo información complementaria a la de las biopsias, ya que permite identificar el grado del tumor con una alta correlación con el análisis histopatológico final. Es por este motivo que la endomicroscopía confocal es recomendada por la *European Association of Urology* para el manejo conservador del carcinoma del tracto urinario superior (12).

A nivel renal la utilidad de la microscopía confocal no ha sido muy estudiada, pero podría aplicarse para diferenciar entre tejido canceroso y tejido sano (13). Finalmente, en el estudio de la próstata, concretamente para la detección de cáncer prostático, la microscopía láser confocal ha demostrado un rendimiento diagnóstico comparable al de la histopatología convencional (14).

2. Objetivos

El principal objetivo de este trabajo consiste en realizar una búsqueda bibliográfica sistemática para revisar las aplicaciones actuales de la microscopía láser confocal en la urología, además de explorar posibles nuevas indicaciones.

Concretamente, se pretende actualizar la información existente sobre la aplicación de esta microscopía *in vivo*, es decir, intraoperatoriamente, en una serie de áreas como son la patología prostática, la vesical, neoplasias del tracto urinario superior, litiasis y tumores renales.

3. Material y métodos

Para el desarrollo de este trabajo se han llevado a cabo una serie de búsquedas en PubMed aplicándoles el filtro para explorar selectivamente las aplicaciones sobre tejido vivo que nos permite esta tecnología con la opción de "Advanced Search Builder" usando los descriptores buscados en la página <https://decs.bvsalud.org/en/> (DeCS), introducidos como "MeSH Terms" y enlazados con operadores booleanos de la siguiente manera:

- ("Microscopy, Confocal"[Mesh]) AND ("Prostate"[Mesh]): 79 artículos, de los que tras leer su título y *abstract* se seleccionaron 26 artículos, de los cuales, después de leer el apartado de materiales y métodos, finalmente se escogen 4 relacionados con sus aplicaciones *in vivo*.

- ("Microscopy, Confocal"[Mesh]) AND (("Urinary Bladder"[Mesh]) OR ("Urinary Bladder Neoplasms"[Mesh])): 194 artículos, de los que tras leer su título y abstract se seleccionaron 44 artículos que, tras leerlos, se reducen a 18.
- (("Microscopy, Confocal"[Mesh]) OR ("Confocal Laser Endomicroscopy")) AND ("Upper Urinary Tract"): 19 artículos, de los que se seleccionan 11.
- Para la patología renal se realizan dos búsquedas: ("Microscopy, Confocal"[Mesh]) AND (("Nephrolithiasis"[Mesh]) OR ("Kidney Calculi"[Mesh])) con 8 artículos y ("Microscopy, Confocal"[MeSH]) AND ("Carcinoma, Renal Cell"[MeSH]) con 38 resultados. Se incluye únicamente un estudio que evalúa el uso de CLE en masas renales *ex vivo* (15), ya que ninguno aborda el uso de la microscopía con focal *in vivo* en la patología renal.

Debido a que los resultados son relativamente escasos, las revisiones sistemáticas publicadas han sido incluidas en los resultados.

4. Resultados

Se recopilan los datos obtenidos de los artículos que se han seleccionado de las distintas búsquedas en las siguientes tablas según el campo en que se haya estudiado la aplicación endoscópica de la microscopía confocal.

4.1. Próstata

Autor	Número de casos	Posibles aplicaciones descritas
López A et al. (16).	105 secuencias, 15 pacientes.	Identificación de las estructuras prostáticas y periprostáticas. Permite identificar el paquete vasculonervioso, Controlar los márgenes quirúrgicos. En un futuro, con la incorporación de marcadores moleculares o estimuladores nerviosos podría estimarse la respuesta fisiológica de los nervios de forma intraoperatoria.
Van Riel LAMJG et al. (17).	2 pacientes.	Obtención de imágenes del tejido prostático <i>in vivo</i> en el momento de realización de biopsias de forma segura. Se plantean mejoras para poder utilizar esta técnica con el fin de obtener "biopsias ópticas" en un futuro.
Panarello D	16 fotografías	Se diferencian tejidos intra y extraprostáticos.

et al. (18).	139 video clips 237 fotografías 15 pacientes.	Evalúa el rendimiento diagnóstico de la CLE para obtener márgenes quirúrgicos negativos durante la prostatectomía radical.
Eissa A et al. (19).	Revisión bibliográfica.	Es viable y segura la aplicación de CLE intraoperatoria en la prostatectomía radical. Permite identificar puntos anatómicos y estructurales importantes.

4.2. Vejiga

Autor	Número de casos	Posibles aplicaciones descritas
Lerner SP, Goh A (20).	Revisión sistemática.	Información histopatológica en tiempo real. Diferenciación del urotelio normal del neoplásico. Mejor estudio de lesiones sospechosas. Ahorro de biopsias innecesarias.
Fritzsche C et al. (21).	1.	Detección de huevos de esquistosoma.
Sonn GA et al. (22).	27.	Diferenciación de urotelio normal vs neoplasia (bajo y alto grado).
Lee J et al. (23).	119 lesiones 75 pacientes.	Diagnóstico y gradación de los tumores <i>in vivo</i> . Diferenciación CIS vs inflamación vesical. Efecto terapéutico: en tumores T1 de alto grado ha demostrado un periodo libre de recurrencia mayor.
Wiesner C et al. (24).	18 pacientes.	Visualización patrones de crecimiento tumoral como una relación núcleo/citoplasma alterada, la estratificación del tejido pseudopapilar y neoangiogénesis. Discriminación entre la arquitectura nuclear y subnuclear de tejido vesical sano y tejido neoplásico.
Rundstedt F-C von, Lerner SP (25).	Revisión sistemática.	Obtención de imágenes microscópicas <i>in situ</i> en tiempo real de la arquitectura de la superficie. Discriminación tejido sano vs neoplásico y gradación de los mismos.
Zlatev DV et al. (26).	Revisión sistémica.	Permite realizar biopsias ópticas <i>in vivo</i> obteniendo imágenes de alta resolución similares a la histopatología.

		Diferencia el grado tumoral.
Raharja, PAR et al. (27).	Revisión sistémica.	Detecta carcinoma in situ (CIS). Diferencia el grado tumoral.
Chang TC et al. (28).	31 muestras vesicales.	Se proponen criterios diagnósticos de carcinoma vesical. Se aborda la concordancia interobservador.
Liem EIML et al. (29).	66 muestras 62 pacientes.	Diferencia el grado tumoral. Se renuevan los criterios para el diagnóstico del tumor vesical. Se plantean posibles usos futuros: confirmar la radicalidad quirúrgica de la RTU o la presencia de músculo detrusor en el tejido resecado, realizar vigilancia activa en pacientes con neoplasias de bajo riesgo, uso combinado con otras técnicas.
Wu J et al. (30).	21 pacientes.	Obtención de información histopatológica <i>in vivo</i> . Detección de características celulares que permiten determinar el grado de la neoplasia. Permite explorar las características del leiomioma.
Liu J-J et al. (31).	Revisión sistémica.	Visualización de morfología celular y microarquitectura de lesiones sospechosas <i>in vivo</i> . Diferencia el grado tumoral.
Wu J et al. (11).	302 lesiones.	Diferencia el grado tumoral. Permite confirmar si la RTU ha sido radical. Reduce recurrencias.
Naya Y et al. (32).	7 pacientes.	Visualización de núcleos celulares en carcinoma urotelial vesical de forma segura por medio del uso de acrinol.
Tang Y et al. (33).	15 pacientes.	Detección asequible y portátil de estructuras subcelulares del urotelio vesical así como de características diagnósticas de lesiones benignas y malignas.
Lucas M et al. (34).	140000 fotogramas 72 lesiones 53 pacientes.	Identificación y estratificación adecuada de lesiones vesicales <i>in vivo</i> por medio de la incorporación de un método de clasificación asistido por ordenador. Se proponen usos futuros: escanear el lecho de la lesión tras RTU para confirmar su radicalidad, podría extrapolarse el método de clasificación al carcinoma urotelial del tracto

		urinario superior.
Adams W et al. (35).	67 pacientes.	La sonda de 2,6 mm es más adecuada para el estudio histopatológico del tracto urinario debido a la mejor resolución de la morfología celular que ofrece.
Chen SP, Liao JC (36).	Revisión sistémica.	<p>Detecta parámetros fisiológicos en tiempo real como el flujo sanguíneo.</p> <p>Permite establecer criterios diagnósticos de tumor vesical.</p> <p>Visualiza la muscular propia tras resección tumoral.</p>

4.3. Tracto urinario superior

Autor	Número de casos	Posibles aplicaciones descritas
Chen SP, Liao JC (36).	Revisión bibliográfica.	<p>Visualización de urotelio sano y carcinoma papilar de tracto urinario superior (TUS) <i>in vivo</i>.</p> <p>Identificación de las características del carcinoma papilar de TUS.</p>
Balaña J et al. (12).	Revisión bibliográfica.	<p>Proporciona, en tiempo real, información citológica de neoplasias del TUS.</p> <p>Criterios diagnósticos de carcinoma urotelial de TUS.</p> <p>Determinación del grado tumoral.</p> <p>Manejo conservador del carcinoma del TUS.</p>
Freund JE et al. (37).	53 casos 36 pacientes.	<p>Gradación de carcinoma urotelial.</p> <p>Se confirma la validez en carcinoma de TUS de los criterios usados en carcinoma vesical.</p> <p>Se proponen como criterios diagnósticos más adecuados la organización celular, morfología y cohesividad celular.</p> <p>Se plantea un sistema de puntuación basado en las características de los criterios.</p>
Bus MTJ et al. (38).	Revisión bibliográfica.	Obtiene imágenes de alta resolución de la estructura celular en tiempo real.
Villa L et al. (39).	11 pacientes.	Detección de características de tejido sano y de carcinomas de alto y bajo grado.

		<p>Se propone su uso para determinar zonas a biopsiar y realizar fotoablación con láser en un mismo tiempo quirúrgico.</p> <p>Puede ayudar en la toma de decisiones referentes al manejo (conservador vs quirúrgico).</p>
Territo A et al. (40).	Revisión bibliográfica.	<p>Obtención en tiempo real de imágenes microscópicas.</p> <p>Diferenciación entre urotelio normal y carcinoma.</p>
Bui D et al. (41).	14 pacientes.	<p>Obtención por medio de la sonda de 0.85mm de imágenes microscópicas en tiempo real y detección de características del carcinoma urotelial.</p> <p>Potencial complemento la biopsia ureteroscópica, ablación endoscópica y seguimiento del carcinoma urotelial de TUS.</p>
Baard J et al. (42).	Revisión Bibliográfica.	<p>Aporta información histopatológica y sobre el grado de lesiones en tiempo real.</p> <p>En un futuro podría sustituir las biopsias invasivas y evaluar la integridad del tratamiento conservador del carcinoma urotelial de TUS.</p>
Sanguedolce F et al. (43).	47 pacientes.	<p>Mejora el manejo endoscópico del carcinoma urotelial del TUS.</p> <p>Evalúa dinámicamente la morfología celular y arquitectura lesional.</p>
Fojecki G et al. (44).	Revisión bibliográfica.	Permite determinar el grado de lesiones neoplásicas de TUS.
Brunckhorst O et al, (10).	Revisión bibliográfica.	Permite diferenciar entre tumores de alto y bajo grado.

4.4. Patología renal

Autor	Número de casos	Posibles aplicaciones descritas
Su L-M et al. (15).	20.	<p>Distingue características de la microarquitectura y morfología celular del tejido sano y tumoral.</p> <p>Permitiría realizar biopsias ópticas diagnósticas en tiempo real para decidir el manejo a llevar a cabo.</p>

5. Discusión

El principal uso de la microscopía láser confocal de forma intraoperatoria se realiza por medio de su aplicación en la endoscopia recibiendo el nombre de endomicroscopía láser confocal (CLE). El endomicroscopio confocal que se utiliza en urología se llama Cellvizio y es un sistema basado en sondas que van desde 0,85mm (cuya resolución espacial es de $3,5\mu\text{m}$, su profundidad de penetración de $50\mu\text{m}$ y su campo de visión de $320\mu\text{m}$) a 2,6mm (cuya resolución espacial es de $1\mu\text{m}$, su profundidad de penetración de $60\mu\text{m}$ y su campo de visión de $240\mu\text{m}$), usando fluoresceína como agente de contraste que se puede administrar por vía intravesical o intravenosa (19).

El uso de este sistema en patología prostática ha sido estudiado por varios autores que coinciden en que se trata de una técnica con la que es posible obtener imágenes *in vivo* de alta resolución semejantes a las obtenidas por medio de la histopatología, con lo que posibilitan diferenciar los tejidos prostáticos y periprostáticos permitiendo evaluar en tiempo real los márgenes quirúrgicos en las prostatectomías radicales (16,19). Este procedimiento, utilizado para el tratamiento del cáncer prostático, puede conllevar consecuencias como la disfunción eréctil o márgenes quirúrgicos positivos, así como también el control y la recuperación de la función urinaria. Es por ello que Lopez A et al. (16) propusieron evaluar si el uso de CLE en las prostatectomías radicales asistidas robóticamente mejoraban los resultados quirúrgicos. Obtuvieron imágenes del paquete vasculonervioso *in vivo* por CLE de 15 pacientes antes y después de la disección con conservación del nervio. Las características confocales del paquete vasculonervioso que se visualizaron consistían en unas líneas oscuras delgadas paralelas que corresponden a fibras axonales, rodeadas por células oscuras (adipocitos) e intercaladas por estructuras por las que se veían fluir eritrocitos (vasos) (16).

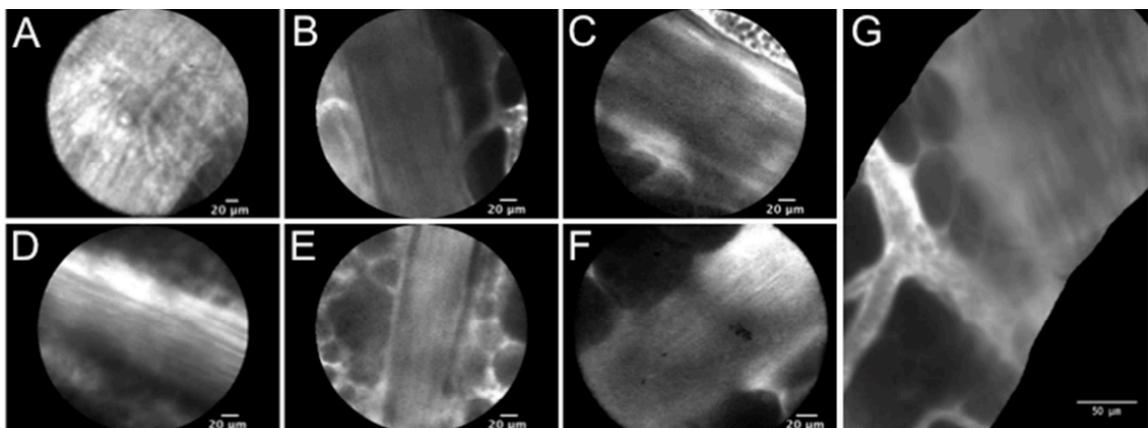


Imagen 5. Extraída de López A et al. (16): axones vistos por medio de la sonda de 0.85mm (A), el resto de imágenes fueron obtenidas por medio de la sonda

de 2.6mm, nervios visualizados antes de la disección del paquete vasculonervioso (B) y después (C y D). Imagen de CLE ex vivo del paquete vasculonervioso intacto (F). Imagen panorámica del paquete vasculonervioso generada de imágenes obtenidas in vivo con CLE (G).

Gracias a la determinación de estas características de forma intraoperatoria se obtienen unos mejores resultados en cuanto a la conservación de los nervios ya que se puede mapear la ubicación del paquete vasculonervioso y visualizarlo tras la disección. Aún así, la visualización de nervios intactos no tiene porqué significar que estos sean funcionales y, de hecho, actualmente se desconocen los efectos funcionales a largo plazo del uso de CLE. Se plantea la posibilidad de integrar en un futuro la CLE con marcadores moleculares o estimuladores nerviosos para obtener información sobre los resultados intraoperatorios en términos de función nerviosa (16). Teóricamente, la identificación mejorada de estas estructuras permitirá disminuir las tasas de disfunción eréctil asociadas al procedimiento quirúrgico de la prostatectomía radical.

Van Riel L et al. (17) plantean el uso de la endomicroscopía láser confocal en la realización de biopsias de próstata para el mapeo transperineal en pacientes en que se sospecha un cáncer prostático por medio de la CLE a través de aguja. Esta técnica consiste en utilizar sondas que se pueden pasar a través de agujas de 19G para visualizar la estructura celular de un área de interés, permitiendo obtener imágenes a nivel microscópico actuando a modo de biopsia óptica. Tras estudiar la factibilidad de esta técnica en dos pacientes a los que se les iban a realizar biopsias de mapeo transperineal guiadas por ecografía se concluyó que era posible obtener imágenes del tejido prostático *in vivo* en el momento de realización de biopsias de forma segura. Sin embargo, se determinó que dichas imágenes no presentaban ningún valor diagnóstico debido a que no se visualizaban con facilidad estructuras prostáticas por la presencia de sangre, artefactos de movimiento y poco tiempo de contacto con el tejido de interés, por lo que los autores expresan que por el momento no permite identificar adecuadamente el tejido prostático. Frente a lo que se plantea la posibilidad de usar una sonda orientada hacia adelante con un canal de lavado y un plano focal más alejado de la punta para que la sangre se acumule quede fuera del foco (17).

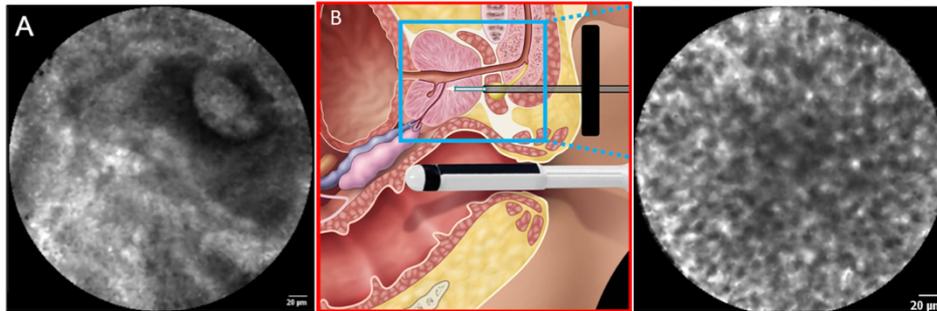


Imagen 6. Extraídas de Van Riel L et al. (17): tejido prostático de paciente con cáncer prostático de Gleason 4+3 por medio de CLE en aguja (A), esquema de la obtención de imágenes con guía ecográfica transrectal (B), imagen de eritrocitos por sangrado (C).

Para poder identificar y comparar las estructuras sanas y patológicas mostradas a través de CLE durante la prostatectomía radical Panarello D et al. (18) crearon un atlas basándose en el uso de CLE en muestras *ex vivo* y comparándolas con cortes teñidos con hematoxilina-eosina para correlacionarlos con las imágenes patológicas que se utilizaban hasta la fecha. A pesar de que no se trate de un estudio realizado *in vivo* se incluye en este trabajo por su importancia a la hora de establecer una base en la cual se fundamenta el uso de CLE *in vivo* en la actualidad, ya que ha permitido evaluar el rendimiento diagnóstico de esta técnica para obtener márgenes quirúrgicos negativos durante la prostatectomía radical. Concluyeron que la CLE permitía distinguir entre glándulas benignas y malignas ya que las células de estas últimas captan fluoresceína en el interior de su citoplasma a diferencia de las benignas, que no lo hacen. Así mismo, es difícil distinguir un grado 3 de Gleason de una glándula prostática normal fijándose únicamente en la morfología ya que en ambos casos se observan glándulas individuales, bien definidas y de varios tamaños (18).

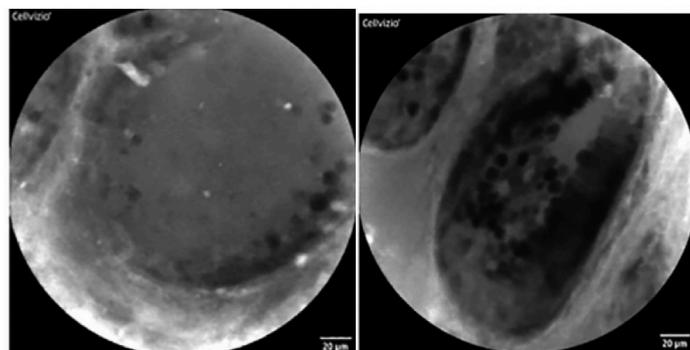


Imagen 7. Extraída de Panarello D et al. (18): glándula prostática normal (izquierda) y tumoral (derecha) vistas con CLE *ex vivo*.

El órgano urológico en el que más se ha estudiado el uso de CLE es la vejiga y, como en la próstata, se ha demostrado que permite obtener imágenes microscópicas de alta resolución con información histopatológica y fisiológica *in vivo* y en tiempo real. Pudiéndose emplear como complemento de la cistoscopia convencional para concentrarse en áreas de sospecha, confirmar anomalías microscópicas y reducir el número de biopsias innecesarias (11,20,25,30,31,36).

Como ya se ha comentado, existen varias sondas de CLE y Winifred A et al. (35) comparan el uso de la de 2,6mm con la de 1,4mm (de uso reciente) en pacientes que se someten a resección de cáncer vesical concluyendo que la sonda de 2,6mm es más adecuada para el estudio histopatológico del tracto urinario (y la que se utiliza de forma mayoritaria en los estudios incluidos en este trabajo) debido a la mejor resolución de la morfología celular que ofrece, mientras que la de 1,4mm presenta un mayor campo de visión, mejor visualización de la microestructura y es compatible con la cistoscopia flexible pero su calidad de imagen es inferior para el diagnóstico histológico.

La patología en la que más se ha practicado esta técnica ha sido la tumoral. Aún así, también se ha aplicado en un caso ya diagnosticado de esquistosomiasis urinaria en el que se demostró que permitía visualizar huevos de *Schistosoma haematobium* en urotelio humano *in vivo* con lo que podría servir para el diagnóstico de dicha patología en casos en que los métodos estándar de diagnóstico (muestras de heces y orina, detección de los huevos en biopsia) no fueran adecuados por presentar baja tasa de eliminación de huevos, invasividad de la técnica o una área limitada de examinación (21).

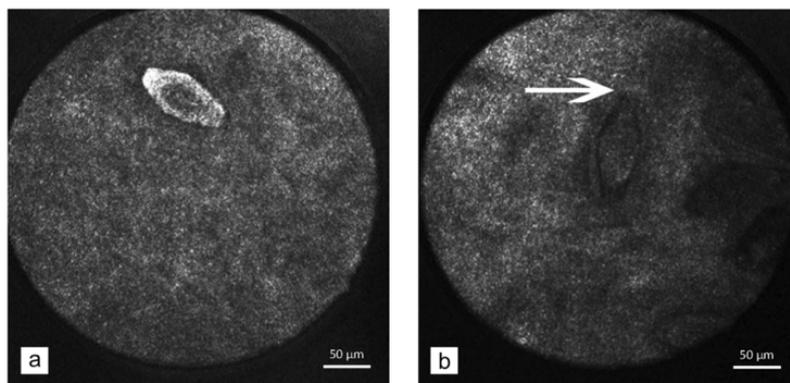


Imagen 8. Extraída de Fritzsche C et al. (21): visualización *in vivo* por medio de CLE de huevo de *Schistosoma haematobium*.

Debido a su capacidad para distinguir las características celulares y, por tanto, diferenciar entre urotelio sano y tejido neoplásico, permite incluso la gradación del tumor (11,25,30,31). Las características del urotelio normal y del carcinoma de alto y bajo grado fueron descritas por primera vez por Sonn GA et al. (22). El tejido sano se caracteriza por presentar una estructura organizada en que las células más superficiales (células sombrilla o paraguas) son de mayor tamaño que las de capas más profundas (células intermedias) y una lámina propia con vasos sanguíneos y menor celularidad (22,23,36).

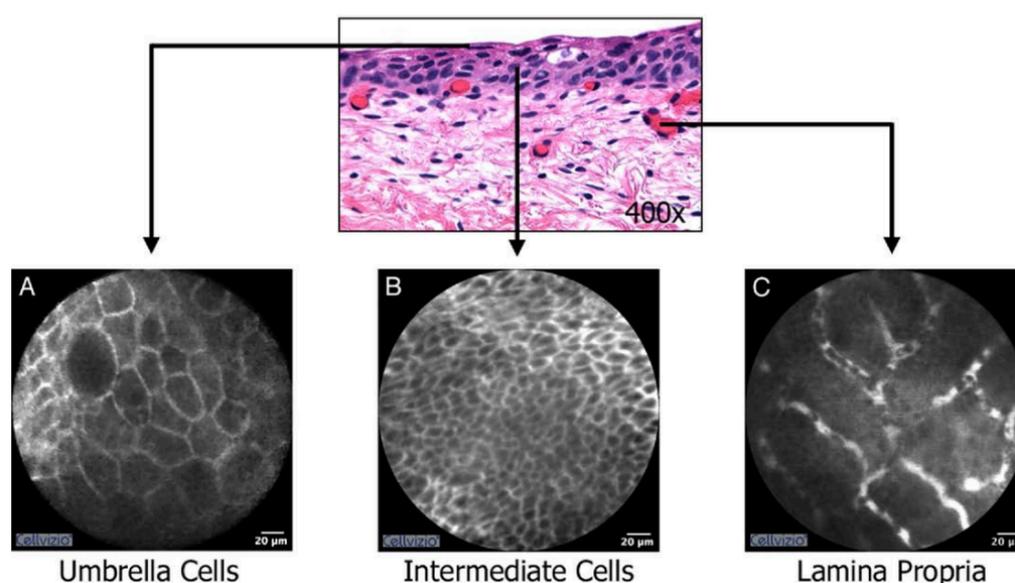


Imagen 9. Extraída de Sonn GA et al. (22): características del urotelio vesical sano por medio de CLE en comparación con su corte histológico teñido con hematoxilina y eosina.

Los tumores papilares de bajo grado son descritos como organizaciones densas de células cohesivas de pequeño tamaño uniformes que se extienden desde núcleos fibrovasculares, mientras que los tumores de alto grado se caracterizan por presentar pleomorfismo, menor cohesión celular y una arquitectura irregular (22,23,26,27).

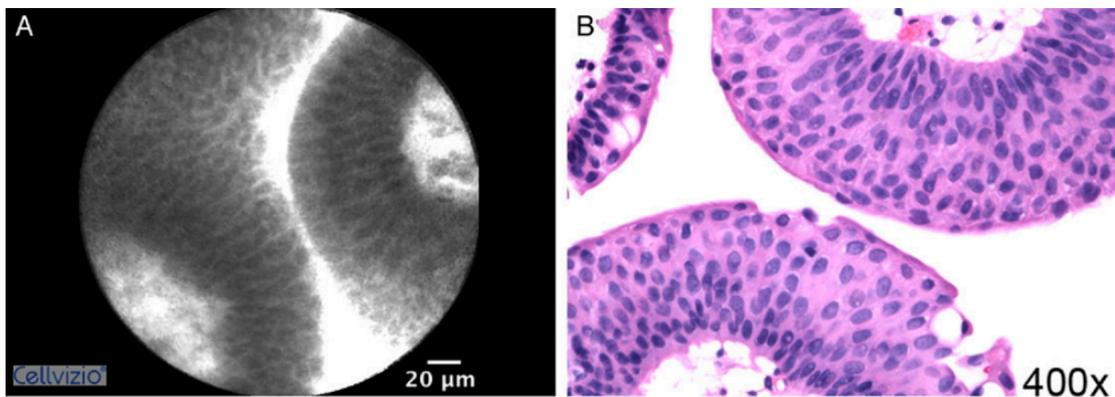


Imagen 10. Extraída de Sonn GA et al. (22): tumor de urotelio vesical de bajo grado visualizado con CLE (A) y su corte con hematoxilina-eosina correspondiente (B).

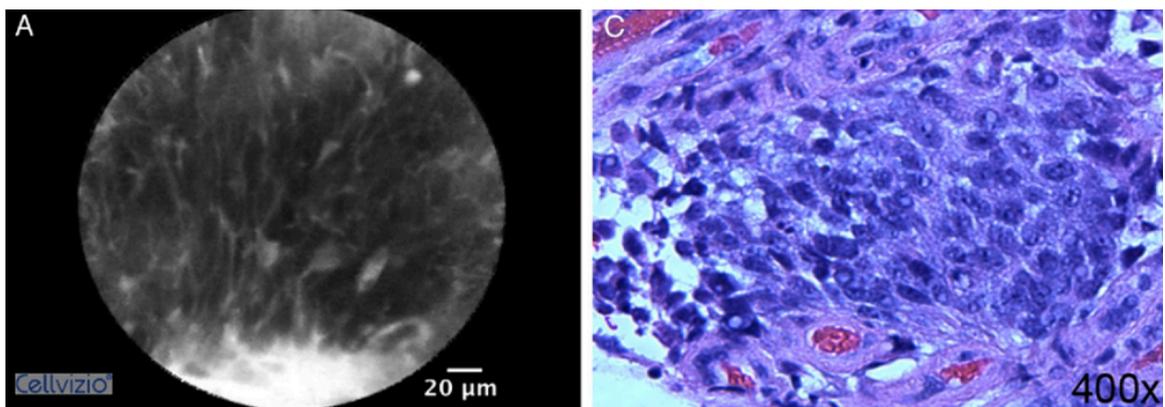


Imagen 11. Extraída de Sonn GA et al. (22): tumor de urotelio vesical de alto grado en CLE (A) comparado con su corte con hematoxilina-eosina correspondiente (B).

A su vez, pero en un estudio *ex vivo* y usando clorhidrato de acriflavina, Wiesner C et al. (24) describen la visualización de patrones de crecimiento tumoral como una relación núcleo/citoplasma alterada, estratificación del tejido pseudopapilar y neoangiogénesis además de discriminar entre los núcleos celulares de tejido sano y neoplásico, lo cual no es posible con fluoresceína debido a que no cruza la membrana celular (22). Sin embargo, la acriflavina es tóxica para las mucosas por lo que Yoshio Naya et al. (32) comprobaron que con el uso de acrinol (un compuesto más seguro) también se apreciaban los núcleos celulares de lesiones neoplásicas vesicales durante su resección transuretral.

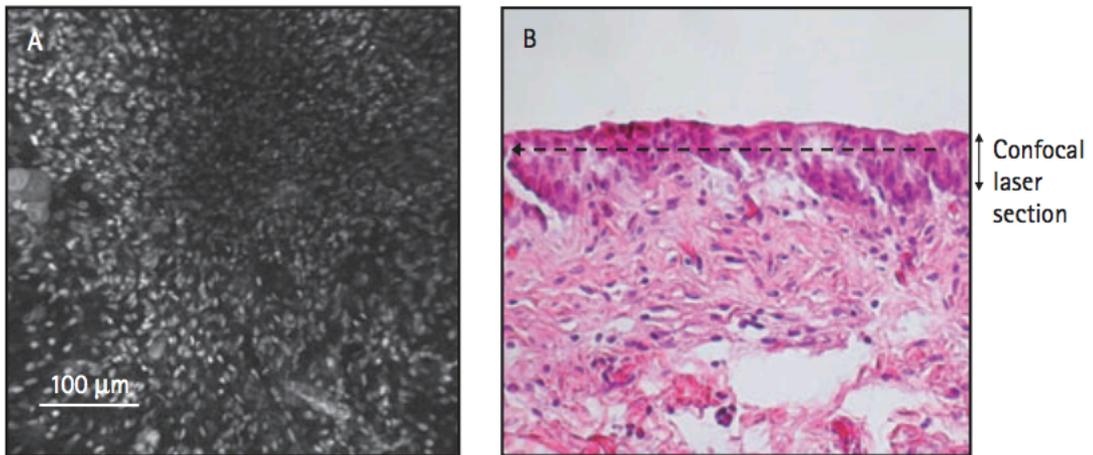


Imagen 12. Extraída de Wiesner C et al. (24): epitelio sano en el que se aprecian núcleos y células organizadas, no se hallan vasos sanguíneos.

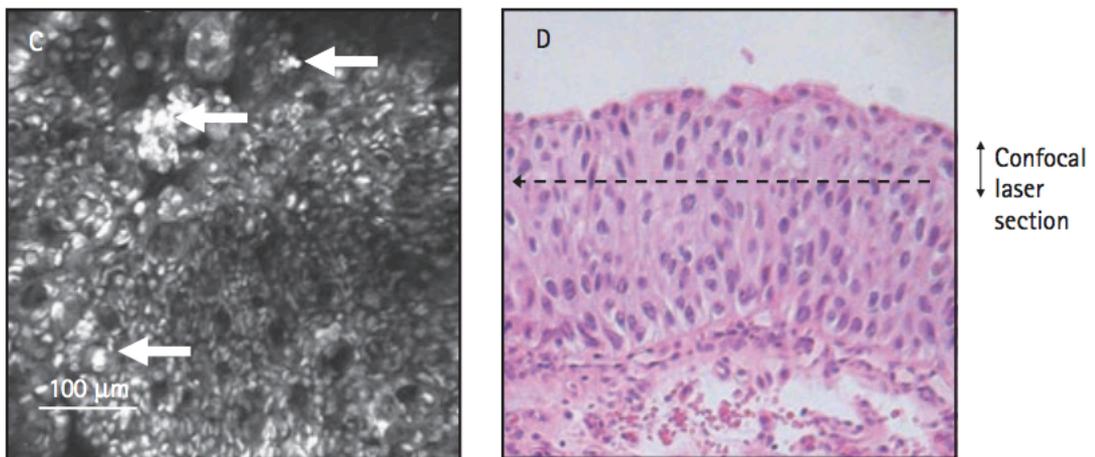


Imagen 13. Extraída de Wiesner C et al. (24): carcinoma urotelial de bajo grado con núcleos de tamaño irregular (flechas).

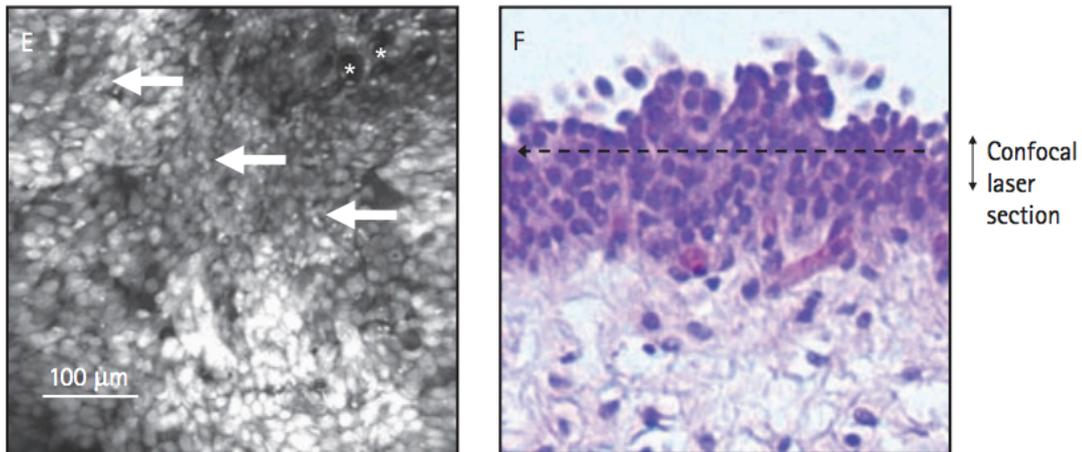


Imagen 14. Extraída de Wiesner C et al. (24): carcinoma urotelial de alto grado con núcleos aumentados de tamaño así como el ratio núcleo/citoplasma, además de neoangiogénesis (asteriscos).

En base a las características observadas con CLE, Chang et al. (28) propusieron unos criterios diagnósticos para determinar el grado de carcinoma urotelial que les permitieron, a su vez, estudiar la concordancia interobservador con urólogos con experiencia en CLE, urólogos principiantes en su uso, patólogos e investigadores no sanitarios concluyendo que, tras un entrenamiento interactivo de dos horas, los urólogos principiantes presentaban una concordancia moderada para diagnosticar neoplasias vesicales con los que tenían experiencia; estos últimos demostraron una mayor tasa de éxito en el diagnóstico que los patólogos, y comparativamente, mejor diagnóstico que con el uso únicamente de cistoscopia de luz blanca. Dichos criterios se basan en seis características clave (lesión plana o papilar, organización, vascularización, morfología, cohesión y márgenes celulares) y se recogieron en la siguiente tabla basándose en la clasificación de tumores vesicales de la OMS de 2014 (11,23,28,30,36):

		Normal	Lesiones benignas		Cáncer		
			Papiloma	Inflamatoria	Bajo grado	Alto grado	
						Papilar	CIS
Arquitectura	Plana vs papilar	Plana	Papilar	Plana	Papilar	Papilar	Plana
	Organización	Organizada	Organizada, grosor normal	Células sueltas en lámina propia	Organizada, grosor aumentado	Desorganizada	Desorganizada
Características vasculares		Red capilar en lámina propia	Pedúnculo fibrovascular	n/a	Pedúnculo fibrovascular	Vasos tortuosos en pedúnculo fibrovascular	n/a
Características celulares	Morfología	Monomórficas	Monomórficas	Pequeñas, monomórficas	Monomórficas	Pleomórficas	Pleomórficas
	Cohesión	Cohesivas	Cohesivas	Agrupaciones celulares	Cohesivas	No cohesivas	No cohesivas
	Márgenes	Diferenciados	Diferenciados	Diferenciados	Diferenciados	No diferenciados	No diferenciados

Traducida de Chang et al. (28).

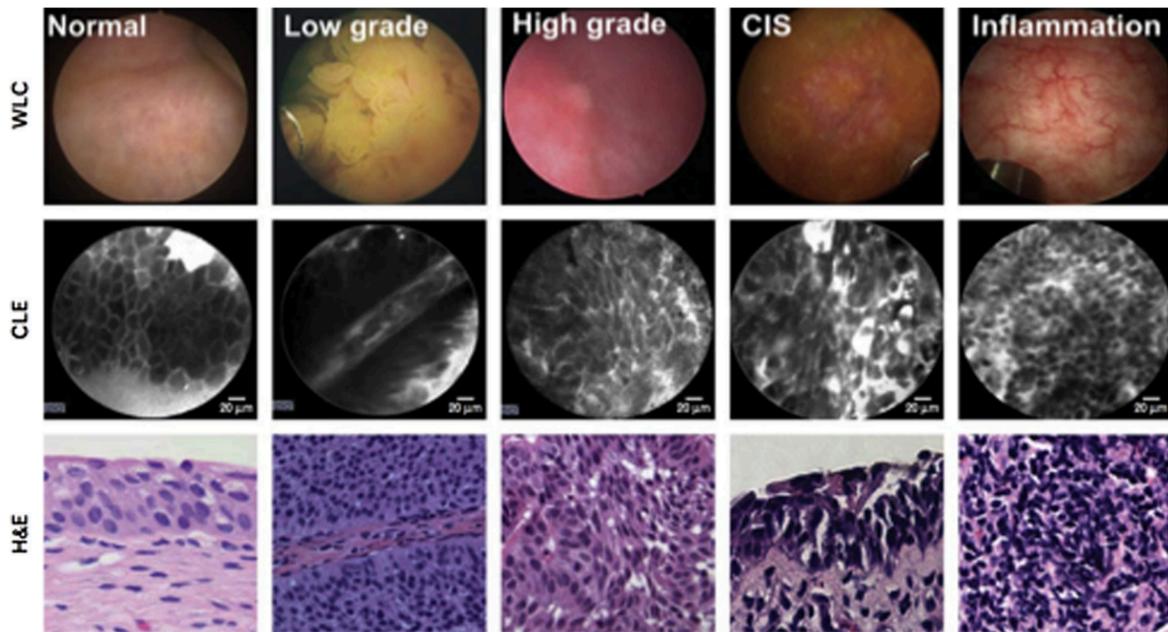


Imagen 15. Extraída de Zlatev DV et al. (26): comparación de la visualización de diferentes lesiones vesicales por medio de cistoscopia de luz blanca, CLE y tinción de hematoxilina y eosina.

Estos criterios fueron, posteriormente, validados y renovados por Liem et al. (29), quienes incorporaron el concepto de polaridad celular (que se refiere a la orientación de células y núcleos en la misma dirección) presente en el carcinoma urotelial de bajo grado (30) y establecieron las características de organización, morfología y márgenes celulares como las más discriminativas, pudiendo ser incluso suficientes, para establecer el grado de diferenciación.

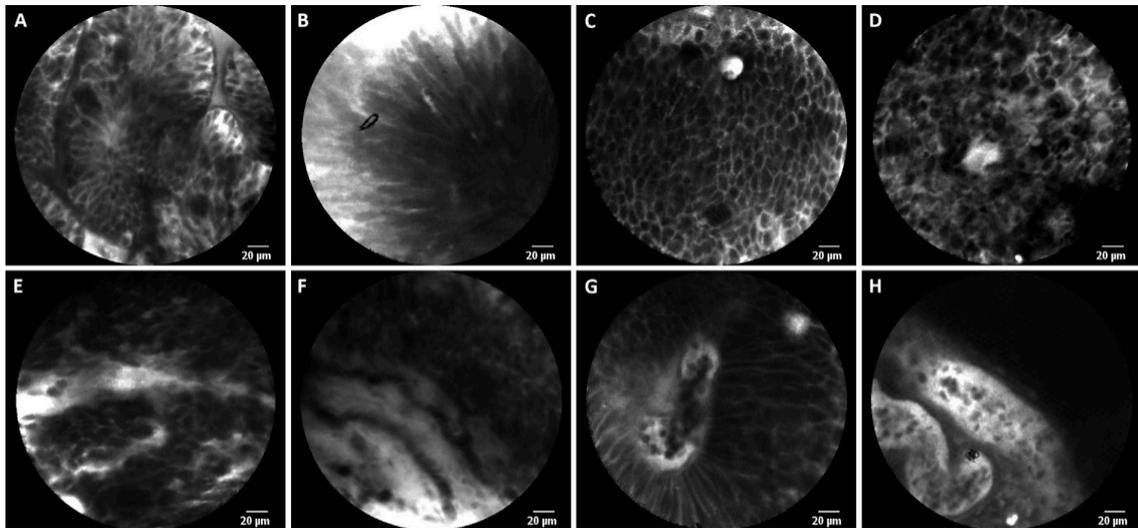


Imagen 16. Características incluidas en los criterios por Liem et al. (29): configuración papilar (a), polaridad celular (b), células monomórficas cohesivas y organizadas con bordes celulares distinguibles (c), patrón desorganizado con pleomorfismo celular (d), patrón desorganizado no cohesivo con pleomorfismo celular red capilar (f), núcleo fibrovascular (g), vaso grande (h).

La CLE puede presentar, a su vez, un efecto terapéutico tras RTU que ha sido estudiado por Lee J et al. (23) en tumores uroteliales de alto grado en estadio T1, obteniendo una menor tasa de recurrencia en pacientes en los que se realizó CLE frente a los que no, debido a su mayor exactitud para detectar neoplasias de alto grado, hecho que conlleva mayor precisión para llevar a cabo una resección profunda con mejor control oncológico. De esta forma, se mejoran los resultados quirúrgicos y se prolonga el periodo de preservación de la vejiga. Además de reducir la tasa de recurrencia, su uso en RTU, podría permitir confirmar la radicalidad de la intervención y mejorar la calidad del seguimiento en pacientes con cáncer vesical no músculo invasivo (11,23).

Además del carcinoma urotelial, se ha estudiado en otras lesiones como el leiomioma vesical, tumor mesenquimal benigno, que a la observación con CLE presenta aglomeraciones de células gris oscuro fusiformes y homogéneas con bordes bien definidos (30).

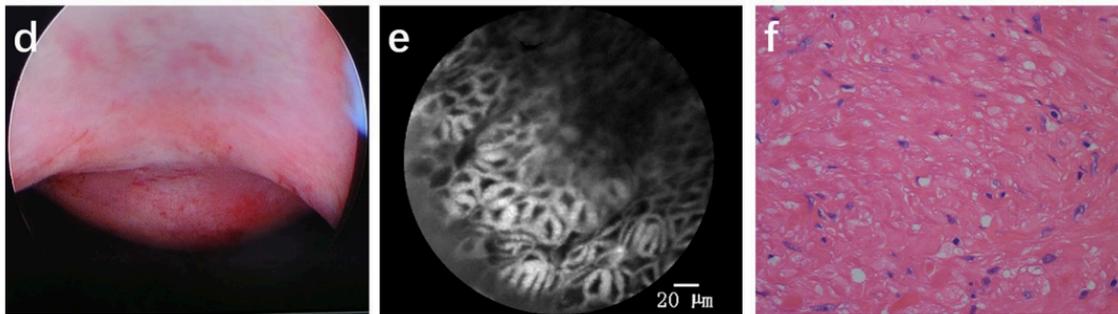


Imagen 17. Extraída de Wu J et al. (30): visualización de leiomioma en cistoscopia, CLE y tinción de hematoxilina eosina.

A pesar de todas sus ventajas, la CLE sigue siendo una técnica cara, lo cual puede limitar su aplicación. Es por ello que Tang Y et al. (33) estudian el uso de un nuevo y más asequible microendoscopio confocal de alta resolución (el confocal HRME) con tinción de proflavina; éste se diferencia de CLE, que al no ser una técnica basada en escaneo láser sino en iluminación LED con un proyector de luz programado digitalmente, se obtienen también imágenes en tiempo real de las características subcelulares del urotelio vesical, con un coste menor.

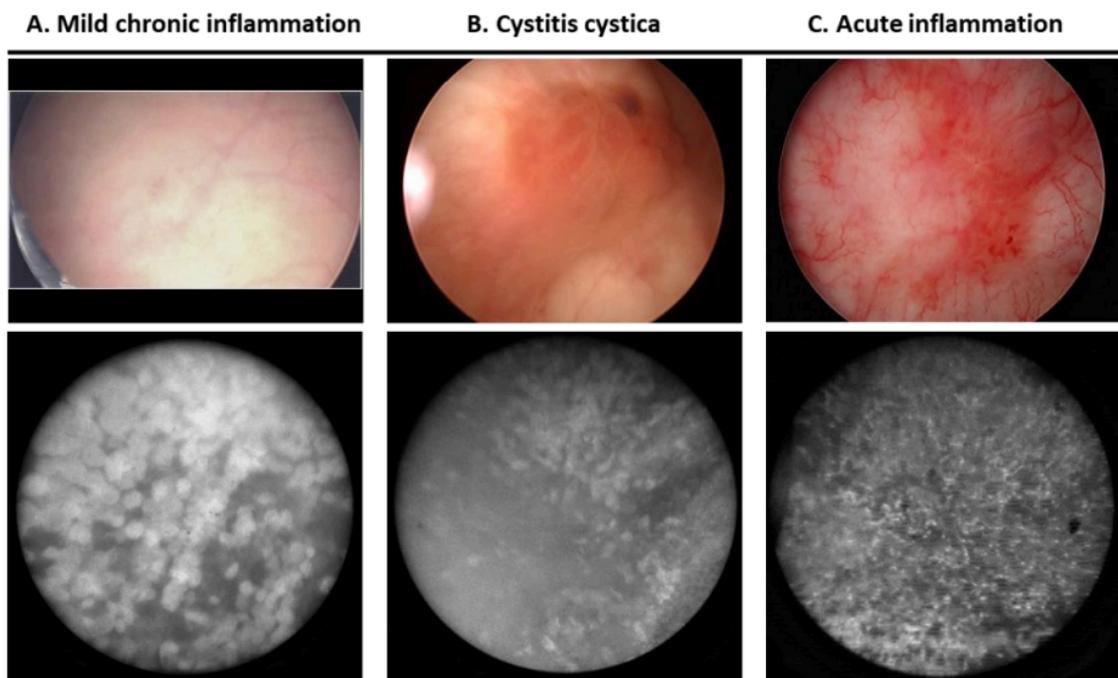


Imagen 18. Extraída de Tang Y et al. (33): visualización de lesiones benignas con HRME (fila inferior) en comparación con cistoscopia de luz blanca (fila superior).

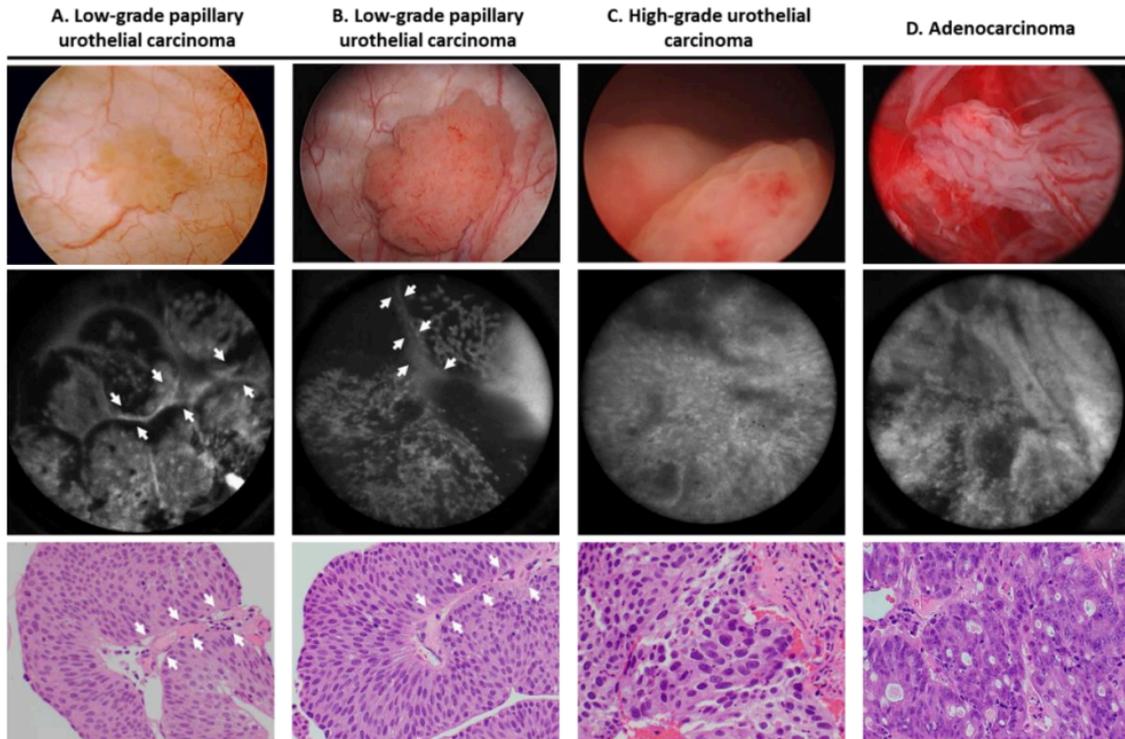


Imagen 19. Extraída de Tang Y et al. (33): imágenes de lesiones tumorales vesicales obtenidas con HRME (segunda fila) y comparadas con la cistoscopia de luz blanca (primera fila) y su corte histológico (tercera fila). Las flechas señalan agrupaciones nucleares confinadas por tallos fibrovasculares.

Aunque presente una alta concordancia con la histopatología, el estudio de las lesiones por CLE actual no deja de ser subjetivo y dependiente del observador. La factibilidad de una diferenciación tumoral automatizada ha sido estudiada por Lucas M et al. (34) por medio de un método de clasificación asistido por ordenador obteniendo buenos resultados en la distinción de lesiones benignas o malignas, así como lesiones papilares de alto y bajo grado.

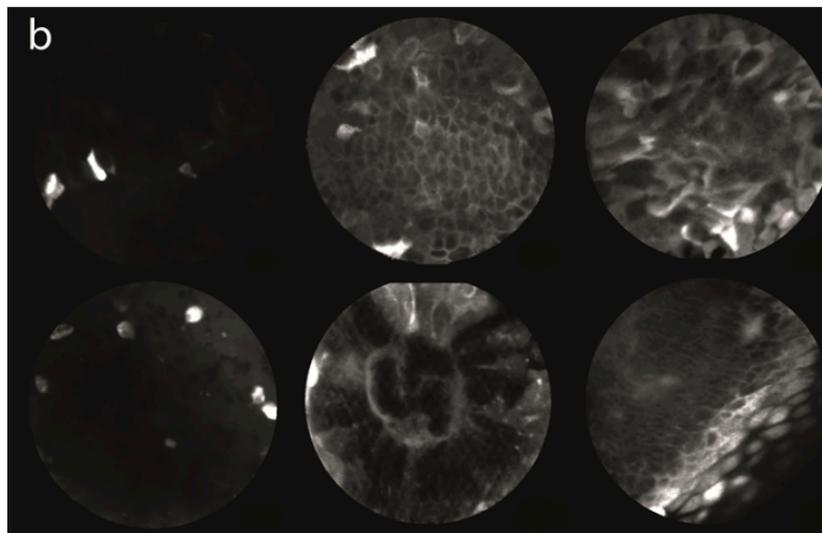


Imagen 20. Extraída de Lucas M et al. (34): se presentan imágenes obtenidas por CLE de las cuales las de la izquierda no contienen mucosa vesical por lo que se consideraron no informativas por el sistema a diferencia de las otras cuatro.

Otras limitaciones a nivel del uso vesical de la CLE son la visualización de un campo pequeño con penetración limitada (20), la necesidad de establecer un contacto perpendicular con el tejido a estudiar con el uso de cistoscopio rígido (22,31), lo cual puede resultar imposible en lesiones situadas en la pared vesical anterior (hecho que podría solucionarse por medio del uso de sondas de 1,4mm que caben en el cistoscopio flexible), y la dificultad para diferenciar lesiones inflamatorias de carcinoma in situ (CIS) lo que condiciona falsos positivos para malignidad (30,31).

En un futuro, la CLE podría utilizarse para determinar el grado de las lesiones previo a ablación con láser para realizar esta técnica con seguridad sobre tumores de bajo grado, reduciendo los costes y el tiempo de espera para la cirugía. Además de aplicarse tras RTU para determinar su radicalidad o la presencia de músculo detrusor en el tejido resecado, así como realizar vigilancia activa en pacientes con neoplasias de bajo riesgo en que no se estime realizar cirugía (29). Por tanto, perfeccionaría el estadiaje y control oncológico de la enfermedad tumoral en vejiga, pudiendo mejorar el pronóstico de la enfermedad.

A nivel del tracto urinario superior (TUS) la CLE también ha demostrado ser útil para obtener información histopatológica en tiempo real tanto del urotelio sano como patológico, permitiendo estudiar la superficie de las lesiones sospechosas

por medio de una sonda de 0.85mm (12,36,38,40,44). De forma que posibilita la identificación de características morfológicas celulares y arquitectura tanto del tejido normal, así como de los carcinomas uroteliales *in situ*, de alto y bajo grado que son histológicamente indistinguibles de los de vejiga (10,12,36,37,42). De esta manera, en tejido sano se observan células poligonales superficiales monomórficas de mayor tamaño que las células situadas más profundamente dispuestas de forma organizada, mientras en el carcinoma de bajo grado las células siguen apreciándose monomórficas y organizadas pero apiñadas en una estructura papilar alrededor de un núcleo fibrovascular. Esta organización se pierde en las neoplasias de alto grado en las que se hallan células pleomórficas sin cohesión y vasos sanguíneos distorsionados en los núcleos fibrovasculares. Este pleomorfismo celular así como la arquitectura desestructurada y la aglomeración celular se describe, a su vez, en el CIS, sin embargo no se observa un núcleo fibrovascular (12,39,41). De este modo se establece su utilidad no solo para determinar la existencia de tejido neoplásico si no también, el grado del mismo (44).

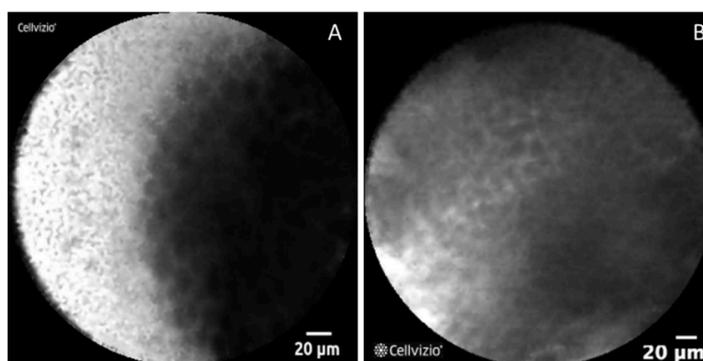


Imagen 21. Extraída de Villa L et al. (39): tejido sano, células paraguas (A) y células intermedias (B).

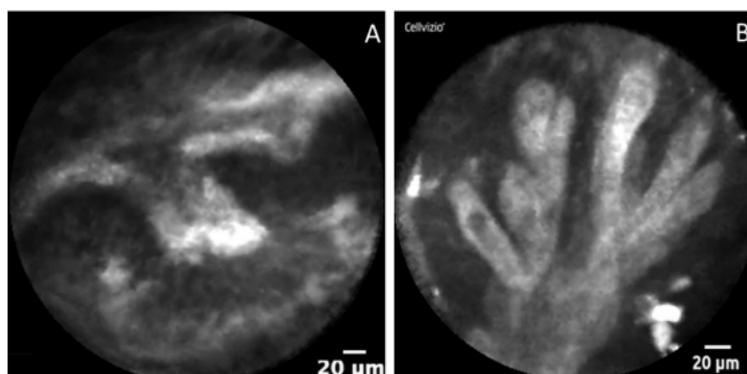


Imagen 22. Extraída de Villa L et al. (39): tumor urotelial de bajo grado.

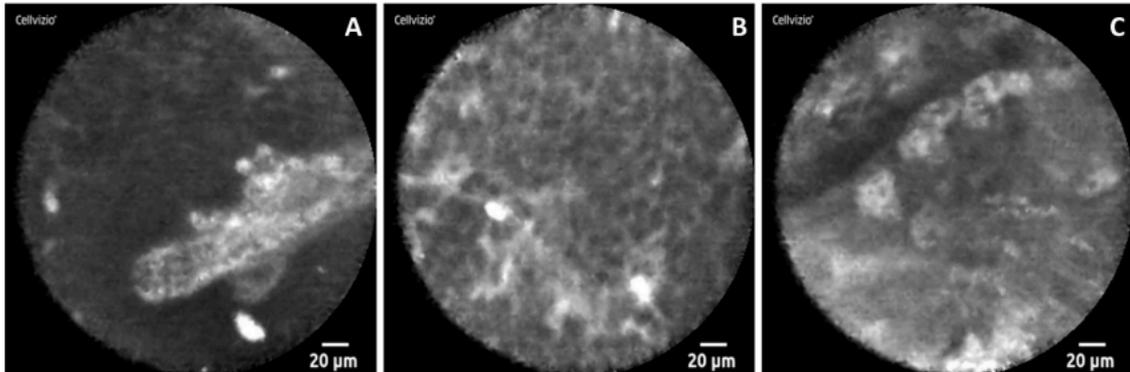


Imagen 23. Extraída de Villa L et al. (39): tumor urotelial de alto grado.

En base a estas características se propone la posibilidad de constituir unos criterios para el diagnóstico de carcinoma urotelial de vías urinarias altas siendo estos los mismos a los propuestos para el carcinoma vesical, confirmada su aplicabilidad para el TUS por Freund J et al (37); a pesar de que su apariencia difiere de la del vesical ,ya que está influida por el uso de una sonda menor con resolución reducida, un campo de visión más pequeño y una mayor profundidad del plano focal, de forma que no se pudieron incluir los criterios de márgenes y polaridad celular. A su vez, formulan una serie de sistemas de puntuación variando los criterios en que se basan, siendo el más sensible y específico aquel basado en la organización, morfología y cohesión celular para determinar el grado de las lesiones, asignando 3 puntos a las características de alto grado (37).

En vista de su potencial, varios estudios sugieren que supone una mejora en el manejo endoscópico del carcinoma urotelial del TUS ya que podría permitir tomar decisiones *in situ*, en el mismo tiempo quirúrgico en que se diagnostica, sobre el tipo de tratamiento a llevar a cabo: quirúrgico (nefroureterectomía, en tumores de alto grado) o conservador (ablación con láser, en tumores de bajo grado) (12,39,43).

A pesar de requerir un periodo de aprendizaje, coste elevado, artefactos por movimiento, profundidad de penetración que no permite determinar si existe invasión muscular, ni posibilita la detección de los subtipos histológicos así como, al igual que en la vejiga, presenta mayor dificultad para interpretar lesiones planas (12,42), con el tiempo, se habla de la posibilidad de que CLE sustituya las biopsias invasivas así como se utilice para evaluar la integridad del tratamiento conservador y en su seguimiento, para lo que la *European Association of Urology* ya la considera como una herramienta recomendada, posibilitando la detección de recurrencias tempranas (12,36,41,42).

En lo que respecta a la patología renal, actualmente, no existen estudios sobre el uso de CLE *in vivo* en litiasis renal ni patología tumoral. Sin embargo, se plantea su utilización para realizar biopsias ópticas de pequeñas masas renales sólidas, cuya detección incidental se encuentra en aumento, de forma que se puedan diferenciar aquellas que requieran un tratamiento agresivo de las que sean subsidiarias de vigilancia. Para ello Su L-M et al. (15) evalúan imágenes de tumores renales humanos *ex vivo* obtenidas por medio de CLE comparándolas con la histopatología estándar, concluyendo que permite diferenciar entre tejido tumoral y sano, así como distinguir los componentes de este último (túbulos, glomérulos, sistema colector), de forma que estas imágenes pueden constituir la línea de partida de investigaciones futuras. No obstante, el tejido peritumoral (como el parénquima normal, la grasa suprayacente o pseudocápsula) interfiere en la profundidad de la imagen dificultando la visualización de las características del tejido neoplásico.

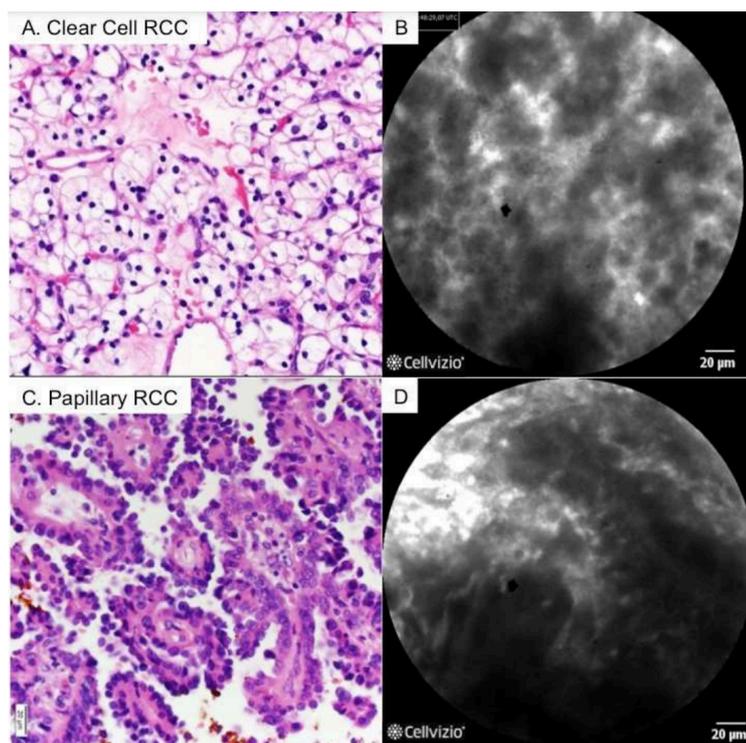


Imagen 24. Extraída de Su L-M et al. (15): imagen de carcinomas renales con CLE *ex vivo* comparadas con su corte histológico.

Tampoco se descarta su aplicación futura en patología no neoplásica ya que, a pesar de no hallarse información referenciada en la literatura *in vivo*, la

visualización de la microestructura renal *ex vivo* podría permitir el estudio de varias patologías nefrológicas y urológicas como, por ejemplo, la litiasis renal en la que podría permitir esclarecer mecanismos de formación no tan conocidos. Para el reconocimiento de las estructuras renales microscópicas la microscopía láser confocal se basa en la identificación de patrones del citoesqueleto de actina con un marcador fluorescente (45).

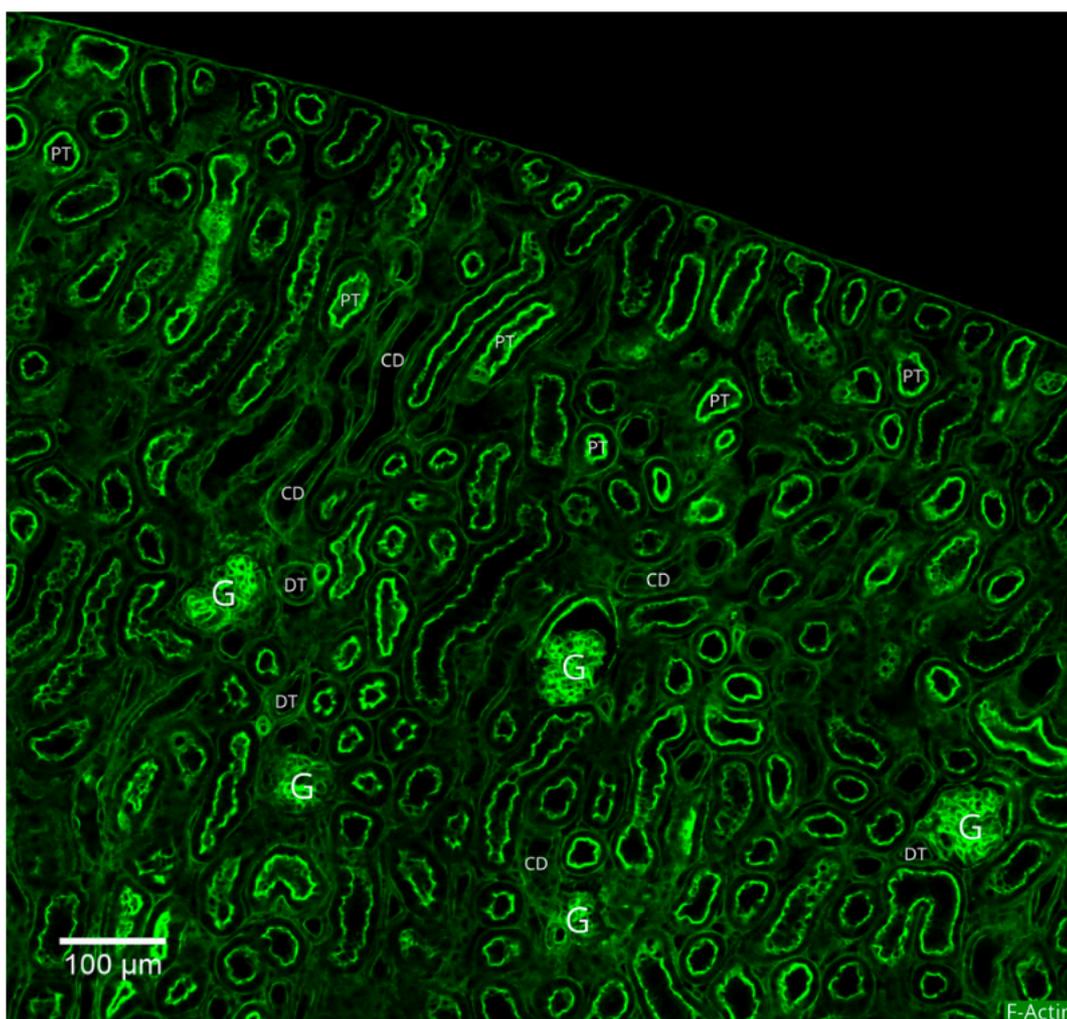


Imagen 25. Extraída de Kumaran GK et al. (45): visualización de los patrones de actina de la corteza renal por medio de microscopía láser confocal. G: glomerulos, PT: túbulos proximales, DT: túbulos distales, CD: conductos colectores.

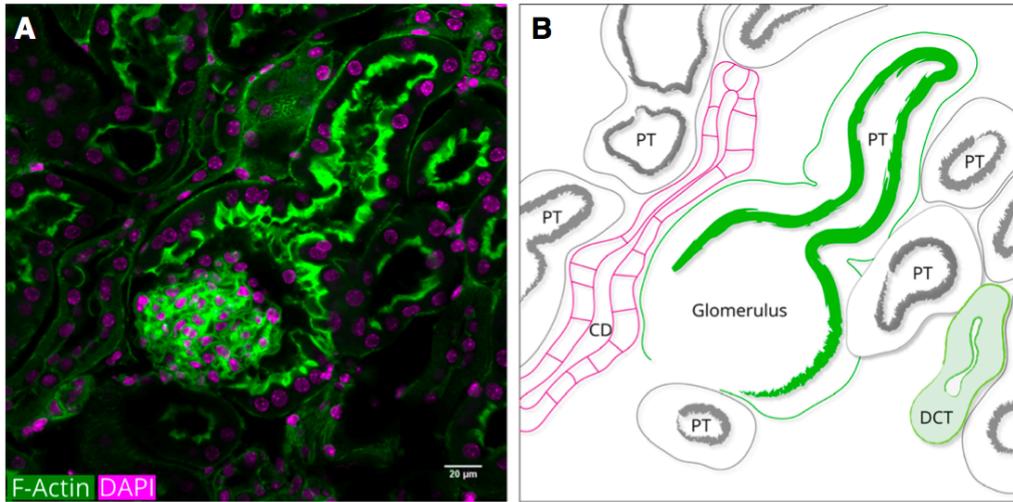


Imagen 26. Extraída de Kumaran GK et al. (45): visualización del citoesqueleto de un glomérulo, cápsula de Bowman, túbulos proximales, distal y conducto colector. Los núcleos celulares se hacen visibles por medio del marcador DAPI.

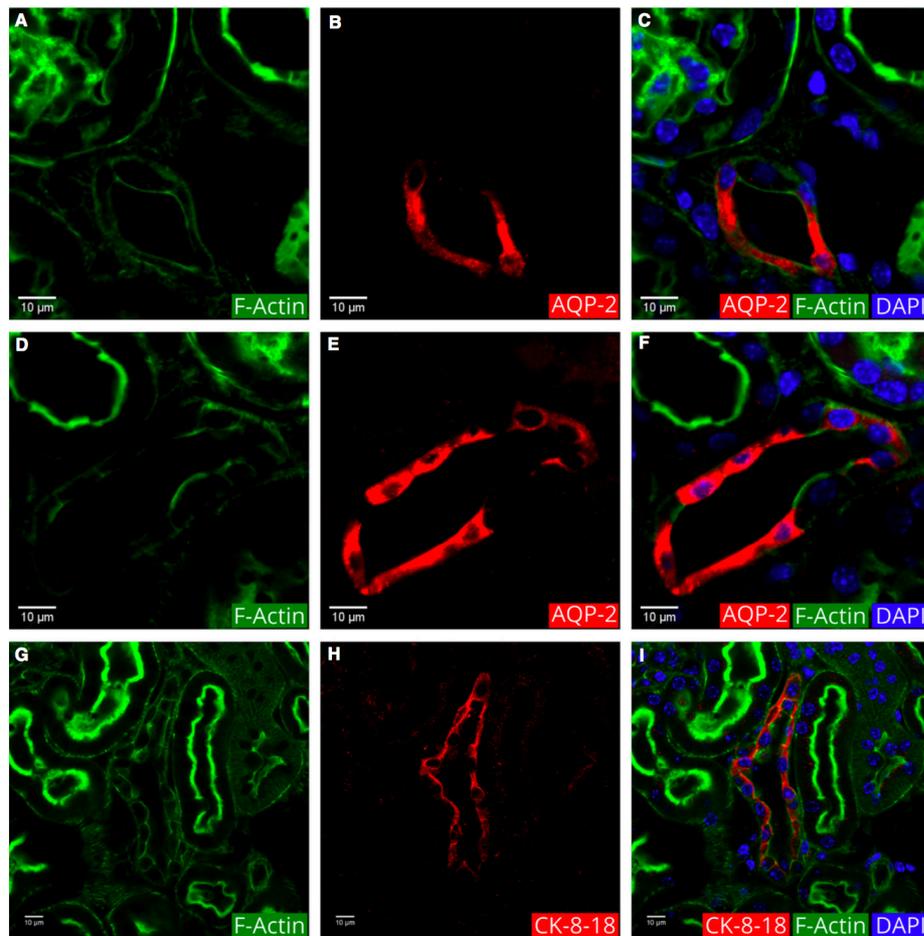


Imagen 27. Extraída de Kumaran GK et al. (45): visualización de conductos colectores por medio de distintos marcadores y fusión de imágenes (la tercera columna es una fusión de las anteriores).

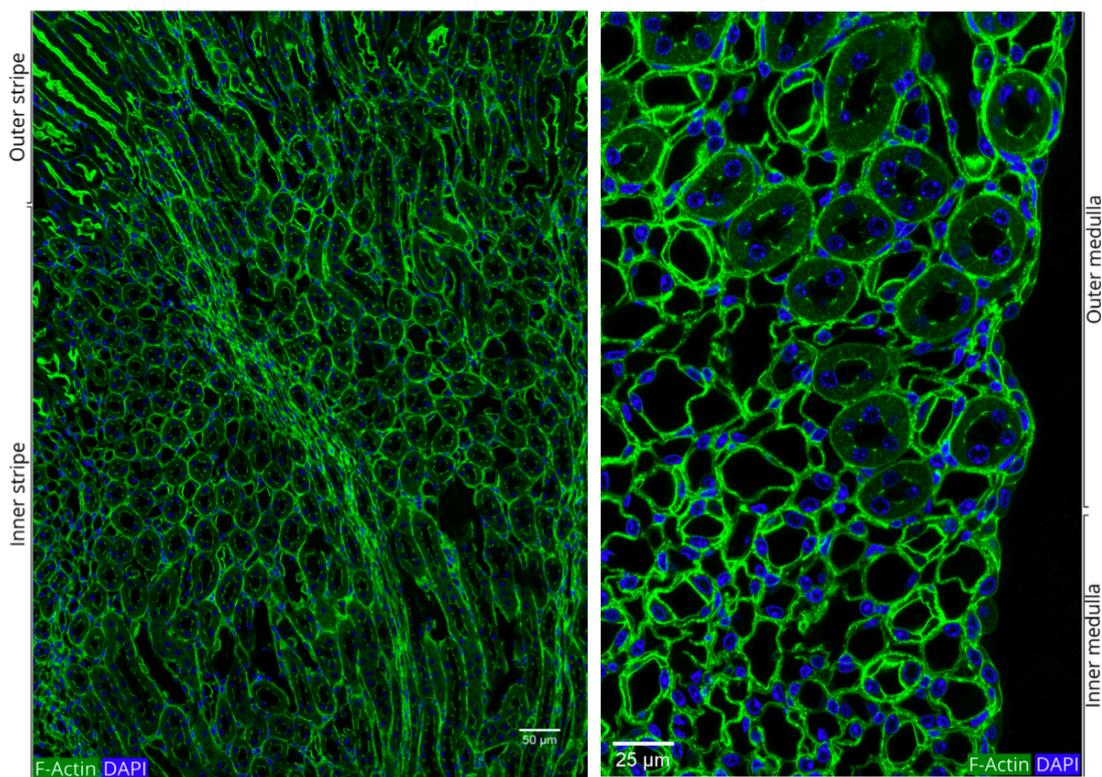


Imagen 28. Extraída de Kumaran GK et al. (45): identificación de la transición entre las zonas interna y externa de la médula renal.

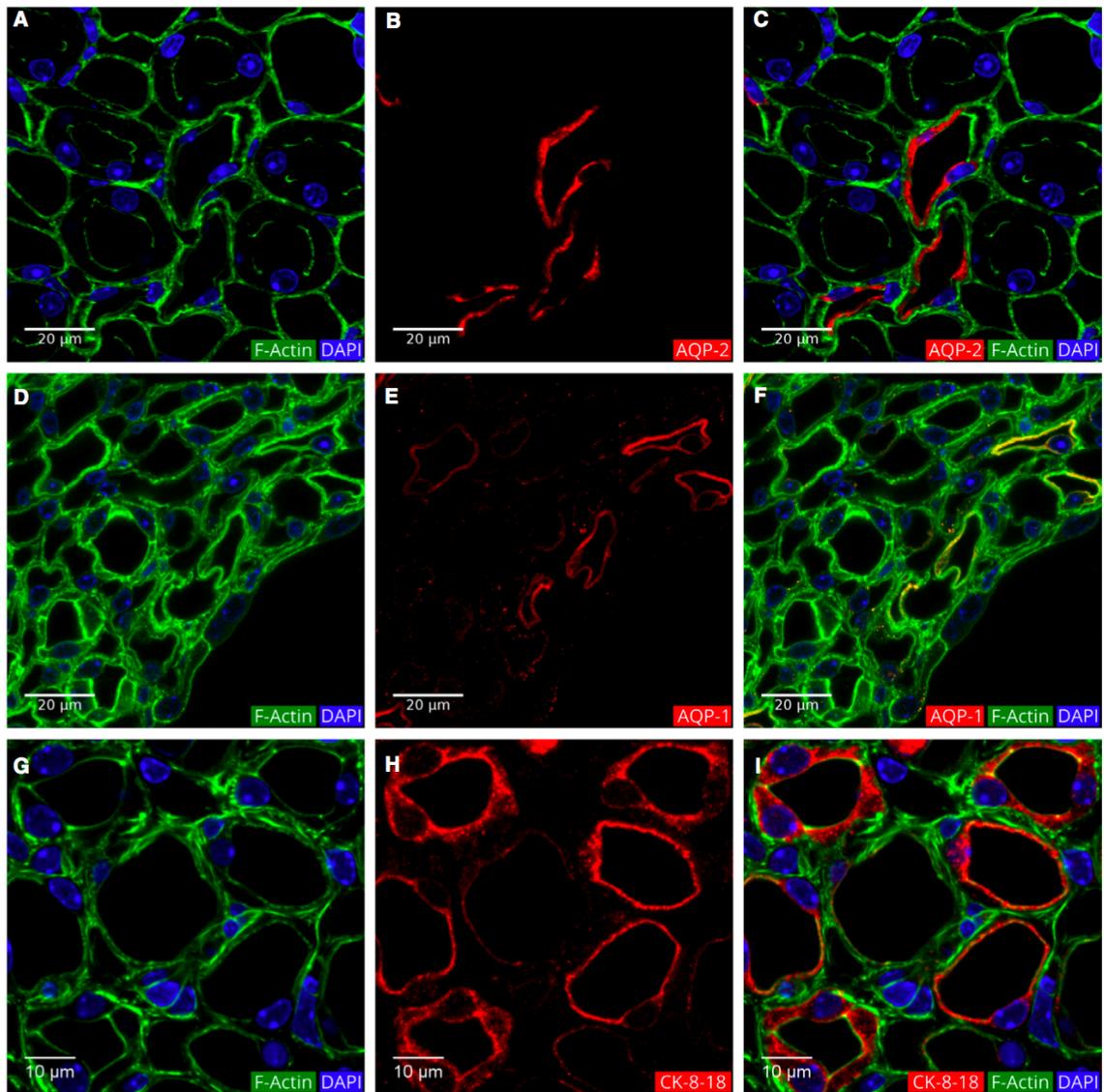


Imagen 29. Extraída de Kumaran GK et al. (45): visualización de conductos colectores y segmentos finos del asa de Henle en la médula.

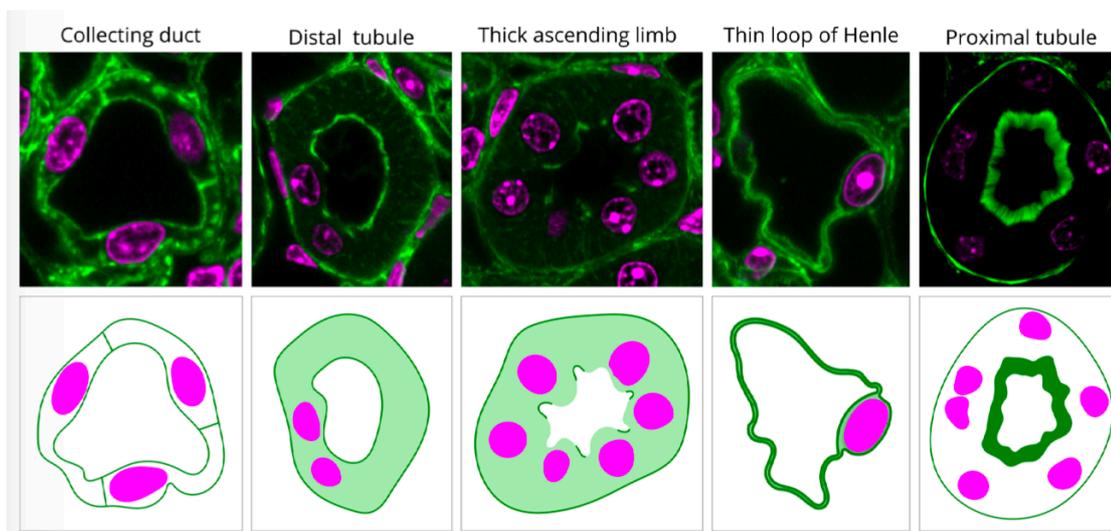


Imagen 30. Extraída de Kumaran GK et al. (45): secciones de los diferentes túbulos.

6. Conclusión

La CLE es una técnica que permite, por medio de varias sondas y administración de fluoresceína endovenosa (o intravesical en el caso de la urología), aplicar la tecnología de la microscopía láser confocal en la endoscopia *in vivo* siendo ya ampliamente utilizada en otras áreas como digestivo y pudiendo presentar múltiples aplicaciones clínicas en urología que se encuentran, actualmente, en estudio.

En próstata se ha constatado su uso eficaz y seguro en el estudio de márgenes quirúrgicos y de conservación del paquete vasculonervioso en las prostatectomías radicales asistidas por robot gracias a su capacidad para discernir tejidos prostáticos y periprostáticos además de sanos y patológicos. Así mismo se plantea la posibilidad de estudiar mejoras en este método, como la incorporación de marcadores moleculares o estimuladores nerviosos, y nuevos usos, como en la biopsia por medio de la CLE a través de agujas, de cara a un futuro.

A nivel vesical se ha estudiado su uso principalmente en carcinoma vesical para el que se han propuesto un conjunto de criterios que permiten diagnosticar y determinar el grado de la lesión con lo que se puede orientar el manejo terapéutico y reducir las recurrencias. A su vez, ha demostrado su utilidad en la detección de huevos de esquistosoma, así como de las características del leiomioma y del lecho quirúrgico tras RTU pudiendo confirmar su radicalidad. De igual modo, se están llevando a cabo investigaciones para mejorar su uso

por medio de otros contrastes como acrinol, métodos de clasificación automatizada asistida por ordenador, sondas de menor calibre y modalidades más asequibles económicamente.

Debido a su similitud histopatológica los criterios para el diagnóstico y gradación de los tumores uroteliales vesicales se aplican también en TUS con alguna modificación para tener en cuenta la utilización de una sonda de menor calibre. Por medio de esta se ha constatado la capacidad de CLE para identificar y determinar el grado del carcinoma urotelial en TUS y se propone su uso para el diagnóstico y decisión de un manejo conservador o no en un mismo tiempo quirúrgico, así como en el seguimiento del mismo.

A pesar de no hallarse literatura sobre la aplicación de CLE *in vivo* en patología renal se plantea su posible utilidad futura en el diagnóstico de masas renales sólidas. A su vez, la descripción reciente que se ha conseguido *ex vivo* en la microestructura renal abre un campo interesante al estudio de otras patologías nefrológicas y urológicas no tumorales, como la litiasis renal. Su aplicación *in vivo* podría aclarar mecanismos de formación no bien conocidos de forma mucho menos invasiva, que podrían ayudar a su prevención.

Sin embargo, sigue siendo una técnica con limitaciones debido a su elevado coste, la subjetividad de su interpretación, su profundidad que no permite identificar invasión tumoral de la muscular y la dificultad para diferenciar entre lesiones planas, entre otras, en los que se puede investigar para reducirlos y convertirla en una técnica más factible y asequible.

7. Bibliografía

1. Elliott AD. Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices. *Curr Protoc Cytom.* 2020;92(1): e69.
2. Nwaneshiudu A, Kuschal C, Sakamoto FH, Rox Anderson R, Schwarzenberger K, Young RC. Introduction to Confocal Microscopy. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2012 Dec;132(12):1–5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15355536>
3. López-Macay, A., Fernández-Torres, J., & Zepeda A. Principios y aplicaciones de la microscopia láser confocal en la investigación biomédica. *Investig en Discapac.* 2016;5(3):156–64.
4. Bayguinov PO, Oakley DM, Shih C-C, Geanon DJ, Joens MS, Fitzpatrick JAJ. Modern Laser Scanning Confocal Microscopy. *Curr Protoc Cytom* [Internet]. 2018 Jul;85(1):e39. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cpcy.39>
5. Castellano-Muñoz M, Peng AW, Salles FT, Ricci AJ. Swept field laser

- confocal microscopy for enhanced spatial and temporal resolution in live-cell imaging. *Microsc Microanal* [Internet]. 2012 Aug;18(4):753–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22831554>
6. Erie JC, McLaren JW, Patel S V. Confocal Microscopy in Ophthalmology. *Am J Ophthalmol* [Internet]. 2009 Nov;148(5):639–46. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002939409004577>
 7. Matsumoto Y, Ibrahim OMA. Application of In Vivo Confocal Microscopy in Dry Eye Disease. *Investig Ophthalmology Vis Sci* [Internet]. 2018 Nov 27;59(14):DES41. Available from: <http://iovs.arvojournals.org/article.aspx?doi=10.1167/iovs.17-23602>
 8. Ulrich M, Lange-Asschenfeldt S. In vivo confocal microscopy in dermatology: from research to clinical application. *J Biomed Opt* [Internet]. 2013 Jan 21;18(6):061212. Available from: <http://biomedicaloptics.spiedigitallibrary.org/article.aspx?doi=10.1117/1.JBO.18.6.061212>
 9. Al-Mansour MR, Caycedo-Marulanda A, Davis BR, Alawashez A, Docimo S, Qureshi A, et al. SAGES TAVAC safety and efficacy analysis confocal laser endomicroscopy. *Surg Endosc* [Internet]. 2021 May 13;35(5):2091–103. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s00464-020-07607-3>
 10. Brunckhorst O, Ong QJ, Elson D, Mayer E. Novel real-time optical imaging modalities for the detection of neoplastic lesions in urology: a systematic review. *Surg Endosc* [Internet]. 2019 May 12;33(5):1349–67. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00464-018-6578-1>
 11. Wu J, Wang Y-C, Luo W-J, Dai B, Ye D-W, Zhu Y-P. Diagnostic Performance of Confocal Laser Endomicroscopy for the Detection of Bladder Cancer: Systematic Review and Meta-Analysis. *Urol Int* [Internet]. 2020;104(7–8):523–32. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/508417>
 12. Balaña J, Territo A, Gallioli A, Sanguedolce F, Subiela JD, Mercadé A, et al. [Confocal laser endomicroscopy for the treatment of upper urinary tract transitional cellcarcinoma.]. *Arch Esp Urol* [Internet]. 2019 Oct;72(8):765–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31579035>
 13. Phung MC, Rouse AR, Pangilinan J, Bell RC, Bracamonte ER, Mashi S, et al. Investigation of confocal microscopy for differentiation of renal cell carcinoma versus benign tissue. Can an optical biopsy be performed? *Asian J Urol* [Internet]. 2020 Oct;7(4):363–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214388219301249>
 14. Rocco B, Cimadamore A, Sarchi L, Bonetti LR, Bertoni L, Azzoni P, et al. Current and future perspectives of digital microscopy with fluorescence

- confocal microscope for prostate tissue interpretation: a narrative review. *Transl Androl Urol* [Internet]. 2021 Mar;10(3):1569–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33850791>
15. Su L-M, Kuo J, Allan RW, Liao JC, Ritari KL, Tomeny PE, et al. Fiber-Optic Confocal Laser Endomicroscopy of Small Renal Masses: Toward Real-Time Optical Diagnostic Biopsy. *J Urol* [Internet]. 2016 Feb;195(2):486–92. Available from: <http://www.jurology.com/doi/10.1016/j.juro.2015.07.115>
 16. Lopez A, Zlatev D V., Mach KE, Bui D, Liu J-J, Rouse R V., et al. Intraoperative Optical Biopsy during Robotic Assisted Radical Prostatectomy Using Confocal Endomicroscopy. *J Urol* [Internet]. 2016 Apr;195(4 Part 1):1110–7. Available from: <http://www.jurology.com/doi/10.1016/j.juro.2015.10.182>
 17. van Riel LAMJG, Swaan A, Mannaerts CK, van Kollenburg RAA, Savci Heijink CD, de Reijke TM, et al. Image-guided in-Vivo Needle-Based Confocal Laser Endomicroscopy in the Prostate: Safety and Feasibility Study in 2 Patients. *Technol Cancer Res Treat* [Internet]. 2022 Jan 5;21:153303382210931. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/15330338221093149>
 18. Panarello D, Comp erat E, Seyde O, Colau A, Terrone C, Guillonneau B. Atlas of Ex Vivo Prostate Tissue and Cancer Images Using Confocal Laser Endomicroscopy: A Project for Intraoperative Positive Surgical Margin Detection During Radical Prostatectomy. *Eur Urol Focus* [Internet]. 2020 Sep;6(5):941–58. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405456919300045>
 19. Eissa A, Zoeir A, Sighinolfi MC, Puliatti S, Bevilacqua L, Del Prete C, et al. “Real-time” Assessment of Surgical Margins During Radical Prostatectomy: State-of-the-Art. *Clin Genitourin Cancer* [Internet]. 2020 Apr;18(2):95–104. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1558767319302289>
 20. Lerner SP, Goh A. Novel endoscopic diagnosis for bladder cancer. *Cancer* [Internet]. 2015 Jan 15;121(2):169–78. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cncr.28905>
 21. Fritzsche C, Stachs O, Holtfreter MC, Nohr-Łuczak C, Guthoff RF, Reisinger EC. Confocal Laser Scanning Microscopy, a New In Vivo Diagnostic Tool for Schistosomiasis. Mulvenna J, editor. *PLoS One* [Internet]. 2012 Apr 17;7(4):e34869. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0034869>
 22. Sonn GA, Jones S-NE, Tarin T V., Du CB, Mach KE, Jensen KC, et al. Optical Biopsy of Human Bladder Neoplasia With In Vivo Confocal Laser Endomicroscopy. *J Urol* [Internet]. 2009 Oct;182(4):1299–305. Available

- from: <http://www.jurology.com/doi/10.1016/j.juro.2009.06.039>
23. Lee J, Jeh SU, Koh DH, Chung DY, Kim MS, Goh HJ, et al. Probe-Based Confocal Laser Endomicroscopy During Transurethral Resection of Bladder Tumors Improves the Diagnostic Accuracy and Therapeutic Efficacy. *Ann Surg Oncol* [Internet]. 2019 Apr 4;26(4):1158–65. Available from: <http://link.springer.com/10.1245/s10434-019-07200-6>
 24. Wiesner C, Jäger W, Salzer A, Biesterfeld S, Kiesslich R, Hampel C, et al. Confocal laser endomicroscopy for the diagnosis of urothelial bladder neoplasia: a technology of the future? *BJU Int* [Internet]. 2011 Feb;107(3):399–403. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1464-410X.2010.09540.x>
 25. Rundstedt F-C von, Lerner SP. New imaging techniques for nonmuscle invasive bladder cancer. *Curr Opin Urol* [Internet]. 2014 Sep;24(5):532–9. Available from: <https://journals.lww.com/00042307-201409000-00018>
 26. Zlatev D V., Altobelli E, Liao JC. Advances in Imaging Technologies in the Evaluation of High-Grade Bladder Cancer. *Urol Clin North Am* [Internet]. 2015 May;42(2):147–57. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0094014315000026>
 27. Raharja PAR, Hamid ARAH, Mochtar CA, Umbas R. Recent advances in optical imaging technologies for the detection of bladder cancer. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. 2018 Dec;24:192–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S157210001830070X>
 28. Chang TC, Liu J-J, Hsiao ST, Pan Y, Mach KE, Leppert JT, et al. Interobserver Agreement of Confocal Laser Endomicroscopy for Bladder Cancer. *J Endourol* [Internet]. 2013 May;27(5):598–603. Available from: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/end.2012.0549>
 29. Liem EIML, Freund JE, Savci-Heijink CD, de la Rosette JJMCH, Kamphuis GM, Baard J, et al. Validation of Confocal Laser Endomicroscopy Features of Bladder Cancer: The Next Step Towards Real-time Histologic Grading. *Eur Urol Focus* [Internet]. 2020 Jan;6(1):81–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405456918301780>
 30. Wu J, Wang Y-C, Dai B, Ye D-W, Zhu Y-P. Optical biopsy of bladder cancer using confocal laser endomicroscopy. *Int Urol Nephrol* [Internet]. 2019 Sep 13;51(9):1473–9. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11255-019-02197-z>
 31. Liu J-J, Droller MJ, Liao JC. New Optical Imaging Technologies for Bladder Cancer: Considerations and Perspectives. *J Urol* [Internet]. 2012 Aug;188(2):361–8. Available from: <http://www.jurology.com/doi/10.1016/j.juro.2012.03.127>

32. Naya Y, Takaha N, Hayashi I, Mori M, Date S, Ukimura O. Preliminary study of the safety of acrinol in probe-based confocal laser endomicroscopy during transurethral resection of bladder tumors. *Asian J Endosc Surg* [Internet]. 2023 Jan 2;16(1):143–6. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ases.13103>
33. Tang Y, Kortum A, Vohra I, Schwarz RA, Carns J, Kannady CR, et al. Initial Results of First In Vivo Imaging of Bladder Lesions Using a High-Resolution Confocal Microendoscope. *J Endourol* [Internet]. 2021 Aug 1;35(8):1190–7. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/end.2020.0757>
34. Lucas M, Liem EIML, Savci-Heijink CD, Freund JE, Marquering HA, van Leeuwen TG, et al. Toward Automated In Vivo Bladder Tumor Stratification Using Confocal Laser Endomicroscopy. *J Endourol* [Internet]. 2019 Nov 1;33(11):930–7. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/end.2019.0354>
35. Adams W, Wu K, Liu J-J, Hsiao STT, Jensen KC, Liao JC. Comparison of 2.6- and 1.4-mm Imaging Probes for Confocal Laser Endomicroscopy of the Urinary Tract. *J Endourol* [Internet]. 2011 Jun;25(6):917–21. Available from: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/end.2010.0686>
36. Chen SP, Liao JC. Confocal Laser Endomicroscopy of Bladder and Upper Tract Urothelial Carcinoma: A New Era of Optical Diagnosis? *Curr Urol Rep* [Internet]. 2014 Sep 8;15(9):437. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11934-014-0437-y>
37. Freund JE, Liem EIML, Savci-Heijink CD, Baard J, Kamphuis GM, de la Rosette JJMCH, et al. Confocal laser endomicroscopy for upper tract urothelial carcinoma: validation of the proposed criteria and proposal of a scoring system for real-time tumor grading. *World J Urol* [Internet]. 2019 Oct;37(10):2155–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30684035>
38. Bus MTJ, de Bruin DM, Faber DJ, Kamphuis GM, Zondervan PJ, Laguna Pes MP, et al. Optical Diagnostics for Upper Urinary Tract Urothelial Cancer: Technology, Thresholds, and Clinical Applications. *J Endourol* [Internet]. 2015 Feb;29(2):113–23. Available from: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/end.2014.0551>
39. Villa L, Cloutier J, Cotè J-F, Salonia A, Montorsi F, Traxer O. Confocal Laser Endomicroscopy in the Management of Endoscopically Treated Upper Urinary Tract Transitional Cell Carcinoma: Preliminary Data. *J Endourol* [Internet]. 2016 Feb;30(2):237–42. Available from: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/end.2015.0644>
40. Territo A, Gallioli A, Meneghetti I, Fontana M, Huguet J, Palou J, et al. Diagnostic ureteroscopy for upper tract urothelial carcinoma: friend or foe?

- Arab J Urol [Internet]. 2021 Jan 2;19(1):46–58. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/2090598X.2021.1883810>
41. Bui D, Mach KE, Zlatev D V., Rouse R V., Leppert JT, Liao JC. A Pilot Study of In Vivo Confocal Laser Endomicroscopy of Upper Tract Urothelial Carcinoma. J Endourol [Internet]. 2015 Dec;29(12):1418–23. Available from: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/end.2015.0523>
 42. Baard J, Freund JE, de la Rosette JJMCH, Laguna MP. New technologies for upper tract urothelial carcinoma management. Curr Opin Urol [Internet]. 2017 Mar;27(2):170–5. Available from: <https://journals.lww.com/00042307-201703000-00014>
 43. Sanguedolce F, Fontana M, Turco M, Territo A, Lucena JB, Cortez JC, et al. Endoscopic Management of Upper Urinary Tract Urothelial Carcinoma: Oncologic Outcomes and Prognostic Factors in a Contemporary Cohort. J Endourol [Internet]. 2021 Nov 1;35(11):1593–600. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/end.2021.0133>
 44. Fojecki G, Magnusson A, Traxer O, Baard J, Osther PJS, Jaremko G, et al. Consultation on UTUC, Stockholm 2018 aspects of diagnosis of upper tract urothelial carcinoma. World J Urol [Internet]. 2019 Nov 26;37(11):2271–8. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00345-019-02732-8>
 45. Kumaran GK, Hanukoglu I. Identification and classification of epithelial cells in nephron segments by actin cytoskeleton patterns. FEBS J [Internet]. 2020 Mar;287(6):1176–94. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/febs.15088>