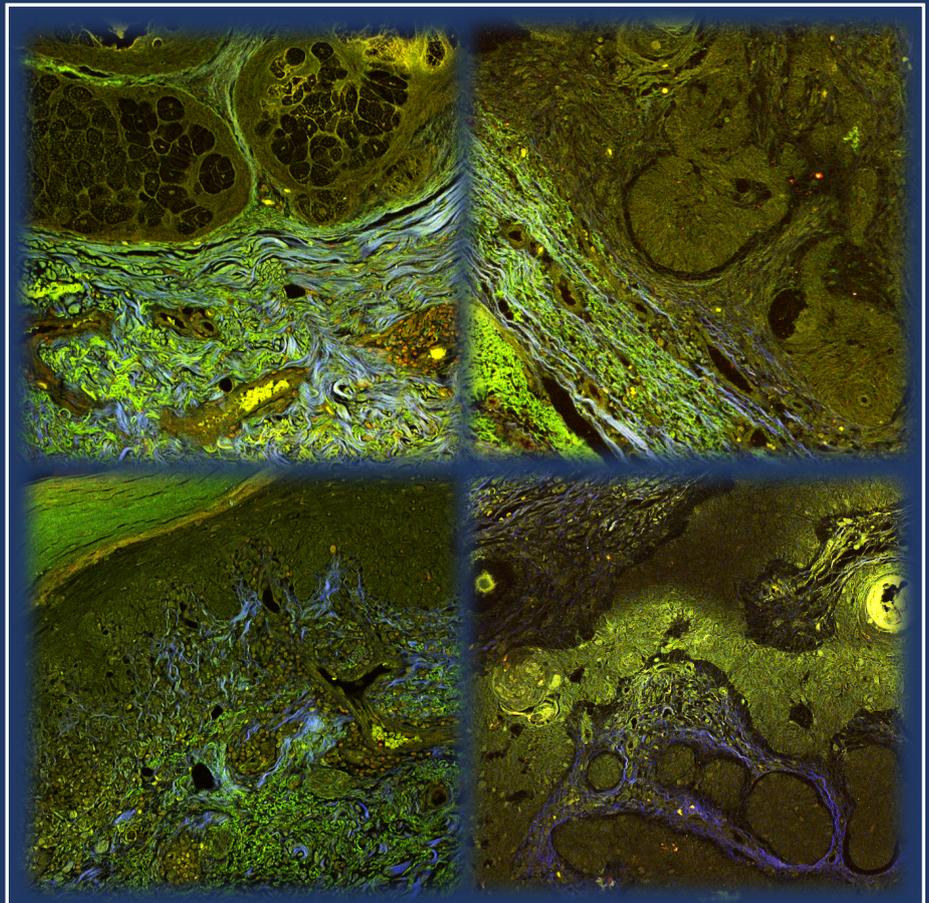




ANÁLISIS CUANTITATIVO DEL COLÁGENO PARA LA DETECCIÓN DEL CARCINOMA BASOCELULAR MEDIANTE MICROSCOPIA MULTIFOTÓN *EX VIVO*

TESIS DOCTORAL

M^a DE LAS MERCEDES SENDÍN MARTÍN



**Programa de doctorado en Biología Molecular, Biomedicina e
Investigación Clínica**



Tesis Doctoral:

**Análisis cuantitativo del colágeno para la detección del
carcinoma basocelular mediante microscopía multifotón *ex
vivo***

M^a de las Mercedes Sendín Martín

Directores:

Prof. Dr. Julián Conejo-Mir Sánchez

Prof. Dra. Manu Jain

Tutora:

Prof. Dra. M^a Elisa Cordero Matía

**Programa de doctorado en Biología Molecular, Biomedicina e Investigación
Clínica**



Tesis Doctoral

**Análisis cuantitativo del colágeno para la detección del carcinoma
basocelular mediante microscopía multifotón *ex vivo***

Doctoranda: **M^a de las Mercedes Sendín Martín**

Directores de tesis:

Prof. Dr. Julián Conejo-Mir Sánchez

Catedrático de Dermatología, Universidad de Sevilla

Director de la UGC de Dermatología, Hospital Universitario Virgen del Rocío

Prof. Dr. Manu Jain

Assistant Professor of Pathology Research, Weill Cornell Medicine (NY, USA)

Assistant Attending, Dermatology Department, Memorial Sloan Kettering Cancer Centre (NY,
USA)

Tutora:

Prof. Dra. M^a Elisa Cordero Matía

Profesora Titular Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla

Facultativo especialista en Medicina Interna, Hospital Universitario Virgen del Rocío

Sevilla, julio de 2022



El Prof. Dr. Julián Conejo-Mir Sánchez y la Prof. Dra. Manu Jain como directores, y la Prof. Dra. M^a Elisa Cordero Matía como tutora de la Tesis Doctoral.

CERTIFICAN:

Que la Tesis para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla titulada “**Análisis cuantitativo del colágeno para la detección del carcinoma basocelular mediante microscopía multifotón *ex vivo***” ha sido realizada por la graduada M^a de las Mercedes Sendín Martín bajo su supervisión, considerando que reúne los requisitos necesarios para su presentación.

Y para que conste a los efectos oportunos, expiden la presente certificación en Sevilla a 28 de julio de 2022.

Fdo.: Julián Conejo-Mir Sánchez
Director de la Tesis Doctoral

Fdo.: Manu Jain
Directora de la Tesis Doctoral

Fdo.: M^a Elisa Cordero Matía
Tutora de la Tesis Doctoral

AGRADECIMIENTOS

«Somos enanos encaramados a hombros de gigantes. De esta manera, vemos más y más lejos que ellos, no porque nuestra vista sea más aguda sino porque ellos nos sostienen en el aire y nos elevan con toda su altura gigantesca»

Bernardo de Chartres

A todos esos gigantes que me han sostenido y elevado a lo largo de estos años.
Especialmente, a los doctores Julián Conejo-Mir Sánchez, Manu Jain y M^a Elisa
Cordero Matía, por su guía y apoyo en este proyecto.
A mi familia y amigos, por su tiempo y por su paciencia.

ÍNDICE TEMÁTICO

RESUMEN	17
ABSTRACT	18
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	21
1.1 Antecedentes.....	21
1.2 Justificación.....	23
1.3 Fundamentación teórica.....	25
1.3.1 Epidemiología del carcinoma basocelular.....	25
1.3.2 Factores de riesgo y patogénicos del carcinoma basocelular.....	26
1.3.2.1 Factores ambientales relacionados con el carcinoma basocelular.....	27
1.3.2.2 Factores genéticos relacionados con el carcinoma basocelular.....	29
1.3.2.3 Síndromes asociados con el desarrollo de carcinoma basocelular....	30
1.3.3 Presentación clínica del carcinoma basocelular.....	31
1.3.4 Histología del carcinoma basocelular.....	32
1.3.4.1 Estructura de la matriz extracelular y papel del colágeno.....	35
1.3.5 Diagnóstico del carcinoma basocelular.....	40
1.3.6 Tratamiento de los carcinomas basocelulares de alto y bajo riesgo.....	41
1.3.7 Cirugía micrográfica de Mohs.....	43
1.3.7.1 Técnica quirúrgica.....	44
1.3.7.2 Indicación y efectividad de la cirugía de Mohs en el tratamiento del carcinoma basocelular.....	46
1.3.7.3 Limitaciones de la cirugía de Mohs.....	48
1.3.8 Fundamentos de la microscopía multifotón.....	49
1.3.8.1 Historia de la microscopía de excitación de dos fotones.....	51
1.3.8.2 Características de la microscopía microscopía de excitación de dos fotones.....	51
1.3.8.3 Diferencias entre la microscopía multifotón y otras técnicas de imagen para el estudio de la piel.....	53

CAPITULO 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	58
2.1 Hipótesis.....	58
2.2 Objetivos.....	58
CAPÍTULO 3. MÉTODOS.....	61
3.1 Diseño general del estudio.....	61
3.2 Muestras y pacientes incluidos en el estudio.....	61
3.3 Protocolo de adquisición de las imágenes de microscopía multifotón.....	62
3.4 Análisis cuantitativo del colágeno.....	66
3.4.1 Análisis de energía en una banda de frecuencias en el dominio de Fourier...66	
3.4.2 Análisis de la distribución de los haces y fibras de colágeno mediante CurveAlign y CT-FIRE.....	70
3.4.3 Análisis de la intensidad de la señal de generación de segundo armónico mediante la densidad óptica integrada.....	73
3.5 Definición de las variables del estudio.....	74
3.5.1 Definición de variables independientes.....	74
3.5.2 Definición de variables dependientes.....	75
3.6 Métodos estadísticos.....	76
CAPÍTULO 4. RESULTADOS.....	79
4.1 Factores demográficos de la población a estudio y muestras incluidas.....	79
4.2 Imágenes de generación de segundo armónico del colágeno.....	80
4.3 Análisis cuantitativo del colágeno.....	82
4.3.1 Análisis cuantitativo de las fibras de colágeno adyacentes al carcinoma basocelular <i>versus</i> las adyacentes a estructuras normales de la piel (epidermis, glándulas sebáceas, folículos pilosos).....	82
4.3.2 Análisis cuantitativo de las fibras de colágeno adyacentes al carcinoma basocelular <i>versus</i> las adyacentes a lesiones cutáneas benignas.....	90
4.3.3 Análisis cuantitativo de las fibras de colágeno adyacentes a carcinomas basocelulares agresivos <i>versus</i> las adyacentes a carcinomas indolentes.....	96

CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN.....	105
5.1 ¿Qué relación tiene el colágeno con la génesis y progresión tumoral?.....	105
5.2 ¿Qué papel juega la microscopía multifotón en el estudio del colágeno?.....	108
5.2.1 ¿Cuál es la contribución de la transformada de Fourier al análisis del colágeno peritumoral en el carcinoma basocelular?.....	111
5.2.2 ¿Cuál es la contribución de los softwares CurveAlign y CT-FIRE al análisis del colágeno peritumoral en el carcinoma basocelular?.....	115
5.2.3 ¿Cuál es la contribución del análisis de la intensidad de la señal mediante la densidad óptica integrada al análisis del colágeno peritumoral en el carcinoma basocelular?.....	123
5.3 Limitaciones del estudio.....	126
5.4 Direcciones futuras.....	127
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES.....	133
CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA.....	136
CAPÍTULO 8. ANEXOS.....	158
Anexo I: abreviaturas.....	158
Anexo II: material suplementario.....	160
Anexo III: producción científica parte de la tesis doctoral.....	162
Anexo IV: producción científica parte de la línea de investigación.....	163

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Hallazgos clínicos más frecuentes de los diferentes subtipos de CB.....	32
Tabla 2. Hallazgos histológicos más frecuentes de los diferentes subtipos de CB.....	34
Tabla 3. Principales tipos de colágeno que componen la piel humana, función y localización de los mismos.....	37
Tabla 4. Signos clínicos y patológicos que indican bajo o alto riesgo en CB.....	42
Tabla 5. Ventajas y limitaciones de la microscopía multifotón, la microscopía confocal de reflectancia y la tomografía óptica de coherencia en el estudio de la piel.....	55
Tabla 6. Resumen de los datos demográficos de la población a estudio.....	79
Tabla 7. Resumen de las muestras incluidas y del número de imágenes de microscopía multifotón en cada categoría.....	80
Tabla 8. Resultados del análisis comparativo entre las fibras de colágeno que rodean al carcinoma basocelular <i>versus</i> a las estructuras normales de la piel.....	83
Tabla 9. Resultados del análisis comparativo entre las fibras de colágeno adyacentes al carcinoma basocelular <i>versus</i> las adyacentes a lesiones benignas de la piel.....	90
Tabla 10. Resumen de los resultados del análisis comparativo entre las fibras de colágeno adyacentes a carcinomas basocelulares agresivos <i>versus</i> las adyacentes a carcinomas indolentes.....	97
Tabla suplementaria 1. Resultados del análisis comparativo entre las fibras de colágeno que rodean a las estructuras normales de la piel: epidermis <i>versus</i> glándulas sebáceas y folículos pilosos.....	160
Tabla suplementaria 2. Resultados del análisis comparativo entre las fibras de colágeno que rodean a las estructuras normales de la piel: glándulas sebáceas <i>versus</i> folículos pilosos.....	161

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Composición espacial del colágeno.....	36
Figura 2. Esquema de los principales componentes de la matriz extracelular en la piel humana.....	39
Figura 3. Cirugía de Mohs para la extirpación de un carcinoma basocelular recurrente en punta nasal.....	45
Figura 4. Diagrama de Jablonski.....	50
Figura 5. Mapa de H&E usado para identificar las áreas de interés en las imágenes posteriores de microscopía multifotón.....	63
Figura 6. Imágenes de microscopía multifotón: señales de MEDF y de GSA.....	65
Figura 7. Aplicación de la FFT sobre una imagen de GSA de un carcinoma basocelular nodular.....	67
Figura 8. Imágenes representativas de las usadas para el análisis cuantitativo del colágeno basado en la FFT.....	69
Figura 9. Imágenes representativas de las resultantes del análisis con CurveAlign y CT-FIRE.....	72
Figura 10. Cálculo del valor de la densidad óptica integrada para evaluar la intensidad de la señal de GSA.....	73
Figura 11. Imágenes representativas de microscopía multifotón y su correspondencia con las imágenes de H&E.....	81
Figura 12. Diagrama de caja y bigotes que muestra los resultados del análisis comparativo basado en la FFT entre el colágeno adyacente al CB y el adyacente a las estructuras normales de la piel.....	85
Figura 13. Diagrama de caja y bigotes que muestra los resultados del análisis comparativo mediante CurveAlign entre los haces de colágeno adyacentes al CB y los que se encuentran adyacentes a las estructuras normales de la piel.....	86
Figura 14. Diagrama de caja y bigotes que muestra los resultados del análisis de las fibras de colágeno a nivel individual mediante CT-FIRE en la periferia del CB comparadas con las que se encuentran en la periferia de las estructuras normales de la piel.....	88

Figura 15. Diagrama de caja y bigotes que muestra los resultados del análisis comparativo entre la DOI de las imágenes del colágeno adyacente al CB frente a la de las imágenes del colágeno adyacente a las estructuras normales de la piel.....	89
Figura 16. Diagrama de caja y bigotes que muestra los resultados del análisis comparativo basado en la FFT entre el colágeno adyacente al CB y el adyacente a las lesiones benignas de la piel.....	91
Figura 17. Diagrama de caja y bigotes que muestra los resultados del análisis comparativo mediante CurveAlign entre los haces de colágeno adyacentes al CB y los que se encuentran adyacentes a las lesiones benignas de la piel	93
Figura 18. Diagrama de caja y bigotes que muestra los resultados del análisis de las fibras de colágeno a nivel individual mediante CT-FIRE en la periferia del CB comparadas con las que se encuentran en la periferia de las lesiones benignas de la piel.....	95
Figura 19. Diagrama de caja y bigotes que muestra los resultados del análisis comparativo entre la DOI de las imágenes del colágeno adyacente al CB frente a la de las imágenes del colágeno adyacente a las lesiones benignas de la piel.....	96
Figura 20. Diagrama de caja y bigotes que muestra los resultados del análisis comparativo basado en la FFT entre el colágeno adyacente los CB agresivos y el adyacente a los CB indolentes.....	98
Figura 21. Diagrama de caja y bigotes que muestra los resultados del análisis comparativo mediante CurveAlign entre los haces de colágeno adyacentes los CB agresivos y los que se encuentran adyacentes a los CB indolentes.....	99
Figura 22. Diagrama de caja y bigotes que muestra los resultados del análisis de las fibras de colágeno a nivel individual mediante CT-FIRE en la periferia de los CB agresivos comparadas con las que se encuentran en la periferia de los CB indolentes.....	101
Figura 23. Diagrama de caja y bigotes que muestra los resultados del análisis comparativo entre la DOI de las imágenes del colágeno adyacente los CB agresivos frente a la de las imágenes del colágeno adyacente a los CB indolentes.....	102

RESUMEN

El carcinoma basocelular (CB) es el cáncer más frecuente del ser humano y su incidencia está en aumento. La microscopía multifotón (MMF) es una técnica de imagen que puede ayudar al diagnóstico de este tumor *in vivo* (eliminando biopsias innecesarias) y *ex vivo* (agilizando procesos laboriosos como la cirugía de Mohs). Además, la señal de generación de segundo armónico (GSA) en MMF puede clasificar y dar información pronóstica de los tumores en atención a los cambios en la matriz extracelular, a través del colágeno tipo I. En este trabajo se ha explorado el potencial de la MMF para diferenciar cambios en el colágeno asociados a diferentes subtipos histológicos de CB en relación con estructuras cutáneas normales y lesiones benignas. Sobre 418 imágenes de GSA de 52 CB y 12 lesiones cutáneas benignas se realizaron *ex vivo* análisis cuantitativos sobre el colágeno, como el análisis de energía en una banda de frecuencias en el dominio de Fourier, la densidad óptica integrada o el análisis mediante los softwares CurveAlign y CT-FIRE. Los resultados mostraron que el colágeno se dispone más alineado alrededor de los CB en comparación a las estructuras normales de la piel ($p < 0,001$) y a los tumores benignos ($p < 0,001$). Además, el colágeno se orienta más paralelo circundante a los CB de subtipo histológico indolente (superficial y nodular) en comparación a los de subtipo agresivo (infiltrante y micronodular) ($p = 0,021$), hallazgo que muestra el potencial de la MMF para proporcionar información pronóstica cuantificable sobre el CB. Este trabajo sienta las bases iniciales para una futura cuantificación del colágeno *in vivo*, que permita obtener información pronóstica del CB directamente en la consulta.

Palabras clave: carcinoma basocelular, colágeno, microscopía multifotón, generación de segundo armónico, transformada de Fourier, CurveAlign, CT-FIRE, densidad óptica integrada

ABSTRACT

Basal cell carcinoma (BCC) is the most common human cancer, and its incidence is rising. Multiphoton microscopy (MPM) is an imaging technique that can aid in diagnosing BCC in vivo (reducing unnecessary biopsies) and ex vivo (expediting laborious procedures such as Mohs surgery). Furthermore, the second harmonic generation (SHG) signal generated from MPM can classify and prognosticate cancers based on extracellular matrix changes, especially collagen I. We explored the potential of MPM to differentiate collagen changes associated with different BCC subtypes compared to the surrounding normal skin structures and benign lesions. Quantitative collagen analysis such as frequency band energy analysis in Fourier domain, integrated optical density, CurveAlign and CT-FIRE analysis was performed on 418 SHG images from 52 BCCs and 12 benign lesions samples. Our results showed that collagen distribution is more aligned surrounding BCCs compared to the skin's normal structures ($p < 0.001$) and benign lesions ($p < 0.001$). Also, collagen was orientated more parallelly surrounding indolent BCC subtypes (superficial and nodular) versus those with more aggressive behavior (infiltrative and micronodular BCC) ($p = 0.021$), suggesting the feasibility of prognosticating BCC quantitatively with MPM. Our work lays a foundation for the future in vivo MPM imaging, which allows obtaining prognostic information of BCC directly in the consultation.

Keywords: basal cell carcinoma, collagen, multiphoton microscopy, second harmonic generation, fast Fourier transform, CurveAlign, CT-FIRE, integrated optical density

CAPÍTULO 1.
INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes:

El carcinoma basocelular (CB) es el tumor más frecuente del ser humano, y su incidencia está en ascenso [1]. Aunque es un tumor con bajo potencial metastásico, puede presentar un comportamiento invasivo y destructivo a nivel local [2]. Su crecimiento es lento e indolente en la mayoría de los casos, pero un porcentaje de ellos tendrá una alta capacidad lesiva, pudiendo destruir estructuras subyacentes incluyendo las óseas.

Tras un diagnóstico clínico de sospecha, la realización de una biopsia y posterior estudio histológico constituye el *gold-standard* para el diagnóstico y manejo del CB [3]. Según la guía de consenso europeo para el diagnóstico del CB [4], el estudio histopatológico es siempre necesario en el caso de lesiones ambiguas o ante sospecha de tumores de alto riesgo. Además, la toma de una biopsia incisional previa puede ser necesaria antes de proceder a cirugías complejas o indicar un tratamiento sistémico. El estudio anatomopatológico también sería necesario para confirmar las sospechas de recurrencia tras la cirugía o tras tratamientos tópicos o destructivos en CB de bajo riesgo. Finalmente, el estudio histopatológico permite clasificar los CB en agresivos e indolentes atendiendo, entre otros factores, a los diferentes subtipos histológicos. De esta forma, la información que proporcionan las biopsias puede definir el manejo del tumor, siendo de elección la escisión quirúrgica para los tumores más agresivos y pudiendo realizarse tratamientos tópicos o destructivos para aquellos más indolentes [3].

A pesar de que la histopatología es esencial para todos estos aspectos y de que supone el *gold-standard* en el diagnóstico del CB, presenta también sus limitaciones. Por un lado, el diagnóstico clínico de sospecha del CB puede ser complejo en muchas ocasiones, lo que se traduce en la realización de gran cantidad de biopsias al año de lesiones que finalmente resultan ser benignas [5], con la consecuente morbilidad derivada para los pacientes y el elevado impacto económico de estas pruebas e intervenciones. Además, la biopsia incisional sólo incluye parte de la muestra, lo que permite caracterizar morfológicamente a los CB, pero no siempre definir correctamente sus subtipos

histológicos. De esta forma, existen estudios que indican que los CB agresivos no se detectan mediante biopsia *punch* en uno de cada seis casos de carcinoma [6] y que el 18% de los especímenes de biopsia puede ser clasificado en un subtipo histológico erróneo al compararse con la escisión final completa de la muestra [7]. Además, es importante tener en cuenta que la realización de una biopsia no deja de ser un procedimiento invasivo con potenciales complicaciones. Dado que la mayoría de CB tienen predilección por el área facial [8], la cicatrización que sigue a la biopsia puede tener un impacto cosmético importante o incluso interferir con la funcionalidad de algún órgano facial [2]. Finalmente, la realización de una biopsia es un procedimiento que consume tiempo durante la consulta, y en el que es necesario un procesamiento posterior de los tejidos, lo que enlentece el proceso diagnóstico-terapéutico.

Por todo ello, está cobrando cada vez más importancia el desarrollo de técnicas de imagen que se puedan aplicar *in vivo* durante la consulta, directamente sobre la piel del paciente. Estas permitirían apoyar el diagnóstico de sospecha de los facultativos, evitando biopsias innecesarias y con ello reduciendo significativamente los costes económicos y la morbilidad asociados al manejo del CB.

Además, la aplicación de estas técnicas de imagen *ex vivo* también juega un papel importante en dermatología, pues permite agilizar determinados procedimientos quirúrgicos. En el caso de CB que tienen un comportamiento agresivo o para aquellos que son recurrentes, especialmente si están situados en localizaciones sensibles desde un punto de vista anatómico o estético, la cirugía micrográfica de Mohs (CMM) es la técnica de elección [9], pues consigue la extirpación completa de la lesión con mayor eficacia que la cirugía convencional. No obstante, la CMM es una técnica quirúrgica lenta y laboriosa, puesto que consiste en realizar cortes sucesivos para controlar la totalidad de los márgenes del tumor, que deben visualizarse *in situ* para asegurar la eliminación completa del mismo [10]. En cada uno de estos cortes sucesivos, la muestra se procesa mediante congelación y corte con el criostato, y es posteriormente teñida con hematoxilina-eosina (H&E) y visualizada en el microscopio en un proceso que puede requerir entre 20-45 minutos por muestra o etapa [11]. Como consecuencia, la cirugía puede demorarse varias horas (según el número de etapas que sean necesarias para eliminar la totalidad del tumor), causando incomodidad al paciente, aumento de la exposición de la herida quirúrgica al ambiente, ocupación extensa de tiempos de quirófano, etc. En este contexto,

el desarrollo de técnicas de imagen que agilicen el proceso sería de gran utilidad para aumentar la aplicabilidad de esta técnica quirúrgica, que presenta las más altas tasas de éxito en la erradicación del CB [9].

1.2 Justificación:

Por los motivos anteriormente mencionados, en los últimos años está aumentando notablemente el interés por el desarrollo de técnicas de imagen no invasivas que tengan la capacidad de ser al mismo tiempo aplicables *in vivo* directamente sobre la piel, y también útiles *ex vivo* sobre muestras extirpadas. La búsqueda de estas técnicas de imagen no invasivas, que permitan un estudio anatomopatológico “a pie de cama” del paciente [11], no compete exclusivamente a la dermatología, sino que se está produciendo también en diferentes áreas de las ciencias de la salud.

Dentro de estas técnicas de imagen de reciente desarrollo en medicina encontramos la tomografía óptica de coherencia (TOC), la microscopía confocal de reflectancia (MCR), o la microscopía multifotón (MMF).

Tanto la TOC [12], como la MCR [13] y la MMF [14,15], son técnicas que proporcionan imágenes cuasi-histológicas con resolución celular y que pueden ser aplicadas *in vivo* sobre la piel. En la actualidad, la que mayor implementación tiene en práctica clínica real es la MCR [16]. La MCR se basa en la señal que proporcionan los componentes internos de la célula según su índice de refracción de la luz [11]. Por ello, la MCR ha mejorado el diagnóstico de lesiones pigmentadas (como el melanoma), puesto que la melanina tiene un alto índice de refracción de la luz [17]. Sin embargo, la visualización de lesiones menos pigmentadas o que carecen de pigmento (como el CB), es más compleja, por la falta de contraste proveniente de la melanina. Como consecuencia, la MCR tiene una sensibilidad del 80-90% [18] en el diagnóstico de CB, pero una especificidad menor ($\approx 54\%$) [19], siendo las estructuras normales de la piel como los folículos pilosos los principales agentes que llevan a confusión en su detección. Además, la MCR no puede detectar diferencias de forma específica entre elementos de la matriz extracelular.

En contraste con la microscopía confocal, que se basa en un único fotón, la MMF incluye a un grupo de técnicas ópticas no lineales basadas en la absorción simultánea de varios

fotones de baja energía por una molécula [20]. La forma más frecuente de MMF es la microscopía de excitación de dos fotones (MEDF), en la que se excitan los fluoróforos endógenos mediante la absorción de dos fotones de baja energía. La señal que dará lugar a la imagen proviene de sustancias endógenas como la nicotinamida adenina dinucleótida (NADH), la melanina, las queratinas, o la elastina entre otras; eliminando la necesidad de usar agentes de contraste fluorescente exógenos [21] y pudiendo aplicarse directamente sobre tejidos biológicos como la piel. Además de esta señal autofluorescente, el mismo láser interacciona con estructuras biológicas no centrosimétricas y genera fotones de exactamente la mitad de longitud de onda que los absorbidos. Esto se conoce como generación de segundo armónico (GSA, o más comúnmente conocida como SHG por sus siglas en inglés: *second-harmonic generation*). Esta señal proporciona información sobre estructuras no centrosimétricas de la matriz extracelular como el colágeno o la miosina [22]. Dado que la señal de la GSA tiene una longitud de onda más corta que la de autofluorescencia de la MEDF, la GSA puede detectarse de forma separada para estudiar específicamente la morfología del colágeno que forma parte de la matriz extracelular [23].

Aunque la MMF es útil para distinguir estructuras de la matriz extracelular (como diferenciar el colágeno de la elastina) y produce menos fotodaño que las técnicas unifotón como la microscopía confocal [24], los dispositivos de MMF comerciales presentan una velocidad de adquisición de imágenes lenta [25]. En el futuro, una aproximación multimodal para el diagnóstico de tumores cutáneos, combinando la aplicación MMF y MCR directamente sobre la piel, podría superar las limitaciones de ambas técnicas. La MCR permitiría la adquisición rápida de imágenes de la piel abarcando un campo amplio de la misma, mientras que la MMF actuaría proporcionando información adicional relacionada con cambios en la matriz extracelular y aumentando el contraste de las imágenes en zonas sospechosas para mejorar la especificidad diagnóstica. En manos de dermatólogos expertos, el uso de añadido de MCR a la dermatoscopia resulta en un descenso de hasta el 50% del número de pacientes necesarios a tratar para el diagnóstico del cáncer cutáneo mediante biopsia previa [18]. En los próximos años, el desarrollo de nuevas técnicas de imagen para el diagnóstico *in vivo* del cáncer cutáneo podría reducir aún más este número, eliminando la realización de biopsias innecesarias. Dada la alta incidencia de estos tumores a nivel global, la detección no invasiva de estas lesiones podría tener un impacto significativo y beneficioso en miles de pacientes y en los costes sanitarios derivados de su abordaje.

Mientras que son numerosos los estudios sobre diferentes tumores cutáneos visualizados mediante MCR [26–32] y sobre su uso en la práctica clínica habitual [33,34], son escasos los datos con los que contamos sobre la capacidad de diagnosticar tumores cutáneos por MMF. Para incorporar en el futuro el uso *in vivo* o *ex vivo* de la MMF en la práctica clínica del dermatólogo, ya sea de forma aislada o en combinación con otras técnicas de imagen no invasivas como la MCR, son necesarios estudios que sustenten con sus resultados la capacidad diagnóstica de esta técnica en el cáncer de piel.

1.3 Fundamentación teórica:

1.3.1 Epidemiología del carcinoma basocelular:

A pesar de ser el cáncer más frecuente del ser humano, y suponer hasta un 80-90% de los cánceres de piel [35], es difícil estimar la incidencia exacta del CB, pues no se recoge de forma adecuada en los registros sobre cáncer en la mayoría de países [36]. En los países en los que sí hay una recogida protocolizada de datos epidemiológicos del CB, estos son recogidos junto a otros tumores cutáneos, como el carcinoma epidermoide y el carcinoma de células de Merkel, todos ellos englobados bajo el epígrafe de “cáncer cutáneo no melanoma (CCNM)”; sin poder discriminar a qué tumor del grupo pertenecen los datos concretos. En consecuencia, este tipo de registros hace complejo analizar pormenorizadamente los datos de incidencia o mortalidad. Además, en ellos sólo se recoge el primer tumor por paciente, sin recoger los tumores subsecuentes o múltiples [37] que con frecuencia presentan los pacientes con CB.

Aproximadamente tres millones de nuevos CB se diagnostican en EE.UU. cada año [1,38], y es de esperar que esta incidencia aumente los próximos años debido al envejecimiento progresivo de la población y al aumento de la exposición solar recreativa. En el caso de España, un metaanálisis reciente describió que la incidencia del CB en nuestro país es de 113,05 (intervalo de confianza [IC] del 95% 89,03-137,08) casos por 100000 personas-año [39]. Para esta estimación, se utilizó la metodología habitual de los registros de cáncer comentada anteriormente: contabilizar un solo tumor por persona y contar sólo con aquellos que tienen diagnóstico histológico. Teniendo en cuenta que hasta

un tercio de los pacientes que han padecido un CB desarrollarán nuevos tumores [40] y que en los CB de bajo riesgo que van a ser tratados con métodos destructivos es suficiente el diagnóstico clínico [4] (por lo que no son contabilizados al no contar con confirmación histológica), es lógico suponer que la incidencia es mayor que la reportada por el metaanálisis anteriormente mencionado. Un estudio anterior, calculando la incidencia mediante CB con diagnósticos clínicos e histológicos, e incluyendo tumores en lugar de personas, señaló una incidencia de hasta el doble de la anterior: 253,23 casos por 100000 personas-año [41].

Son diversos los estudios epidemiológicos que recogen un aumento de incidencia del CB. Esta incidencia es variable según la región geográfica que estudiemos, puesto que el CB se relaciona con la exposición solar y afecta más a fototipos más bajos. Es por ello que los índices más altos de incidencia corresponden a Australia (>1000 casos de CB por 100000 personas-año) y la más bajas en determinadas zonas del continente africano (<1 CB por 100000 personas-año) [37]. No obstante, un mejor sistema de recogida de datos que diferencie el CB del resto de cánceres cutáneos no melanoma es necesario para conocer de forma más precisa la incidencia de este tumor.

Este mismo problema lo enfrentamos cuando nos planteamos estudiar la mortalidad por CB. En el caso de España, el Centro Nacional de Epidemiología (Instituto de Salud Carlos III) y el Instituto Nacional de Estadística incluyen en sus registros la mortalidad de los cánceres cutáneos no melanoma (*International Classification of Diseases* [ICD]: ICD-9-CM: 173; ICD-10: C-44) bajo el mismo epígrafe. Aunque el CB es el tumor más frecuente de este grupo; el segundo tumor en frecuencia, el carcinoma espinocelular, presenta una mortalidad significativamente mayor a la del CB [2]. Por ello, son varios los autores que consideran que los datos de mortalidad del grupo cáncer cutáneo no melanoma deben ser atribuidos principalmente al carcinoma espinocelular [39,42,43]; siendo los datos específicos de mortalidad por CB difíciles de identificar.

1.3.2 Factores de riesgo y patogénicos del carcinoma basocelular:

Uno de los principales factores de riesgo para desarrollar un CB es el antecedente personal de haber padecido uno previo, puesto que el riesgo de desarrollar un subsecuente CB tras

un primer diagnóstico de CCNM es alto [44,45]. Se calcula que en torno a un 35% de los pacientes que han tenido un CB desarrollarán otro tumor en los primeros 3 años tras el diagnóstico, y hasta un 50% de los pacientes lo harán en 5 años [46]. Este riesgo va aumentando conforme más CB haya desarrollado un paciente a lo largo de su vida. Así, un estudio comparó el riesgo de desarrollar un nuevo CCNM entre pacientes que se habían diagnosticado de un primer y único tumor *versus* aquellos que habían tenido varios, encontrando una incidencia mayor en este segundo grupo (14% frente al 44% desarrollaban un nuevo tumor al año, 31% frente al 71% a los tres años y 40% frente al 82% a los cinco años) [47].

Además, existen otros múltiples factores de riesgo que se asocian con el desarrollo del CB, tanto de tipo ambiental como genético, así como síndromes que se caracterizan por la predisposición a sufrir CB.

1.3.2.1 Factores ambientales relacionados con el carcinoma basocelular:

- **Radiación ultravioleta (UV):**

La exposición a la luz ultravioleta es el principal factor asociado con el desarrollo del CB [48]. Los pacientes de fototipos bajos son los más susceptibles a esta radiación y por ello presentan un mayor riesgo de desarrollar estos tumores [49]. Concretamente, según un meta-análisis sobre el riesgo de presentar CB en base a características fenotípicas, los pacientes pelirrojos, los que tienen la piel clara, y los que presentan una piel que nunca se broncea, tienen el doble de riesgo de desarrollar CB [50].

En cuanto al patrón de exposición al sol más relacionado con el desarrollo de tumores, parece que la exposición intensa e intermitente está más relacionada con el desarrollo de CB que una exposición continua (más característica del carcinoma espinocelular) [51]. Existen estudios que han revelado un aumento de riesgo relacionado con la exposición recreacional, especialmente en la infancia y la adolescencia, indicando que este periodo sería crítico para el desarrollo de CB en la vida adulta [49,52]. Otros, por el contrario, han mostrado que la exposición solar durante la vida adulta se asocia a mayor riesgo de desarrollo de CB [53].

Un factor que subraya la importancia de la radiación UV en la patogénesis del CB, es el hecho de que los habitantes de países próximos al Ecuador tienen mayor incidencia de estos tumores [54].

Otras circunstancias que aumentan la radiación UV (y en consecuencia el riesgo de desarrollo de tumores) son las cabinas de bronceado [55] y el uso de fototerapia para enfermedades como la psoriasis [54]. El uso de psoralenos y radiación ultravioleta A (PUVA) se ha visto relacionado con un incremento del CCNM, especialmente del carcinoma espinocelular [56]. La radiación ultravioleta B de banda ancha y estrecha aumenta menos el riesgo de desarrollo de estos tumores que el uso de PUVA [57]. Por último, los medicamentos fotosensibilizantes como las tetraciclinas o las tiacidas también parecen aumentar el riesgo de CCNM al incrementar la sensibilidad a la radiación [58].

- **Radiación ionizante:**

El papel de la radiación ionizante en la patogenia del CB está ampliamente documentado en la literatura. En pacientes sometidos a radiación ionizante superficial para el tratamiento de enfermedades como el acné, la psoriasis, o la tiña capitis, aumenta el riesgo de CCNM, incluyendo el CB [59]. También la radiación ionizante usada para tratar los cánceres infantiles ha demostrado aumentar el riesgo de desarrollo de CB [60]. Karagas et al. [61] mostraron en un estudio de 1690 pacientes que se habían tratado con radioterapia que la razón de tasas de incidencia para el desarrollo de CB tras el tratamiento era de 2,3 (IC 95%1,7-3,1).

Otro ejemplo del aumento de riesgo que supone la exposición a radiaciones ionizantes lo tenemos en los pacientes supervivientes a las explosiones de la bomba atómica en Japón. Un estudio retrospectivo mostró que el riesgo de estos pacientes aumentaba conforme se acercaban al centro de la explosión [62].

- **Agentes químicos:**

Existen diversos agentes químicos que se han relacionado con la aparición de CB. El más conocido es el arsénico, cuya administración crónica a través de agua

contaminada, pesticidas o medicamentos, puede inducir el desarrollo de CB a largo plazo [63]. Otras sustancias que se han relacionado son las mostazas nitrogenadas o los hidrocarburos aromáticos [48].

- **Inmunosupresión:**

La inmunosupresión crónica aumenta el riesgo de desarrollar CB, aunque este riesgo es menor que el de desarrollar carcinomas espinocelulares [64]. En el caso de los CB, el aumento del riesgo de desarrollo de uno de estos tumores tras un trasplante de órgano sólido es lineal; mientras que en el caso de los carcinomas espinocelulares, el riesgo aumenta exponencialmente [65]. También la inmunosupresión que sigue a un trasplante de médula ósea aumenta el riesgo de CB [66]. Lo mismo ocurre con los pacientes inmunodeprimidos tras la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), que presentan hasta el doble de riesgo de desarrollar CB según un estudio [67].

1.3.2.2 Factores genéticos relacionados con el carcinoma basocelular:

Se han descrito múltiples mutaciones en genes supresores de tumores y en protooncogenes implicadas en el desarrollo de CB:

- ***PTCH1***: la identificación hace dos décadas de las mutaciones del gen supresor de tumores patched 1 (*PTCH1*) que causaban el síndrome de Gorlin fue fundamental para comprender la patogénesis molecular del CB [2]. Posteriormente, dichas mutaciones se han identificado también en CB esporádicos, mostrando que el gen *PTCH1* juega un papel fundamental en la patogenia de este tumor. Dicho gen se localiza en el cromosoma 9q22 y su inactivación conlleva una activación continua de la vía de señalización Hedgehog (Hh), que participa en la embriogénesis y está hiperactivada en otras neoplasias más allá del CB (meduloblastoma, cáncer de colon, próstata...). *PTCH1* codifica un receptor transmembrana para los ligandos de la vía de señalización Hh, de los que se han descrito tres en mamíferos: Sonic Hedgehog (SHH), Indian Hedgehog (IHH) y Desert Hedgehog (DHH). En ausencia del ligando, el receptor PTCH se encuentra inhibiendo al receptor transmembrana Smoothened (SMO). Cuando esta inhibición falta, SMO se encuentra constitutivamente activado

y, por ende, se activa la vía Hh favoreciéndose la tumorigénesis [68]. En el síndrome de Gorlin y en la mayoría de CB esporádicos esta vía es la responsable del desarrollo del tumor.

- **P53:** el segundo gen más importante en la carcinogénesis del CB es el supresor de tumores *TP53*, que codifica la proteína P53 (conocida como “guardián del genoma”) y que está implicada en la detención del ciclo celular y la activación de la apoptosis programada. Se ha demostrado en modelos animales que la pérdida de *TP53* aumenta la expresión de SMO, activando la vía Hh y favoreciendo el desarrollo de CB [69].

Finalmente, otros genes implicados en la patogenia del CB descritos en la literatura son *MYCN*, *PPP6C*, *PTPN14*, *STK19*, and *LATS1* [69].

1.3.2.3 Síndromes asociados con el desarrollo de carcinoma basocelular:

Existen síndromes hereditarios que se han asociado con un aumento del riesgo de desarrollar CB:

- **Síndrome del carcinoma basal nevoide o síndrome de Gorlin:** es una enfermedad hereditaria autosómica dominante que se caracteriza por el desarrollo, desde edades tempranas, de múltiples CB. Además, los pacientes con síndrome de Gorlin pueden presentar otras alteraciones cutáneas, como los pits palmoplantares, y otras extracutáneas, como los quistes odontogénicos [70]. A través del síndrome de Gorlin se identificaron hace dos décadas las variantes del gen *PTCHI* como causantes del desarrollo de CB [2].
- **Xeroderma pigmentoso:** en esta enfermedad rara autosómica recesiva se encuentran mutados los genes reparadores del daño en el ADN inducido por la radiación UV. Se caracteriza por fotosensibilidad y tendencia al desarrollo de cáncer cutáneo desde la infancia [71].
- **Síndrome de Bazex-Dupré-Christol:** en esta infrecuente genodermatosis los pacientes desarrollan la tríada clásica de CB, atrofodermia folicular e hipotricosis. La enfermedad se produce por mutaciones en el brazo largo del cromosoma X [72].

1.3.3 Presentación clínica del carcinoma basocelular:

El CB suele aparecer en zonas fotoexpuestas de la piel [1] siendo excepcional su aparición en palmas y plantas o en las mucosas. Puede presentarse bajo diferentes formas clínicas, que pueden ser divididas en tres grupos habitualmente conformes a su histopatología: CB nodulares, superficiales y morfeiformes. Los CB nodulares, que representan sobre el 80% de los casos [73], se presentan como pápulas o nódulos con un característico brillo perlado en su superficie. Frecuentemente presentan telangiectasias arboriformes asociadas. Por su parte, los CB superficiales suelen corresponder a placas eritematosas ligeramente descamativas, con microulceraciones y el mismo aspecto perlado. Por último, los tumores morfeiformes o esclerosantes son placas que recuerdan a una cicatriz, mal definidas, de aspecto brillante y que pueden mostrar atrofia central. Otras características clínicas que pueden presentar estos tumores son ulceración o pigmentación. La ulceración es un hallazgo frecuente en todos los subtipos de CB. Por su parte, determinados CB nodulares y los superficiales pueden producir pigmento, en cuyo caso se conocen como CB pigmentados. Las anteriores, y otras formas clínicas más infrecuentes de CB, se recogen resumidas en la Tabla 1.

Tabla 1. Hallazgos clínicos más frecuentes de los diferentes subtipos de CB

Subtipo de CB	Hallazgos clínicos
CB nodular	Subtipo más frecuente ($\approx 80\%$). Pápula o nódulo brillante, con bordes perlados y superficie lisa. Pueden aparecer telangiectasias arboriformes en su superficie.
CB superficial	Segundo subtipo en frecuencia ($\approx 15\%$) [48]. Placa bien delimitada, eritematosa, con descamación superficial. Puede presentar bordes perlados y pigmentación.
CB morfeiforme o esclerosante	Tercer grupo en frecuencia ($\approx 5-10\%$). Placa indurada plana o deprimida, mal delimitada, de superficie brillante, que recuerda a una cicatriz.
CB infiltrante	Lesiones mal definidas, en forma de placas deprimidas que puede presentar costras o ulceraciones e infiltrar tejidos subyacentes.
Fibroepitelioma de Pinkus	Nódulo color piel o perlado, frecuentemente pediculado, que predomina en el tronco.
CB infundíbulo-quístico	Placa perlada y bien definida. Se localiza frecuentemente en la cabeza y cuello de pacientes ancianos.
Carcinoma basoescamoso	Tumores agresivos que predominan en cabeza y cuello.

Modificado de Cameron MC, Lee E, Hibler BP, Barker CA, Mori S, Cordova M, et al. Basal cell carcinoma: Epidemiology; pathophysiology; clinical and histological subtypes; and disease associations. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2019;80:303–17. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2018.03.060>. [1]

1.3.4 Histología del carcinoma basocelular:

El CB es un tumor epitelial que se genera fundamentalmente a partir la capa basal de la epidermis y ocasionalmente a partir del epitelio que forma la vaina radicular externa del folículo piloso [74].

Un hallazgo histológico común a este grupo de tumores es la presencia de nidos hipercelulares compuestos por células basalioides monomorfas con núcleos

hipercromáticos. Estas células contienen un citoplasma relativamente escaso y mal definido, por lo que presentan una ratio núcleo/citoplasma alto. Aunque la mayoría de las células presentan una morfología cuboidal, las células en la periferia del tumor tienen una morfología más cilíndrica, y se agrupan de forma paralela entre sí y perpendicular a la membrana basal, formando característicamente una distribución conocida como empalizada [75]. En ocasiones los nidos tumorales incluyen melanocitos y melanófagos, dando lugar a lesiones pigmentadas por la melanina.

Existe una relación íntima entre el parénquima del tumor y el estroma que lo rodea. El tejido conectivo prolifera al alrededor de las masas tumorales y se dispone en haces paralelos [74]. Este estroma de nueva formación contiene numerosos fibroblastos y se puede distinguir del estroma de la dermis adyacente. Además, es frecuente que el estroma peritumoral sea rico en mucina. Otro rasgo habitual es la presencia de áreas de retracción en forma de semiluna alrededor de los nidos tumorales. Estas áreas (conocidas como *clefting*) se consideraron clásicamente artefactos de la fijación con parafina, que hacía retraerse a la mucina. No obstante, se han observado estas áreas también en secciones congeladas [74] e incluso directamente sobre la piel *in vivo* en CB visualizados con microscopía confocal de reflectancia [76]. Por ello, parece también influir en la formación de dichas áreas de retracción alrededor del CB una disminución de los componentes del hemidesmosoma y de los filamentos de anclaje [77].

A parte de estos hallazgos histológicos comunes, existen algunos rasgos que permiten distinguir diferentes subtipos histológicos de CB. Estos rasgos son frecuentemente paralelos a determinadas expresiones clínicas de los tumores, de modo que comparten una terminología común (ver Tabla 1). En la Tabla 2 se recogen los principales hallazgos que caracterizan a cada subtipo histológico de CB.

Tabla 2. Hallazgos histológicos más frecuentes de los diferentes subtipos de CB

Subtipo de CB	Hallazgos histológicos
CB nodular	El tumor forma nódulos de células con empalizada periférica y alineación más aleatoria en la zona central. Es frecuente que presenten espacios de retracción entre el parénquima tumoral y el estroma. También puede visualizarse ulceración en aquellos tumores de mayor tamaño.
CB micronodular	Similar al subtipo nodular, pero con nidos de menor tamaño y empalizada no tan claramente desarrollada. Tiene mayor tendencia a la recidiva que el anterior.
CB superficial	Los nidos tumorales están conectados a la epidermis y generalmente se limitan a la dermis papilar. Estos nidos suelen presentar una zona fina de estroma fibroso su alrededor.
CB morfeiforme o esclerosante	El tumor forma cordones tumorales alargados y finos que penetran en un estroma denso y fibrosado.
CB infiltrante	El tumor forma cordones tumorales alargados y finos que penetran entre los haces de colágeno. Aunque hay un aumento del colágeno, no hay fibrosis significativa.
CB fibroepitelial de Pinkus	Está compuesto por cordones delgados de células basalioides anastomosadas, inmersas en un estroma laxo prominente. Los nidos conectan repetidamente entre sí, separando en compartimentos islas de estroma. Pueden presentar zonas de diferenciación focal correspondientes a estructuras foliculares.
CB infundíbulo-quístico	Proliferación bien delimitada de cordones de células basaloideas anastomosadas con estroma escaso. Los pequeños quistes con diferenciación infundibular-folicular son típicos de esta variante.
Carcinoma basoescamoso	Las células basalioides que componen los nidos tumorales presentan diferenciación histológica hacia carcinoma escamoso.

1.3.4.1 Estructura de la matriz extracelular y papel del colágeno:

También desde un punto de vista histológico, es importante conocer que los tejidos conectivos como la dermis cuentan con un soporte estructural conocido como matriz extracelular (MEC). Esta matriz está constituida por proteínas secretadas y polisacáridos, y actúa como sostén celular [78]. En los últimos años, es cada vez más conocido que los cambios en la MEC juegan un papel crítico en la patogénesis de los tumores y en su progresión [79–81]. En la piel, la MEC forma parte del espacio intersticial de la dermis, en el que células como los fibroblastos o los vasos sanguíneos están inmersos e interactuando con esta matriz flexible y dinámica. Además, en la base de los tejidos epiteliales destaca un tipo particular de esta matriz extracelular: la membrana basal. Esta membrana está compuesta por varias capas observables al microscopio electrónico (lámina lúcida, lámina densa y lámina reticular) e incluye fibras que anclan el epitelio a la dermis subyacente.

Existen numerosas proteínas estructurales en la MEC, entre las que se incluyen el colágeno, la elastina, la fibronectina o la laminina entre otras. El colágeno es la proteína más abundante del cuerpo humano (en torno al 30% del total) [78] y es el principal componente proteico de esta matriz. El colágeno se ha relacionado específicamente con múltiples funciones celulares como la adhesión, migración o diferenciación celular [82,83].

El colágeno se caracteriza por estar formado a partir de una estructura conocida como triple hélice. Esta estructura consiste en tres cadenas polipeptídicas, que se enrollan entre sí formando una estructura helicoidal. Los dominios de la triple hélice de colágeno consisten en la repetición de tres aminoácidos: glicina-X-Y, donde X suele ser la prolina y la Y la hidroxiprolina [84]. Existen hasta 28 tipos diferentes de colágeno [85], siendo el más abundante en el ser humano el colágeno tipo I [86]. En la etapa fetal, el colágeno tipo III supone más de la mitad del total a nivel de la piel, pero en el periodo postnatal el colágeno I es el predominante, suponiendo un 80-90% del total [86] y alcanzando una ratio de hasta 6:1 con respecto al colágeno III [87]. Tanto los colágenos tipo I como el tipo III son colágenos de tipo fibrilar. El colágeno fibrilar, tras ser secretado por las células, se ensambla en fibrillas de colágeno, cuyo diámetro oscila entre los 50 y 200 nm [88]. Las fibrillas de colágeno son una formación discontinua regular, en la que las

moléculas de colágeno organizadas en haces paralelos están desplazadas una con respecto a la otra 67 nm [85]. Las moléculas se superponen en una cuarta parte de su longitud, y quedan ensambladas gracias a enlaces covalentes transversales que refuerzan esta unión [84]. Finalmente, estas fibrillas se asociarán unas con otras formando las fibras de colágeno, que pueden tener varias micras de diámetro. Estas fibras pueden asociarse a su vez formando haces de colágeno más o menos paralelos, según su función y la localización en la que se encuentren. Un esquema de la organización espacial del colágeno puede visualizarse en la Figura 1.

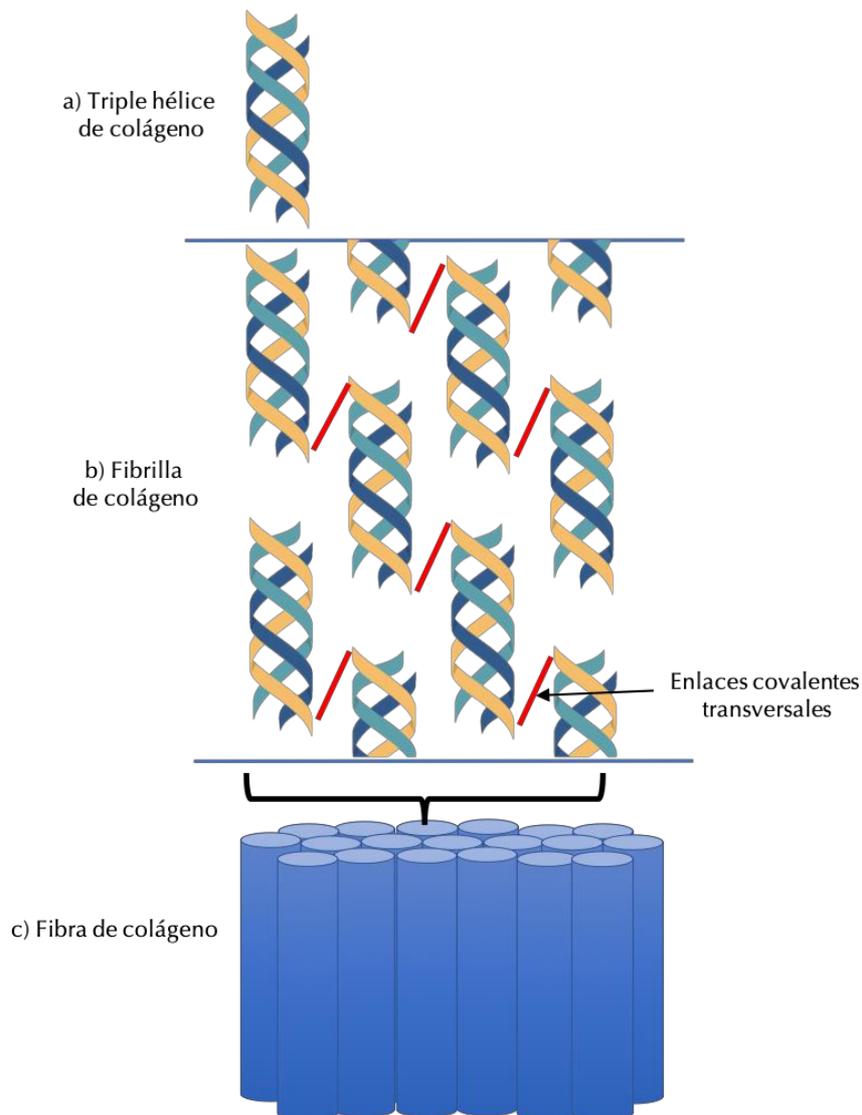


Figura 1. Composición espacial del colágeno: a) triple hélice de colágeno, b) fibrilla de colágeno, c) fibra de colágeno. Obsérvense los enlaces covalentes que unen entre sí las triples hélices de colágeno permitiendo su ensamblaje para formar las fibrillas.

Los principales colágenos que forman la matriz extracelular a nivel de la piel y su localización aparecen recogidos en la Tabla 3.

Tabla 3. Principales tipos de colágeno que componen la piel humana, función y localización de los mismos

Colágeno	Localización en la piel	Función y características
Colágeno tipo I	Dermis, matriz intersticial	<ul style="list-style-type: none"> • Colágeno de tipo fibrilar. • Es la forma de colágeno más frecuente de la piel. • Da soporte y proporciona flexibilidad a la dermis.
Colágeno tipo III	Dermis, matriz intersticial	<ul style="list-style-type: none"> • Colágeno de tipo fibrilar. • Más frecuente en la etapa fetal. • Da soporte y proporciona flexibilidad a la dermis. • Se relaciona con el síndrome de Ehlers-Danlos.
Colágeno tipo IV	Membrana basal	<ul style="list-style-type: none"> • Colágeno no fibrilar. • Forma una red a nivel de la membrana basal.
Colágeno tipo V	Dermis, matriz intersticial	<ul style="list-style-type: none"> • Colágeno de tipo fibrilar. • Poco frecuente en dermis. • Se relaciona con el síndrome de Ehlers-Danlos.
Colágeno tipo VI	Dermis papilar, matriz intersticial.	<ul style="list-style-type: none"> • Colágeno no fibrilar. • Forma una red a nivel de la membrana basal. • Ancla el colágeno tipo IV al tipo I y tipo III en la dermis papilar.
Colágeno tipo VII	Membrana basal, dermis papilar	<ul style="list-style-type: none"> • Forma fibras de anclaje en la unión dermoepidérmica.

		<ul style="list-style-type: none"> • Se relaciona con la epidermólisis bullosa.
Colágeno tipo XII	Interfaz entre la membrana basal y la dermis papilar	<ul style="list-style-type: none"> • Asociado a colágeno fibrilar.
Colágeno tipo XIII	Superficie del queratinocito	<ul style="list-style-type: none"> • Colágeno transmembrana.
Colágeno tipo XIV	Interfaz entre la membrana basal y la dermis papilar	<ul style="list-style-type: none"> • Asociado a colágeno fibrilar.
Colágeno tipo XVII	Superficie del queratinocito	<ul style="list-style-type: none"> • Colágeno transmembrana. • Regula la proliferación de queratinocitos.
Colágeno tipo XXIII	Dermis papilar, matriz intersticial.	<ul style="list-style-type: none"> • Colágeno transmembrana.

Modificado y extraído de Pfisterer K, Shaw LE, Symmank D, Weninger W. *The Extracellular Matrix in Skin Inflammation and Infection. Front Cell Dev Biol.* 2021 Jul 6;9:682414. doi: 10.3389/fcell.2021.68241 y Uitto J, Olsen DR, Fazio MJ. *Extracellular matrix of the skin: 50 years of progress. J Invest Dermatol.* 1989 Apr;92(4 Suppl):61S-77S. doi: 10.1111/1523-1747.ep13075039. [87,89]

Las fibras elásticas son otro elemento proteico y fibroso fundamental que compone la MEC. Mientras que el colágeno es responsable de la fuerza tensil o resistencia de la piel, las fibras elásticas le confieren la elasticidad que permite que la piel vuelva a su configuración original tras ser sometida a un estímulo mecánico. La elastina y las fibrilinas son los principales componentes de las fibras elásticas de la piel. La elastina se une de forma covalente a otros elementos de la MEC, como el colágeno o las propias fibrilinas, y construyen el componente viscoelástico de la piel dando estabilidad a la matriz [89].

Finalmente, los proteoglucanos son otro elemento central de la MEC. Los proteoglucanos son macromoléculas en las que una o más cadenas de glucosaminoglucanos (polímeros lineales compuestos por repetición de unidades de disacáridos) están unidas

covalentemente a una proteína de membrana o secretada en la MEC [90]. Los proteoglucanos glucosilados forman un material amorfo que rodea al componente celular y fibroso de la MEC. Aunque solo suponen el 0,2% del peso seco de la dermis, son capaces de absorber hasta 1000 veces su volumen en agua [86], y son reguladores esenciales de la hidratación y la homeostasis iónica. Algunos ejemplos de proteoglucanos son la fibromodulina, el versicano o el agrecano. En cuanto a los glucosaminoglucanos, destaca el hialuronano o ácido hialurónico, que tiene una gran masa molecular al estar formado por hasta 50000 repeticiones de su unidad disacárida básica. Otros glucosaminoglucanos que forman parte de la MEC se diferencian del hialuronano en que son moléculas más cortas y en que están unidos de forma covalente a los proteoglucanos. Algunos proteoglucanos pueden formar agregados de enormes supramoléculas formadas por muchas proteínas unidas a un hialuronano [90].

Un esquema de los principales componentes de matriz extracelular en la piel humana se visualiza en la Figura 2.

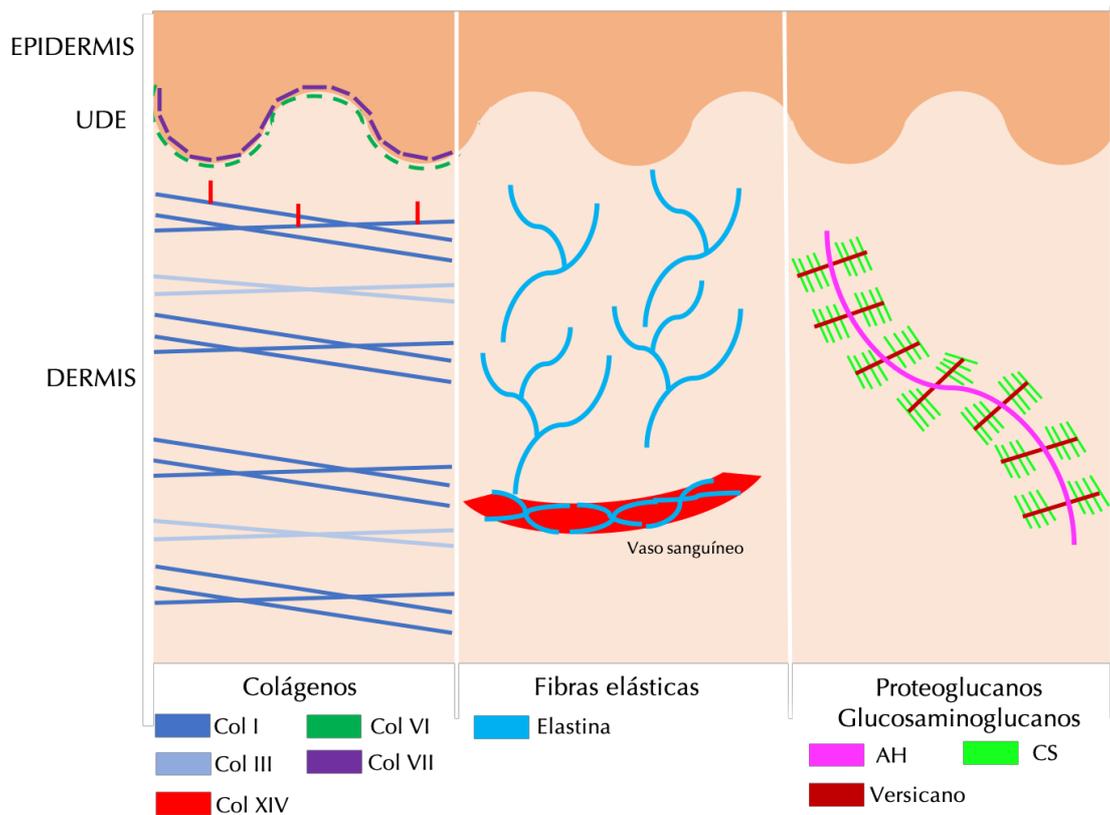


Figura 2. Esquema de los principales componentes de la matriz extracelular en la piel humana. Estas estructuras actúan como sostén y medio en el que interactúan los

elementos celulares. Abreviaturas: AH, hialurano o ácido hialurónico; Col, colágeno; CS, condroitín sulfato; UDE, unión dermoepidérmica.

1.3.5 Diagnóstico del carcinoma basocelular:

El diagnóstico del CB puede ser clínico, realizado por el facultativo directamente en la consulta apoyándose en técnicas como la dermatoscopia. En una revisión sistemática, Reiter et al. [91] describieron que el uso de la dermatoscopia incrementaba la sensibilidad en el diagnóstico del CB del 66,9% al 85%, y la especificidad del 97,2% al 98,2%. No obstante, a pesar de la utilidad de la dermatoscopia para el diagnóstico de estas lesiones, los CB muchas veces son equívocos y requieren un estudio histológico para su diagnóstico definitivo. Además, la histología es necesaria para identificar el subtipo de tumor al que nos enfrentamos y reconocer aquellos de alto riesgo para su correcto manejo.

La biopsia cutánea con el consecuente estudio histológico es el *gold standard* para el diagnóstico del CB y su correcto manejo terapéutico. Según la guía de consenso europea [4], el diagnóstico clínico y dermatoscópico sin estudio histopatológico es aceptable para tumores nodulares de pequeño tamaño en localizaciones típicas o tumores superficiales en tronco y miembros. También para CB múltiples en el caso del síndrome de Gorlin. No obstante, el estudio histopatológico será siempre necesario en el caso de lesiones ambiguas o ante tumores de alto riesgo, y será necesario una biopsia incisional antes de proceder a cirugías complejas o iniciar un tratamiento sistémico. También se recoge la necesidad de estudio anatomopatológico para confirmar las recurrencias tras la cirugía o tras tratamientos destructivos en tumores de bajo riesgo.

Sin embargo, según la guía de consenso de la Academia de Dermatología Americana [3], el diagnóstico clínico se confirma de forma rutinaria con una biopsia antes de proceder al tratamiento. El estudio histopatológico proporcionará información al clínico sobre el subtipo tumoral, para escoger el tratamiento más adecuado.

Según los resultados de la revisión sistemática de Kadouch et al. [6], las biopsias incisoriales tipo *punch* sólo son capaces de identificar el subtipo histológico de CB con una sensibilidad de entre un $\approx 60-80\%$, ya que no pueden valorar el tumor en toda su

extensión. Además, existen tumores clínicamente equívocos, que pueden llevar a realizar biopsias innecesarias a lesiones benignas. Esto incrementa los costes y la morbilidad asociados al tumor. Por ello, cada vez hay mayor interés por el desarrollo de técnicas de imagen para el diagnóstico *in vivo*; tanto para filiar de forma más eficaz el subtipo histológico del tumor (puesto que este tipo de métodos de imagen permiten analizar la lesión en toda su extensión), como para evitar biopsias innecesarias a lesiones que finalmente resultan ser benignas.

1.3.6 Tratamiento de los carcinomas basocelulares de alto y bajo riesgo:

Aunque los CB son tumores con bajo potencial de metastatizar, pueden producir una morbilidad importante. Un subgrupo de ellos presenta un comportamiento localmente agresivo e invasivo, pudiendo destruir estructuras a su alrededor como el cartílago o el hueso. El reconocimiento de estos CB de alto riesgo tiene un papel importante en la selección del tratamiento más adecuado. En la Tabla 4 se recogen los datos que nos indican tumores de alto riesgo y el tratamiento preferido en cada caso.

Tabla 4. Signos clínicos y patológicos que indican bajo o alto riesgo en CB

Tumores de bajo riesgo	Tumores de alto riesgo
<p><u>Signos de bajo riesgo</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • < 2 cm en tronco y en extremidades. • < 1 cm en mejillas, frente, cuero cabelludo y cuello. • Tumores con bordes bien definidos. • Tumores primarios. • Pacientes inmunocompetentes. • No radioterapia previa en la zona. • Tumores superficiales o nodulares. • Sin invasión perineural. 	<p><u>Signos de alto riesgo</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • ≥ 2 cm en tronco y en extremidades. • ≥ 1 cm en mejillas, frente, cuero cabelludo y cuello, zona central facial, párpados, oreja, labios y genitales. • Tumores mal definidos. • Tumores recurrentes. • Pacientes inmunocomprometidos. • Radioterapia previa en la zona. • Tumores con histología agresiva (infiltrante, micronodular...). • Con invasión perineural.
<p><u>Opciones de tratamiento indicadas</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Escisión estándar. • Tratamientos destructivos: electrocuretaje, tratamientos tópicos, terapia fotodinámica. • Radioterapia para los no susceptibles de intervención quirúrgica. 	<p><u>Opciones de tratamiento indicadas</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Cirugía micrográfica de Mohs. • Escisión con márgenes amplios. • Radioterapia para los no susceptibles de intervención quirúrgica.

Modificado de *Nehal KS, Bichakjian CK. Update on keratinocyte carcinomas. New England Journal of Medicine 2018;379:363–74. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1708701>. [2]*

La selección del tratamiento adecuado está influenciada por características del tumor y del paciente. De forma general, para los tumores de bajo riesgo la primera línea de

tratamiento es la escisión quirúrgica estándar, con márgenes de 4 a 5 mm y posterior evaluación de los márgenes quirúrgicos mediante la histopatología. Existen otras opciones terapéuticas para tumores de bajo riesgo en pacientes que no son candidatos a cirugía o que prefieren evitarla, como son las terapias tópicas con Imiquimod, con 5-fluoracilo tópico, o la terapia fotodinámica con metil-aminolevulinato o ácido 5-aminolevulínico. También existen otras técnicas destructivas, como la crioterapia y la electrocoagulación.

No obstante, en aquellos tumores con alto riesgo de recurrencia o que presentan signos clínicos o histológicos de agresividad, especialmente si se encuentran en zonas cosméticamente sensibles, el tratamiento indicado como primera línea es la cirugía micrográfica de Mohs.

1.3.7 Cirugía micrográfica de Mohs:

La cirugía micrográfica de Mohs (CMM) fue descrita por primera vez en la década de 1930 por el Dr. Frederic Edward Mohs, que la denominó quimiocirugía [92]. En la técnica original descrita por el Dr. Mohs, se aplicaba una pasta de cloruro de zinc sobre el tumor *in vivo*. Esta sustancia producía una fijación de los tejidos que mantenía la estructura microscópica. A las 24 horas se tomaba el tejido preservado y se efectuaba un mapeo gráfico marcándolo con tintes de colores para su correcta orientación. Posteriormente, con cortes histológicos se procedía a evaluar los márgenes y, en caso de que persistiesen restos de tumor, se repetía el procedimiento hasta conseguir márgenes libres. Esta técnica fue revolucionaria, pues permitía eliminar todo el tejido afecto por el tumor ahorrando la mayor cantidad posible de tejido sano.

Aunque en nuestros días la técnica se ha modernizado, el concepto sigue intacto, y se considera a la CMM como la técnica quirúrgica de primera elección para el tratamiento del CB de alto riesgo, especialmente en zonas cosméticas sensibles como la cara, puesto que permite altas tasas de curación con la máxima preservación de la piel sana. Esta técnica quirúrgica también se utiliza con éxito en otros tumores como el carcinoma epidermoide, el dermatofibrosarcoma protuberans, el léntigo maligno o la enfermedad de Paget extramamaria.

1.3.7.1 Técnica quirúrgica:

La cirugía de Mohs se realiza bajo anestesia local, con un anestésico combinado con adrenalina para que favorezca la vasoconstricción. Como paso previo a la extirpación del tumor, este puede ser cureteado en su parte visible, en lo que se conoce como citorreducción [10]. Posteriormente, se realiza una escisión con el bisturí angulado a 45 grados con respecto a la superficie de la piel. Los márgenes y la profundidad dependen de las características del tumor y también de las del paciente. Como norma general, se toman márgenes estrechos de 1 a 2 mm en áreas sensibles (como los párpados) donde se intenta preservar la mayor cantidad de tejido posible; mientras que puede realizarse la escisión con márgenes más amplios desde el inicio en tumores recurrentes o en zonas de menor riesgo.

Una vez realizada la escisión, antes de retirar el tejido, se colocan muescas de referencia desde los bordes hasta la herida (por normal general en las posiciones 12, 3, 6 y 9 de las manillas de un reloj). Este paso es fundamental para mantener la orientación anatómica. Con estos datos se realiza un diagrama o “mapa de Mohs” del defecto quirúrgico, que se usa para identificar qué borde del defecto corresponde a cada uno de los márgenes del tejido extirpado. Un ejemplo de la marcación de la muestra puede visualizarse en la Figura 3.

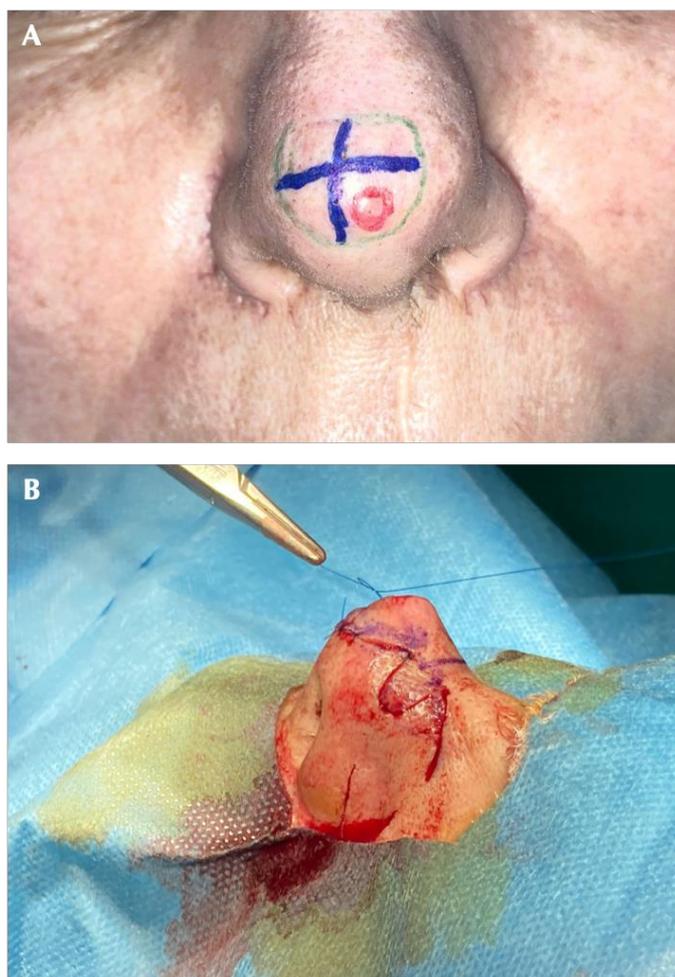


Figura 3. Cirugía de Mohs para la extirpación de un carcinoma basocelular recurrente en punta nasal. A) Mapeo prequirúrgico de la lesión a extirpar. Una vez realizada la escisión de la muestra, deben mantenerse esos puntos de referencia para poder orientar el tejido al retirarlo del resto de la piel. B) Reconstrucción del defecto con un cierre con colgajo bilobulado de doble trasposición. Para proceder al cierre del defecto, es necesario primero que el patólogo informe los márgenes de la muestra como libres. *Imágenes cedidas por cortesía del Dr. Javier J. Domínguez Cruz.*

El tejido extirpado es procesado en un laboratorio adyacente o cercano por un técnico en histología, que congela la muestra. Para poder examinar el 100% de los márgenes quirúrgicos, la muestra debe estar aplanada antes del procesamiento y orientada de forma que el borde de la piel y el margen profundo se presenten paralelos. La muestra original se subdivide durante el procesamiento en fragmentos más pequeños para que puedan realizarse cortes en el criostato y ser observados posteriormente al microscopio. En este

proceso, los fragmentos de muestras se van numerando y los bordes se codifican mediante tinciones de dos o más colores, para que la orientación anatómica no se pierda. Toda esta información se va registrando en el diagrama durante la cirugía.

Los cortes se fijan y se tiñen con H&E, y son observados al microscopio por un patólogo o, en el caso de los EE.UU., frecuentemente por el mismo cirujano dermatólogo. En el caso de que alguno de los márgenes esté afecto, se extirpa una segunda capa de tejido en esa localización exacta, sin afectar al resto tejido sano. El proceso se repite hasta conseguir que todos los márgenes se encuentren libres de tumor.

1.3.7.2 Indicación y efectividad de la cirugía de Mohs en el tratamiento del carcinoma basocelular:

En 2012, la Academia Americana de Dermatología y el Colegio Americano de Cirujanos de Mohs establecieron unos criterios de uso de la CMM [93]. En su documento de consenso, presentaron 69 escenarios clínicos de CB diferentes en atención a su histología, agresividad y localización, o a características del paciente (por ejemplo, tumores recurrentes o con subtipos histológicos de alto riesgo). Posteriormente, proponían un abordaje para cada uno de los escenarios. Según los autores, el 76,8% del total de escenarios presentados tenía indicación de cirugía de Mohs. Esto incluye todos los CB primarios o recurrentes, independientemente de su tamaño o del estado inmunológico del paciente, siempre que se encuentren en una zona de riesgo alto o medio. Las zonas de alto riesgo corresponden al área “H” facial o “zona de la máscara”: zona central del rostro, párpados, cejas, región periorbitaria, nariz, labios, barbilla, mandíbula y área auricular; así como genitales, manos y pies. Por su parte, las zonas de medio riesgo o áreas “M” incluyen mejillas, frente, cuero cabelludo, cuello y zona pretibial. La única excepción a la regla anterior serían los CB superficiales menores o iguales a 5 mm de diámetro mayor que se encuentren en áreas de riesgo de medio en pacientes inmunocompetentes.

En Europa, sin embargo, las indicaciones de CMM son más restrictivas. La Sociedad Europea de Cirugía Micrográfica (ESMS, de sus siglas en inglés: *European Society of Micrographic Surgery*) en su documento de posicionamiento sobre CMM de 2019 recogía las indicaciones de este procedimiento más habituales en Europa [94]. En nuestro

continente, la CMM se reserva para los CB de alto riesgo de cabeza y cuello, especialmente si cumplen alguno de los siguientes criterios:

- Localización en la zona central de la cara o área H (independientemente del tamaño del tumor). También aquellos que se encuentren en cualquier zona que sea sensible y en la que sea importante ahorrar tejido sano.
- Tumores mayores o iguales a 2 cm.
- Tumores recurrentes.
- Tumores extirpados de forma incompleta.
- Márgenes mal definidos.
- Tipos histológicos de alto riesgo (como los CB morfeiformes, infiltrantes, micronodulares y basoescamosos).
- Tumores con infiltración perineural o afectación vascular.

En estos casos, en los que el riesgo de recurrencia o la agresividad de los tumores son altos, la CMM se considera el tratamiento de primera línea por sus altas tasas de efectividad.

Múltiples estudios han analizado la eficacia de la cirugía de Mohs en el tratamiento del CB. El primer ensayo clínico aleatorizado que comparó el tratamiento del CB primario y recurrente con CMM *versus* escisión estándar fue realizado en 2004 [95]. En este estudio las tasas de recurrencia de CB fueron más bajas si habían sido tratados con CMM, aunque las diferencias no fueron significativas. Sus resultados fueron actualizados a los 5 años [96] y a los 10 [9]. En este último análisis, Van Loo et al. analizaron un total de 408 CB primarios faciales de alto riesgo (diámetro ≥ 1 cm, ubicación en zona H facial o subtipo histológico de riesgo) y 204 CB faciales recurrentes. Los autores describieron que en aquellos casos de CB facial primario, la recurrencia a los 10 años era de un 4,4% en el caso de haber sido tratado con CMM, y de un 12,2% para tumores extirpados con escisión simple. A pesar de que las tasas de recurrencia tras cirugía de Mohs fueron más bajas que las de las escisiones simples, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p=0,1$). Sin embargo, en el caso de los CB recurrentes, las tasas de recurrencia a los 10 años fueron del 3,9% en el caso de la CMM y del 13,5% en el de la escisión estándar, siendo en este caso una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,023$).

Las tasas de recurrencia tras la CMM parecen estar influenciadas por factores histológicos, como el subtipo tumoral, y más concretamente por la invasión perineural. En una serie australiana de 3020 CB, Leibovitch et al. [97] analizaron la relación entre la invasión perineural y el riesgo de recurrencia tras una CMM. De los 3020 pacientes incluidos, 78 presentaron invasión perineural *versus* 2942 que no la presentaron. Tras un periodo de seguimiento de 5 años, 6 (7,7%) pacientes con invasión perineural presentaron recurrencia de su CB y 72 (2,4%) del grupo sin invasión perineural recurrieron, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p=0,03$).

A pesar de los casos de recurrencia, la CMM al controlar el 100% de los márgenes de la lesión ofrece mejores resultados de curación a largo plazo que la escisión habitual, y además permite ahorrar tejido sano en localizaciones sensibles como la cara. Es por ello que es considerada como la primera línea para el tratamiento de CB de alto riesgo y recurrente en las guías de práctica clínica [3].

1.3.7.3 Limitaciones de la cirugía de Mohs:

La CMM presenta una serie de limitaciones que dificultan su implementación en muchos centros en nuestros días. La más importante de ellas es que esta técnica quirúrgica es extremadamente laboriosa, al ir eliminando el tumor capa por capa. Cada una de las capas extirpadas se congela y debe ser evaluada al microscopio, requiriendo entre 20-45 minutos por escisión [11]. Un procedimiento habitual en cirugía de Mohs puede requerir de dos a cuatro horas, y los pacientes deben ser informados de que la cirugía puede prolongarse incluso más tiempo, dependiendo de cuántos pases se requieran hasta que los márgenes queden libres de tumor [98]. Esto hace que sea imprescindible la colaboración del paciente, que debe permanecer con la herida sin reconstruir hasta que se asegure la eliminación completa del tumor. Por ello, no es una técnica recomendable para pacientes que por problemas médicos o de otra índole no puedan permanecer a la espera.

Además de requerir gran cantidad de tiempo, la CMM requiere una gran inversión de recursos humanos: un cirujano altamente calificado que conozca la técnica, un anatomopatólogo en el caso de que el propio cirujano no sea capaz de interpretar las imágenes, un técnico de laboratorio que sea capaz de procesar tejido congelado, un

laboratorio adyacente o cercano al quirófano, personal de enfermería con entrenamiento específico, entre otros. Todo esto incrementa notablemente el costo de la cirugía. En la actualidad, es controvertido si la CMM es costo-eficiente [99,100]. Además, esto es complejo de cuantificar y generalizar, puesto que los costos e indicaciones del procedimiento difieren notablemente de un país a otro.

Finalmente, otra limitación de la técnica es el uso de secciones de tejido fijadas mediante congelación, más complejas de interpretar que las secciones permanentes fijadas en parafina [101]. La obtención de cortes histológicos en parafina puede requerir hasta 24 horas en su elaboración [98], por lo que habitualmente en cirugía de Mohs se fija el tejido mediante congelación, que en su lugar requiere entre unos 20-45 minutos [11], como ya se ha mencionado. No obstante, la congelación causa destrucción de los tejidos y puede crear artefactos que dificultan el diagnóstico final.

Por todo lo anterior, ha cobrado interés recientemente el desarrollo de técnicas de imagen que permitan visualizar los tejidos sin procesamiento de los mismos, de forma que puedan aplicarse durante la CMM para acelerar el proceso.

1.3.8 Fundamentos de la microscopía multifotón:

La MMF abarca a un grupo de modalidades de microscopía que se caracterizan por un proceso óptico no lineal en el que se utilizan dos o más fotones de baja energía que se absorben de forma casi simultánea, con emisión posterior de un solo fotón [20]. En los últimos años, la MMF ha surgido como una nueva herramienta con gran potencial para explorar los organismos vivos y dinámicos. Concretamente, en el campo de la dermatología la MMF es una tecnología muy prometedora, por su capacidad de ser aplicada directamente *in vivo* sobre la piel estimulando fluoróforos endógenos y por ello, sin requerir tinciones exógenas.

La MMF se basa en la excitación de las muestras mediante dos o más fotones de baja energía. Cuando un átomo o molécula absorbe un fotón de luz a una longitud de onda específica, un electrón puede pasar de su estado fundamental (S_0) a un estado excitado (S_1). Al recuperar su estado fundamental, se emite un fotón que tiene menor energía (por

lo tanto, una longitud de onda más larga) que el fotón absorbido inicial, en un fenómeno fundamental en microscopía que se conoce como fluorescencia. En la fluorescencia convencional, los fluoróforos absorben un fotón que es el causante de la excitación del electrón. Sin embargo, en las técnicas de MMF, láseres de pulsos muy cortos (femtosegundos) y espectro cercano al infrarrojo, se usan para la excitación de las moléculas mediante la aplicación de dos (o más) fotones [102]. Dentro de estas técnicas de imagen, la más frecuente es la microscopía de emisión de dos fotones (MEDF), que se basa en la excitación no lineal de fluoróforos endógenos a través de la absorción de dos fotones con largas longitudes de onda. Estos fotones de larga longitud de onda no tendrían energía suficiente para excitar de forma aislada a un electrón, pero al combinarse entre ellos sí son capaces de elevar al electrón al estado de excitación, y producir una señal de fluorescencia [20]. En la Figura 4 vemos un diagrama de Jablonski que muestra las diferencias entre la excitación con uno o dos fotones.

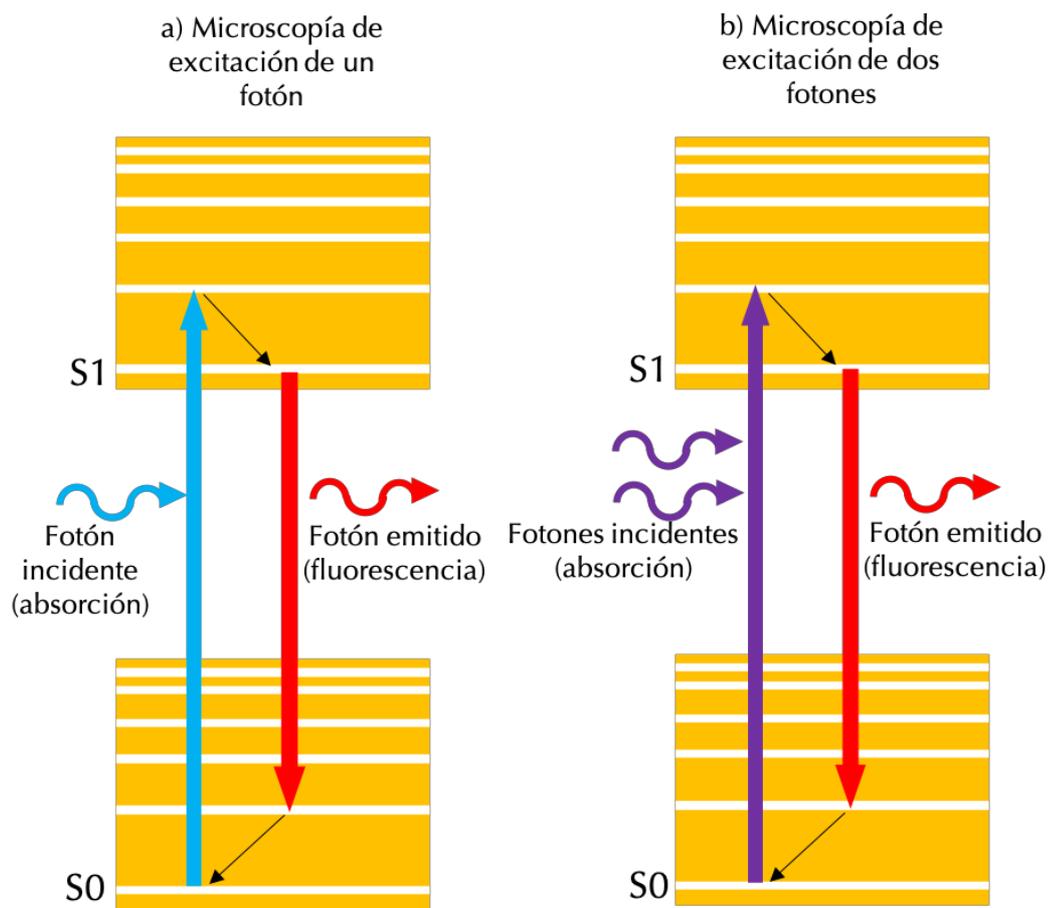


Figura 4. Diagrama de Jablonski (*Página anterior*). A) Microscopía de excitación de un fotón: un único fotón excita al electrón en estado basal (S0) para pasar al estado excitado (S1). B) Microscopía de excitación de dos fotones: dos fotones de baja energía de forma combinada consiguen elevar al electrón al estado de excitación.

1.3.8.1 Historia de la microscopía de excitación de dos fotones:

María Goeppert-Mayer (1906–1972) fue la segunda mujer en la historia en recibir un premio Nobel en física por su trabajo sobre el modelo de capas nuclear [103]. En su tesis doctoral en 1931 predijo, desde un punto de vista teórico, el efecto de la estimulación mediante dos fotones.

Para estimular la transición electrónica mediante dos fotones, estos deben llegar al fluoróforo con una diferencia de un attosegundo (10^{-18} segundos) entre ellos. Este evento es muy improbable, y es por ello por lo que la microscopía de fluorescencia multifotón requiere que el flujo de fotones sobre las moléculas sea extremadamente grande [104]. Por tanto, no fue hasta muchos años después con el desarrollo de sistemas láseres más potentes (generalmente de femtosegundos y pulsado ultracorto), cuando pudieron comprobarse las tesis de María Goeppert-Mayer. En 1990, Winfried Denk y James Strickler en el laboratorio de Watt W. Webb en la Universidad de Cornell combinaron la idea de la excitación de dos fotones con el uso de un escáner láser, siendo los pioneros en la aplicación de esta tecnología [14].

1.3.8.2 Características de la microscopía de excitación de dos fotones:

La MEDF es la forma más frecuente de MMF, y permite la visualización de las capas profundas de los tejidos vivos, incluyendo la piel. Como se ha descrito anteriormente, esta tecnología se basa en la foto-excitación no lineal de las moléculas, en la que dos fotones de baja energía son absorbidos de forma casi simultánea en un mismo plano focal, produciendo la emisión de fluorescencia por parte de los tejidos. Los microscopios multifotón incluyen un láser en el espectro infrarrojo, siendo los más usados los láseres de titanio:zafiro (Ti:Sa) o los de neodimio:YAG (Nd:YAG) con duraciones de pulso

cortas, de los 100 a los 200 femtosegundos. También se han usado láseres de nanosegundos o picosegundos, pero con menor frecuencia [105]. La longitud de onda usada en estos microscopios tradicionalmente oscila entre 740 y los 810 nm, aunque depende de la aplicación a la que vaya dirigida.

La visualización directa de la piel mediante MMF es posible gracias a las señales que provienen de fluoróforos endógenos como la NADH, la melanina, la elastina o las queratinas [21]. De esta forma, para visualizar la piel mediante MMF no es necesario añadir agentes exógenos de contraste, puesto que la fluorescencia proviene de la estimulación directa de las propias moléculas que componen este órgano.

Más allá de las señales autofluorescentes, una ventaja de la MMF es que permite detectar una segunda señal proveniente de moléculas de la matriz extracelular. Esta señal se conoce como generación de segundo armónico (GSA). La GSA se produce tras la estimulación de las estructuras biológicas no centrosimétricas, que generan fotones que presentan exactamente la mitad de la longitud de onda de los fotones incidentes. Así, mediante la GSA podemos obtener información arquitectural sobre componentes no centrosimétricos de la MEC, como el colágeno o la miosina [22]. Además, dado que la señal correspondiente a la GSA es fácilmente identificable (por presentar una longitud de onda que corresponde a la mitad de la de los fotones que excitan la muestra), puede ser fácilmente aislada de la señal autofluorescente. De esta forma, gracias al aislamiento de la GSA se pueden analizar y cuantificar específicamente elementos de la MEC. Esto supone una gran ventaja de la MMF, que permite discriminar entre las señales que provienen de elementos como la elastina (autofluorescente) o el colágeno (que genera GSA). En el caso del colágeno, son los colágenos tipo I fundamentalmente, y también otros como el tipo II, aquellos que por su distribución espacial fibrilar son responsables de la GSA. Por el contrario, el colágeno tipo IV, que es fundamentalmente un componente de la membrana basal, no tiene estructura fibrilar y no produce GSA suficiente para generar las imágenes [106].

1.3.8.3 Diferencias entre la microscopía multifotón y otras técnicas de imagen para el estudio de la piel:

En la actualidad, existen múltiples tecnologías de la imagen que se están empleando en el campo de la dermatología para mejorar la capacidad diagnóstica en lesiones de la piel. Además de la MMF, destacan la microscopía confocal de reflectancia (MCR) y la tomografía de coherencia óptica (TOC).

Desde hace más de veinte años existen dispositivos disponibles comercialmente y diseñados para ser aplicados en la clínica en el caso de la MCR; y desde hace unos 10 años en el caso de la MMF y la TOC [25]. Sin embargo, siguen siendo pocos los dermatólogos que son capaces de interpretar correctamente este tipo de imágenes, por lo que la implementación de estas tecnologías en práctica clínica real sigue siendo muy baja. Para facilitar la incorporación de esta tecnología a la *praxis* del dermatólogo, es importante que los facultativos conozcan los fundamentos de estas nuevas tecnologías y el tipo de imagen que proporcionan.

En la microscopía con excitación a través de un único fotón (como la que ocurre en microscopía confocal), la relación entre la amplitud de emisión y de excitación es lineal. Sin embargo, en MMF la interacción entre los fotones y la molécula es no lineal, lo que proporciona a esta tecnología una serie de ventajas. La MMF permite, mediante el uso de fotones del espectro infrarrojo con gran longitud de onda, mayor penetración en los tejidos por la menor difracción de la luz en comparación a la microscopía confocal [20]. El microscopio confocal se basa en el uso de un diafragma con un orificio o *pinhole*, que permite sólo el paso de la luz retro-reflejada desde un único plano focal deseado de la piel, bloqueando la luz que proviene de fuera de dicho plano. Al bloquear la luz que proviene de fuera del plano focal, el microscopio confocal puede alcanzar una resolución lateral del hasta 1 μm [107]. Sin embargo, una limitación de esta técnica aplicada a la piel es su restringida profundidad de penetración (en torno a las 200 μm), que permite visualizar únicamente epidermis y dermis papilar superficial. Por el contrario, la MMF permite obtener imágenes a una profundidad de hasta 500 μm [104]. Además, el microscopio multifotón no requiere orificio de entrada que filtre la luz del plano focal, puesto que la excitación fuera del plano focal es demasiado débil para causar una

fluorescencia apreciable; siendo esta otra ventaja de la técnica, pues produce baja fototoxicidad fuera de este plano [108].

Por su parte, la tomografía óptica computarizada (TOC) es una técnica de imagen óptica interferométrica que puede generar imágenes tridimensionales (3D) de un tejido, gracias a la luz retro-reflejada y dispersada. Esta tecnología funcionaría de una forma similar a los ultrasonidos, pero en este caso mediante una luz en torno a los 1300 nm de longitud de onda que sustituiría a la emisión de los ultrasonidos [25]. Como consecuencia, la resolución de la TOC es generalmente mayor que la de la ecografía, pero su capacidad de penetración en la piel es menor (en torno a 1-2 mm) [109]. Además, el uso de la tecnología Doppler permite la visualización de partículas en movimiento, permitiendo la visualización *in vivo* del flujo sanguíneo en el interior de los vasos sanguíneos [110].

Las principales ventajas y limitaciones de estas nuevas tecnologías quedan recogidas en la Tabla 5.

Tabla 5. Ventajas y limitaciones de la microscopía multifotón, la microscopía confocal de reflectancia y la tomografía óptica de coherencia en el estudio de la piel

	MMF	MCR	TOC
Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> Alta capacidad de penetración en los tejidos (en torno a los 500 μm). Resolución cercana a la histología. Escasa fototoxicidad y bajo fotoblanqueo fuera del plano focal de la imagen. Posibilidad de visualizar los tejidos sin contrastes exógenos. Posibilidad de distinguir diferentes elementos moleculares extra e intracelulares y estudiar el metabolismo celular. 	<ul style="list-style-type: none"> Capacidad de escanear áreas amplias de tejido (8x8 mm^2). Alta velocidad en la obtención de imágenes. 	<ul style="list-style-type: none"> Alta capacidad de penetración en los tejidos (en torno a 1-2 mm). Capacidad de obtener imágenes verticales y horizontales (3D). Posibilidad de usar tecnología Doppler para visualizar partículas en movimiento (ej. flujo sanguíneo). Alta velocidad en la obtención de imágenes.
Limitaciones	<ul style="list-style-type: none"> Potencial fototoxicidad en el plano focal tras un tiempo largo obteniendo imágenes. Baja velocidad en la obtención de imágenes. Pequeño campo de visión. Alto precio del instrumental. Alto nivel de especialización necesario para interpretar las imágenes. 	<ul style="list-style-type: none"> Penetración limitada en los tejidos (en torno a los 200 μm). No permite visualizar contrastes a nivel molecular. Alto nivel de especialización necesario para interpretar las imágenes. 	<ul style="list-style-type: none"> Baja resolución espacial lateral. No permite visualizar contrastes a nivel molecular. Alto nivel de especialización necesario para interpretar las imágenes.

Modificado de Obeidy P, Tong PL, Weninger W. *Research Techniques Made Simple: Two-Photon Intravital Imaging of the Skin. J Invest Dermatol. 2018 Apr;138(4):720-725. doi: 10.1016/j.jid.2018.01.017*, y Lentsch G, Baugh EG, Lee B, Aszterbaum M, Zachary CB, Kelly KM, Balu M. *Research Techniques Made Simple: Emerging Imaging Technologies for Noninvasive Optical Biopsy of Human Skin. J Invest Dermatol. 2022 May;142(5):1243-1252.e1. doi: 10.1016/j.jid.2022.01.016. [25,108]*

CAPÍTULO 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis:

La microscopía multifotón puede proporcionar datos cuantitativos sobre el colágeno que forma parte del estroma del CB, y de esta forma facilitar el diagnóstico de estos tumores ayudando a distinguirlos tanto de estructuras normales de la piel (epidermis, glándulas sebáceas, folículos pilosos) como de lesiones cutáneas benignas. Así mismo, el análisis cuantitativo del colágeno puede ayudar a identificar los subtipos histológicos de CB de más alto riesgo.

2.2 Objetivos:

Principal:

1. Analizar de forma cuantitativa el colágeno del estroma que rodea al CB en imágenes de microscopía multifotón *ex vivo*.

Secundarios:

2. Comparar parámetros cuantitativos del colágeno del estroma que rodea al CB con los parámetros del colágeno que rodea estructuras normales de la piel (epidermis, glándulas sebáceas, folículos pilosos).
3. Comparar parámetros cuantitativos del estroma que rodea al CB con los parámetros del colágeno que rodea lesiones benignas de la piel (queratosis seborreicas, queratosis liquenoides y queratosis actínicas, entre otras).
4. Conocer las diferencias cuantificables entre el colágeno que rodea los diferentes subtipos histológicos de CB.

CAPÍTULO 3. MÉTODOS

3. MÉTODOS

3.1 Diseño general del estudio:

Estudio observacional transversal unicéntrico sobre una base de datos previamente anonimizada de pacientes intervenidos en el Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSKCC) de Nueva York (EE.UU.) entre enero y diciembre de 2019.

3.2 Muestras y pacientes incluidos en estudio:

Se utilizó la base de datos del Departamento de Dermatología del hospital MSKCC para seleccionar casos con confirmación histológica de CB (subtipos superficial, nodular, infiltrativo o mixto) y de lesiones benignas que fueran semejantes al CB desde un punto de vista clínico (queratosis actínica, queratosis seborreica, queratosis liquenoide, tricoepitelioma desmoplástico, angiofibroma y adenoma sebáceo).

Con autorización del Comité de Ética de la Investigación de dicho centro se accedió a las muestras parafinadas almacenadas para extraer cortes consecutivos para nuestro estudio. Los bloques de tejido fijados en formalina e incluidos en parafina se recogieron del Departamento de Dermatopatología del hospital MSKCC. De estos bloques se cortaron dos secciones consecutivas finas, de 5 μm . Una de ellas se tiñó con H&E siguiendo el protocolo habitual y la sección consecutiva se utilizó sin teñir para ser visualizada directamente en el microscopio multifotón.

Estas muestras pertenecían a 64 pacientes intervenidos quirúrgicamente por diferentes lesiones en el MSKCC, entre enero y diciembre de 2019. Todos los pacientes habían firmado el consentimiento informado de la intervención y del uso anonimizado de sus datos para investigación y fines académicos.

Los criterios de inclusión en el estudio fueron los siguientes:

- Pacientes ≥ 18 años de edad.
- Pacientes tratados mediante cirugía de Mohs o biopsiados mediante biopsia incisional, escisional o tipo *punch*.
- Pacientes con diagnóstico anatomopatológico mediante H&E de CB (subtipos superficial, nodular, infiltrativo o mixto) y/o de otras lesiones benignas que pueden simular un CB (queratosis actínica, queratosis seborreica, queratosis liquenoide, tricoepitelioma desmoplástico, angiofibroma y adenoma sebáceo).
- Pacientes que habían firmado el consentimiento informado para el procedimiento y estudio de sus datos.

Los criterios de exclusión fueron:

- Pacientes menores de edad.
- Pacientes con diagnóstico clínico o mediante pruebas de imagen, pero sin confirmación anatomopatológica.
- Pacientes con otros tumores malignos no basocelulares.

Las características demográficas de los pacientes incluidos en el estudio pueden consultarse más adelante en la sección de resultados.

3.3 Protocolo de adquisición de las imágenes de microscopía multifotón:

Como paso previo a la adquisición de imágenes con el microscopio multifotón, las muestras que habían sido teñidas mediante H&E se escanearon digitalmente usando el Aperioscanscope slide scanner (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). Tras la digitalización de las imágenes, se realizaron anotaciones en cada uno de los casos incluidos en el estudio, identificándose las áreas con estructuras de interés e incluyéndose en las zonas seleccionadas parte del tejido conectivo adyacente para estudiar el colágeno. Las áreas de interés seleccionadas incluían fragmentos de CB, lesiones benignas y estructuras cutáneas normales (folículos pilosos, glándulas sebáceas y epidermis) con el correspondiente colágeno contiguo a ellas. Estas anotaciones en las imágenes de H&E fueron usadas como guía o “mapa” para identificar el área correspondiente en las

secciones consecutivas no teñidas, que se utilizaron para ser visualizadas mediante el microscopio multifotón. Un ejemplo de estos mapas de H&E que se usaron para orientar la obtención de las imágenes de MMF puede observarse en la Figura 5.

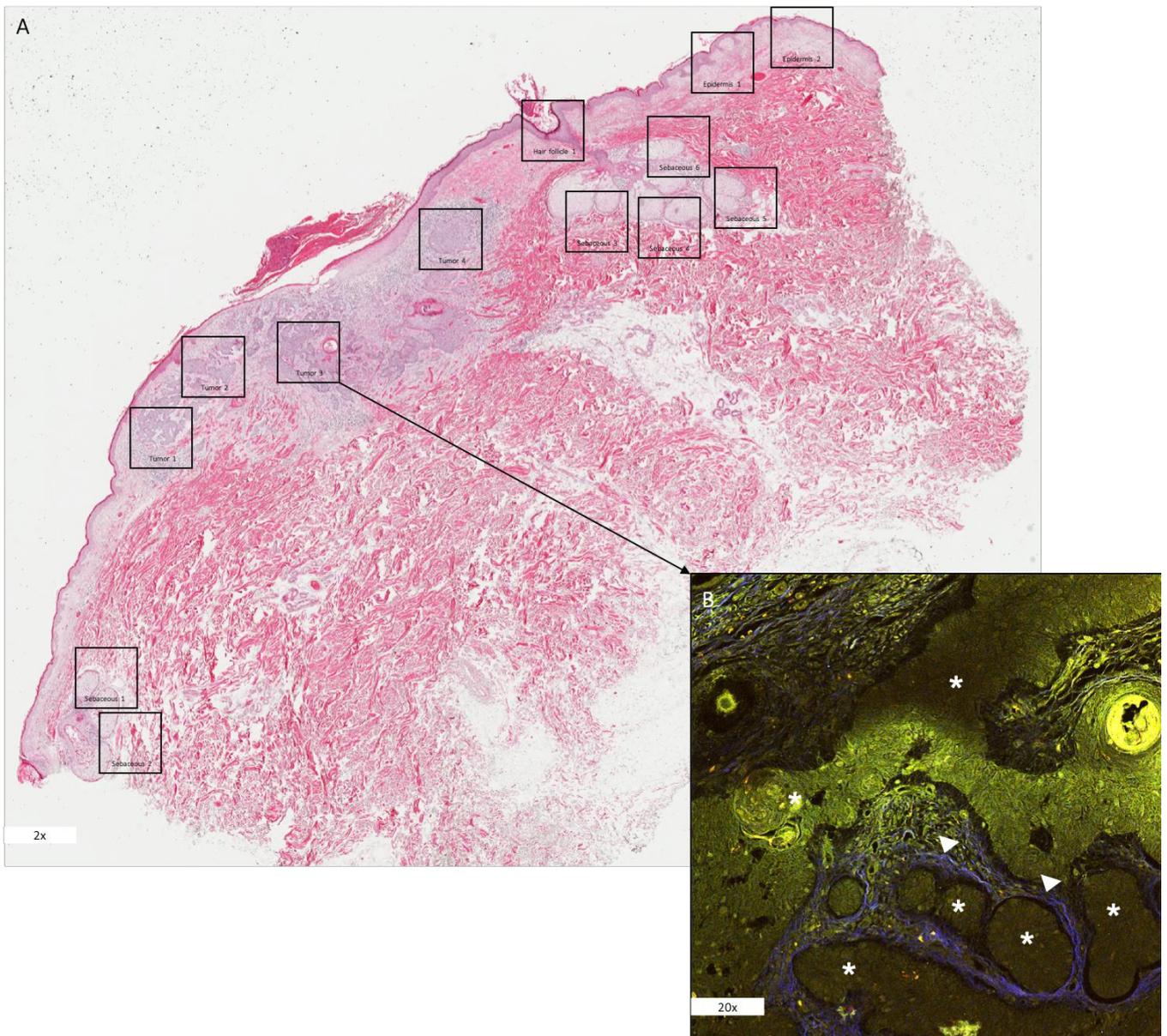
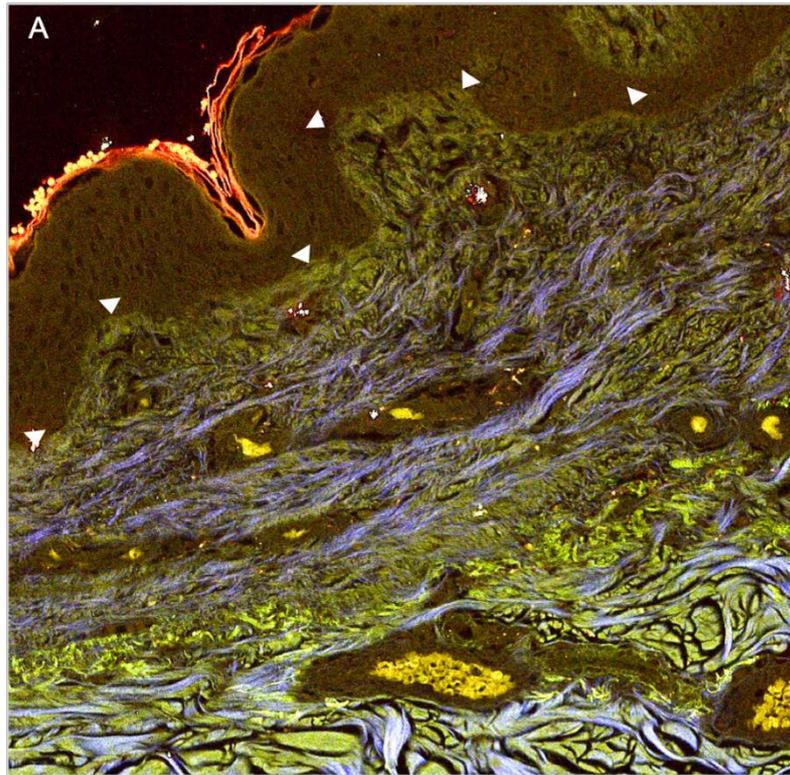


Figura 5. Mapa de H&E usado para identificar las áreas de interés en las imágenes posteriores de microscopía multifotón. A) Ejemplo de muestra teñida con H&E y utilizada como mapa para identificar posteriormente las áreas de interés en la imagen sin teñir visualizada al microscopio multifotón. Las áreas marcadas con un cuadrado negro fueron seleccionadas por corresponder a alguna de las estructuras de interés del estudio.

Nótese que el tejido conectivo adyacente a las estructuras fue parcialmente incluido en las imágenes seleccionadas, para poder analizar los haces de colágeno. Aumento de la imagen: 2x. B) Ejemplo de imagen de CB visualizado mediante MMF. Las imágenes de MMF se tomaron de la sección adyacente no teñida, usando como guía las H&E previas ejemplificadas en la imagen A. Los asteriscos blancos marcan los nidos y cordones tumorales. En azul y señalado por las puntas de flechas blancas se muestra el colágeno que rodea al tumor. Aumento de la imagen: 20x.

Las imágenes de MMF se realizaron con el microscopio multifotón comercial Leica SP8 Confocal/Multiphoton microscope, situado en el Departamento de Bioquímica de la Universidad Cornell de Nueva York (EE.UU.). Se seleccionaron parámetros customizados para la realización de MEDF y GSA. Se utilizó un láser de 785 nm para la excitación de las muestras. Se emplearon diferentes filtros de emisión de paso de banda: 435-485 nm (se le asignó el color verde), 510-560 nm (color amarillo) y 612-687 nm (color rojo), que se usaron para captar las señales autofluorescentes. También se utilizó un filtro de emisión de paso de banda de 360-400 nm (color azul) para aislar la señal de GSA, proveniente fundamentalmente del colágeno tipo I. Se utilizó un objetivo 20x sin inmersión, con un área aproximada de 553x553 micrómetros y con una resolución de 0.5 micron/pixel. En la Figura 6 se muestra un ejemplo de las imágenes obtenidas fusionando las señales autofluorescentes con la GSA, o de forma selectiva tras seleccionar el filtro que aísla la GSA.

MEDF
Autofluorescencia
435-485 nm
(verde)
510-560 nm
(amarillo)
612-687 nm (rojo)
GSA
360-400 nm (azul)



GSA
360-400 nm (azul)

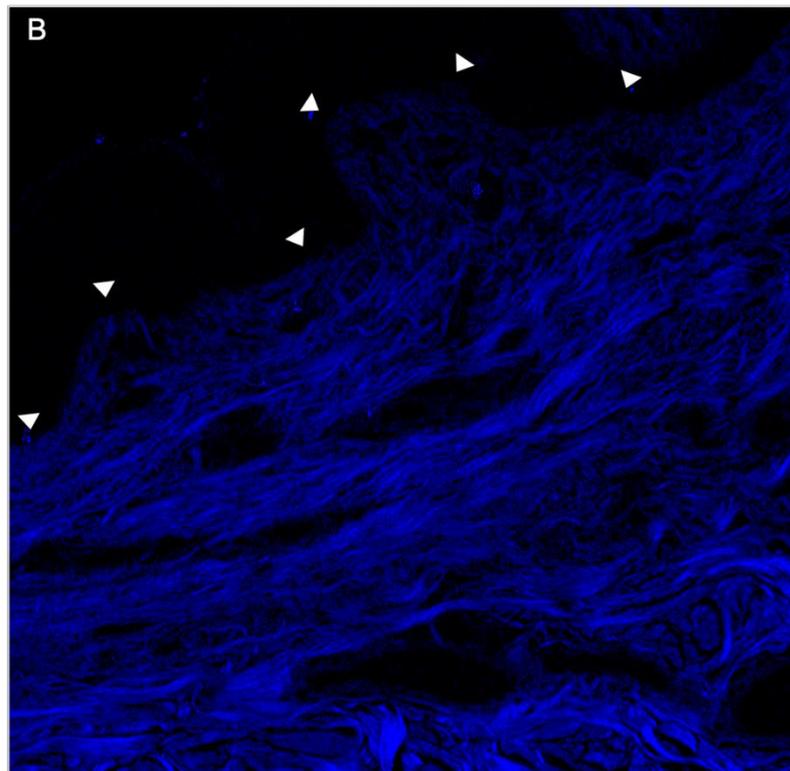


Figura 6. Imágenes de microscopía multifotón: señales de MEDF y de GSA. A) Imagen de un fragmento de epidermis visualizado mediante MEDF. Las señales autofluorescentes fueron recogidas mediante diferentes filtros de emisión de paso de banda: 435-485 nm, verde; 510-560 nm, amarillo; 612-687 nm, rojo; y la señal de GSA

fue captada por el filtro de 360-400 nm y codificada como azul. B) Misma imagen correspondiente a la señal de GSA aislada. Con las puntas de flecha blancas se muestra la unión dermoepidérmica. Aumento de las imágenes: 20x.

De cada una de las secciones de tejido fresco no teñido se obtuvieron mediante estos parámetros múltiples imágenes individuales, tanto de fragmentos de CB como de las lesiones cutáneas benignas incluidas, así como también de las estructuras cutáneas normales (glándulas sebáceas, folículos pilosos y epidermis), usando como guía las anotaciones en las imágenes provenientes de las secciones teñidas con H&E (como se ejemplifica en la Figura 5). También se anotaron áreas de interés correspondientes al colágeno para su posterior análisis con los softwares CurveAlign y CT-FIRE (LOCI, EE.UU.).

Finalmente, de cada una de las imágenes individuales se obtuvieron 5 planos cambiando la profundidad en el eje Z (5 imágenes *z-stack*). Para obtener la máxima información en la imagen final proveniente de todos estos planos, se fusionaron los 5 en una imagen final mediante la herramienta *Maximum Projection tool* en el software ImageJ (NIH, EE.UU.).

3.4 Análisis cuantitativo del colágeno:

Se realizó un análisis de tipo cuantitativo sobre el colágeno en las imágenes, seleccionando la señal proveniente del colágeno mediante el filtro que aislaba la señal de GSA. A continuación, se describen los diferentes parámetros analizados.

3.4.1 Análisis de energía en una banda de frecuencias en el dominio de Fourier:

Se utilizó el software ImageJ para realizar medidas cuantitativas del colágeno usando la Transformada rápida de Fourier (conocida por la abreviatura FFT, del inglés *Fast Fourier Transform*). La FFT es un algoritmo que permite la conversión de imágenes para facilitar su análisis cuantitativo, y que se ha usado para el estudio de la simetría y organización de las fibras de colágeno en la piel [111,112]. La FFT proporciona una densidad espectral

de energía en dos dimensiones, que nos informa de la energía de la señal sobre las diferentes frecuencias de las que está formada. Usando este algoritmo obtenemos información sobre la distribución espacial de las fibras de colágeno en cada una de las imágenes. Un ejemplo de las imágenes obtenidas al aplicar la FFT sobre las imágenes de GSA se observa en la Figura 7.

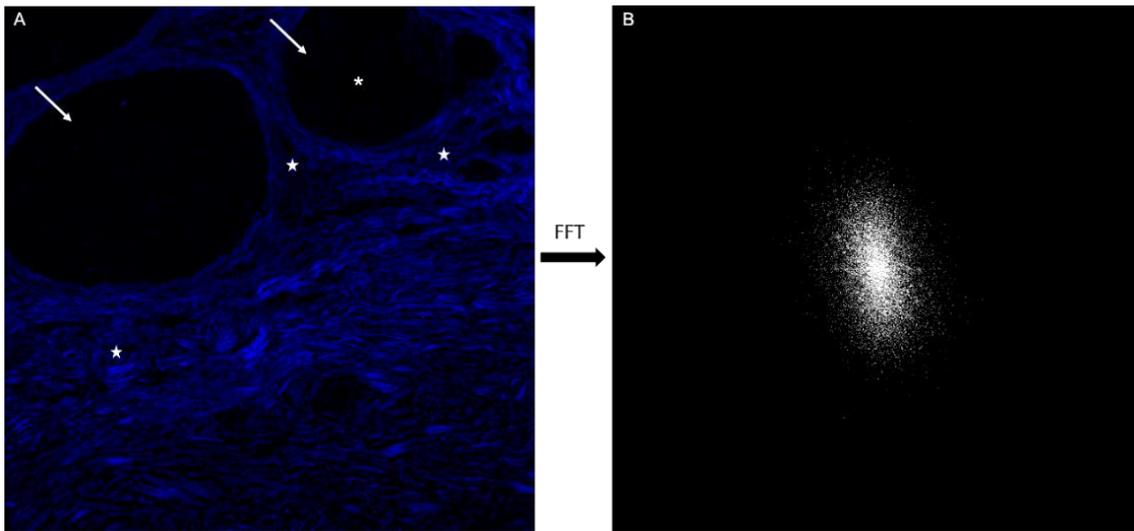


Figura 7. Aplicación de la FFT sobre una imagen de GSA de un carcinoma basocelular nodular. A) Ejemplo de imagen de GSA de un CB de subtipo nodular. Las flechas blancas muestran las zonas oscuras que corresponderían a los nódulos tumorales, que no emiten señal de GSA y por ello se muestran oscuros; por su parte, las estrellas blancas señalan los haces de colágeno dispuestos alrededor de las masas tumorales, responsables de generar la señal de GSA tras ser estimulados por el láser del microscopio. Aumento de la imagen: 20x. B) Diagrama obtenido tras aplicar la FFT en la imagen anterior. La aplicación del algoritmo sobre las imágenes proporciona un diagrama de dos dimensiones que contiene información sobre la distribución espacial de los elementos de la imagen de la que procede.

En los diagramas en 2D obtenidos tras la aplicación de la FFT sobre las imágenes de colágeno, cuando las fibras de colágeno están aleatoriamente distribuidas en cualquier dirección del espacio la energía en la banda de frecuencias de la representación del dominio de Fourier se distribuye isotópicamente. Como consecuencia, el diagrama obtenido es similar a una figura circular. Sin embargo, cuando las fibras están alineadas

en cierta dirección, la distribución de la energía será anisotrópica, y en consecuencia el diagrama final obtenido tendrá una imagen más alargada o elíptica (véase más adelante un ejemplo en la Figura 8).

Para la cuantificación objetiva de los diagramas de la FFT, se utilizaron dos tipos de índices: índice de orientación del colágeno (IOC) y el índice de empaquetamiento de los haces de colágeno (EHC) [112,113]. El IOC se define por la relación entre el eje corto y el eje largo del lóbulo central de los diagramas. Se define por la fórmula matemática:

$$\text{IOC} = [1 - (\text{eje corto} / \text{eje largo})]$$

Donde la longitud de los ejes se mide en píxeles en las imágenes. IOC igual a cero representa un comportamiento perfectamente isotrópico de todas las fibras de colágeno, es decir, que todas las fibras se distribuyen de una forma completamente aleatoria. Un diagrama de FFT con una figura circular presentará a un IOC de valor bajo (cerca de 0), indicando que las fibras se distribuyen al azar en la imagen de GSA inicial. Por el contrario, un valor de IOC igual a 1, indica que todas las fibras se distribuyen de una forma perfectamente paralela. Así, un diagrama de FFT con una figura tendente a la elipse, presentará un IOC de valor alto (más cercano a 1), indicando que las fibras tienden a estar orientadas de forma paralela en alguna dirección.

Por su parte, el índice de empaquetamiento de los haces de colágeno (EHC) representa la periodicidad de los haces de colágeno. Se expresa como:

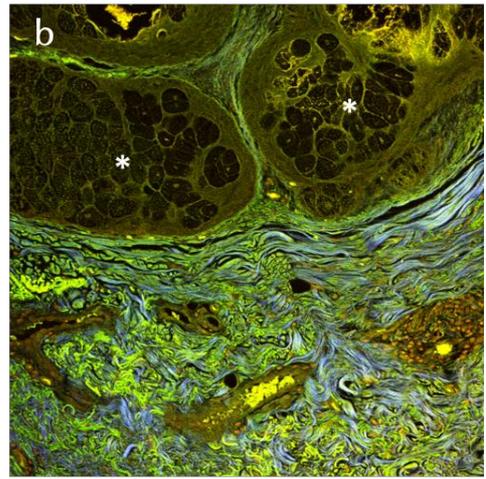
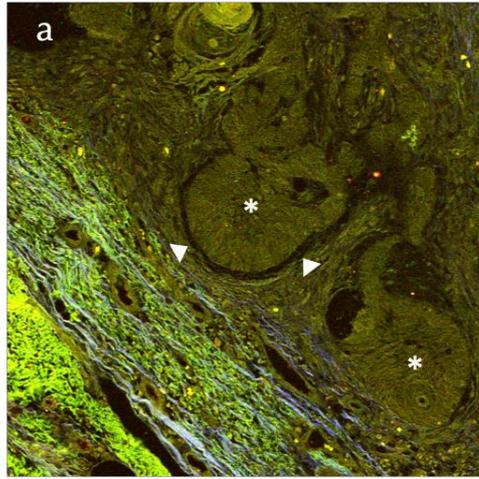
$$\text{EHC} = 1024 * (1/h)$$

Donde h representa la distancia en píxeles entre los centros de gravedad de los máximos de primer orden en la versión en 3D de la densidad espectral de energía, en la que el eje Z muestra la amplitud de la señal. Así, una h o distancia mayor resultará en un EHC menor, lo que indica que los centros de gravedad de los haces de colágeno son más cercanos y por tanto que dichos haces se organizan de una forma más compacta. En la Figura 8 se recogen ejemplos representativos de las imágenes utilizadas para realizar el análisis cuantitativo y la aplicación de las mediciones en ellas.

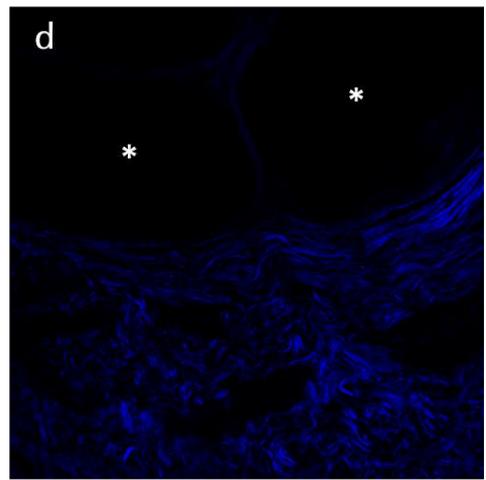
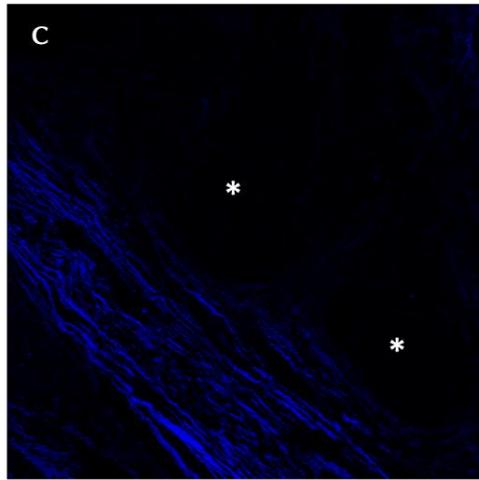
Carcinoma basocelular

Glándula sebácea

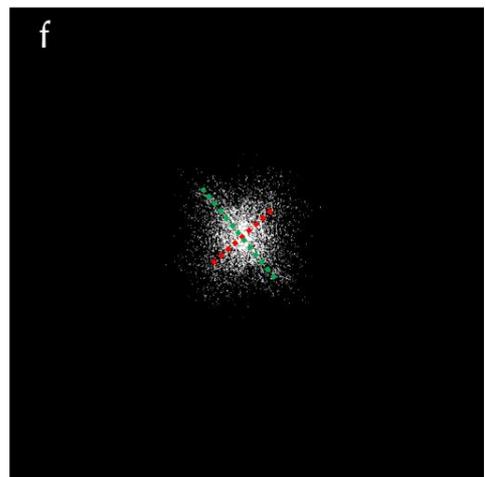
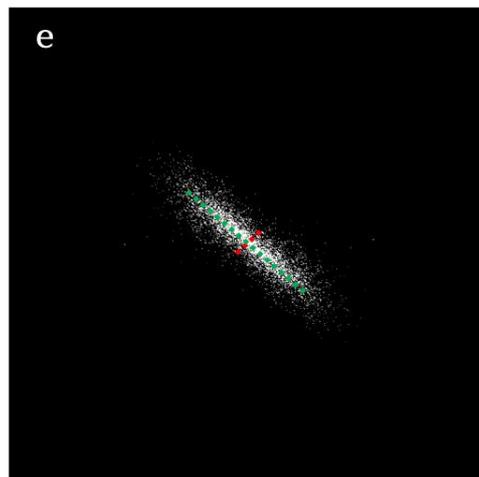
Autofluorescencia
+ GSA



GSA



FFT
(cálculo IOC)



Densidad
espectral de
energía 3D
(cálculo EHC)

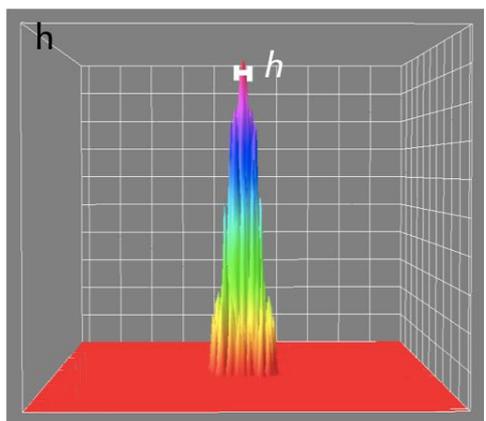
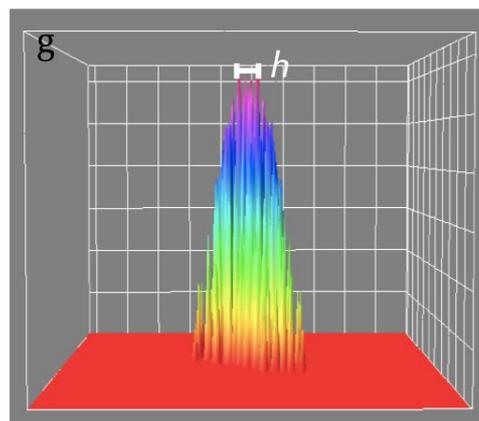


Figura 8. Imágenes representativas de las usadas para el análisis cuantitativo del colágeno basado en la FFT (Página anterior). A) Imagen mediante MMF (las señales de autofluorescencia están codificadas en color verde/amarillo/rojo, la GSA codificada en azul) de un CB nodular. Con los asteriscos blancos se señalan los nidos tumorales y con las puntas de flechas blancas las áreas características de clivaje que acompañan frecuentemente a este tipo tumoral. Aumento de la imagen: 20x. B) Imagen mediante MMF de glándulas sebáceas (asteriscos blancos). Nótese las células sebáceas en el interior. C-d) Imágenes obtenidas aislando la señal de GSA de las anteriores. Los asteriscos blancos marcan las zonas sin señal en las que se encuentran los nidos tumorales (c) y las glándulas sebáceas (d). En las imágenes se observan los haces de colágeno tipo I, responsables principales de la señal de GSA, codificada en azul. E-f) Diagramas en 2D obtenidos tras la aplicación de la FFT sobre las imágenes de GSA. En rojo se marcan los ejes cortos de los lóbulos del diagrama y en verde los ejes largos. Obsérvese como la distribución más paralela de las fibras de colágeno alrededor de los nidos tumorales se traduce en un diagrama más elíptico, mientras que la distribución más aleatorizada del colágeno alrededor de las glándulas sebáceas da lugar a un diagrama de una morfología más circular. G-h) Versión en 3D de la densidad espectral de energía tras aplicar el dominio de Fourier. En ambas imágenes h representa la distancia en píxeles entre los centros de gravedad de los máximos de primer orden. Una h o distancia mayor (como se observa en la imagen g) resultará en un EHC menor, indicando que los haces de colágeno se organizan de una forma más compacta comparativamente.

3.4.2 Análisis de la distribución de los haces y fibras de colágeno mediante CurveAlign y CT-FIRE:

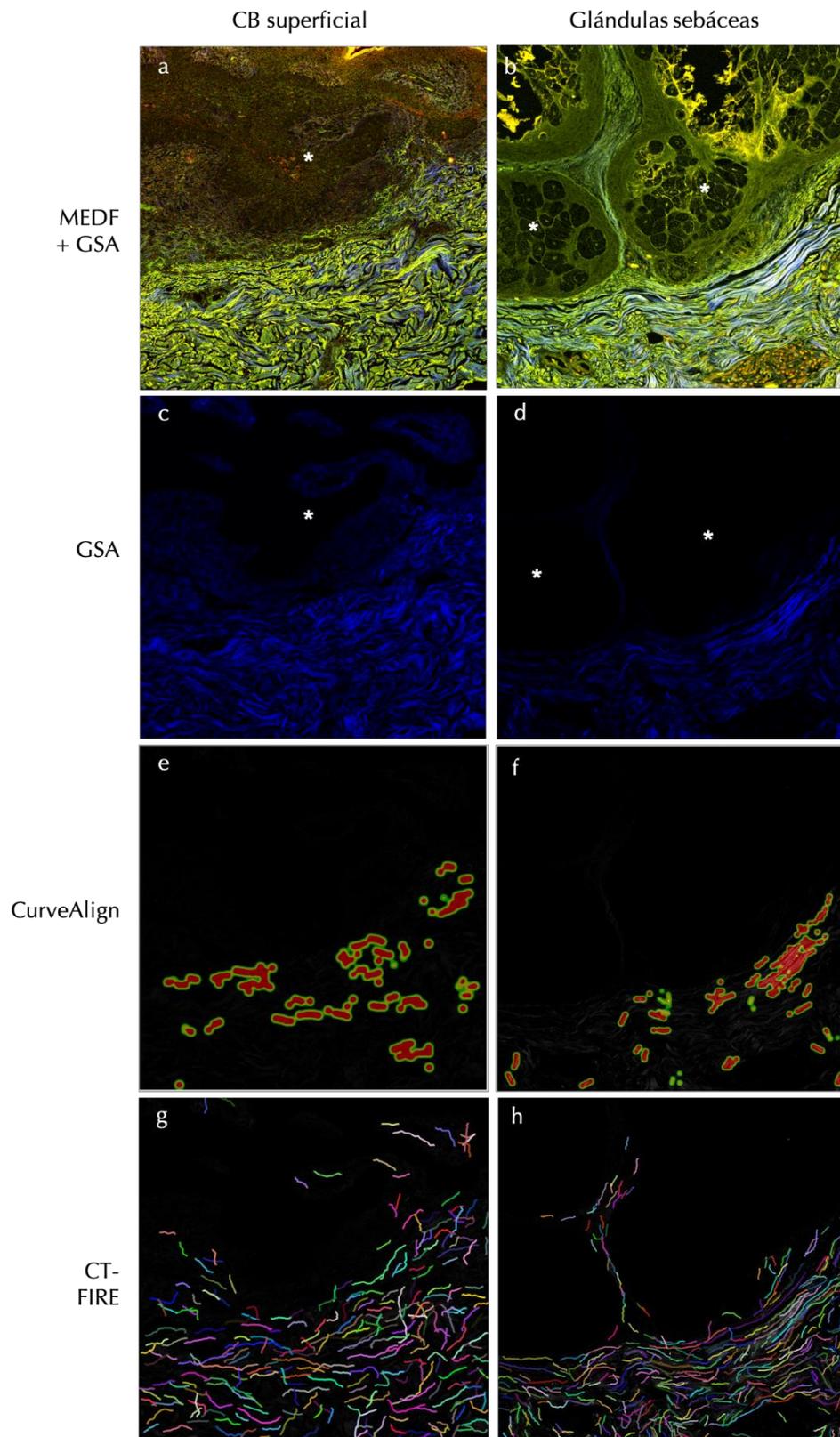
CurveAlign y CT-FIRE son dos softwares de fuente abierta para cuantificar la distribución del colágeno fibrilar basados en la transformada Curvelet [114]. La transformada Curvelet fue introducida en el año 2000 por Candes y Donoho [115] para responder a nuevas necesidades en el análisis de imágenes que no podían resolverse con las transformadas Wavelet o Fourier. Esta transformada multiescala tiene características que le permiten eliminar el ruido de fondo de las imágenes y mejorar la nitidez de los bordes de estas. Además, proporciona una representación espacial del colágeno que permite detectar fibras individuales y su curvatura. Tanto CurveAlign como CT-FIRE

están basados en esta transformada y pueden ser descargados de forma libre en: <http://loci.wisc.edu/software/ctfire> y <http://loci.wisc.edu/software/curvealign>. A continuación, se describe el objetivo de cada herramienta, así como se muestran ejemplos característicos de imágenes tras aplicar cada una de ellas.

- **CurveAlign:** este software se desarrolló para el estudio del alineamiento y la orientación del colágeno en haces completos. Su objetivo es cuantificar todos los ángulos de las fibras de colágeno dentro de una región de interés, en relación con un límite establecido por el usuario, como pueden ser un límite tumoral o el de otra estructura a estudio [23]. Para ello, la transformada Curvelet permite mejorar el ruido de la imagen facilitando el aislamiento de la señal proveniente de las fibras de colágeno. Gracias a este software podemos obtener un índice de alineamiento de los haces de colágeno y de su orientación en forma de ángulo con respecto al límite previamente establecido. En la Figura 9 se adjuntan ejemplos demostrativos de las imágenes que genera el software al procesar las imágenes de GSA, y en el apartado 3.5.2 se definen los parámetros que proporciona.
- **CT-FIRE:** el nombre de este software proviene de sus iniciales en inglés, *Curvelet Transformation (CT) – Fiber extraction algorithm (FIRE)*. Esta herramienta se desarrolló ante la necesidad de estudiar las características de las fibras individuales que rodean a los tumores u otras estructuras, separándolas del haz completo de colágeno. De esta forma, mediante el uso de este algoritmo se pueden analizar métricas de las fibras a nivel individual, como la longitud, la anchura, el ángulo o la rectitud de las mismas. En la Figura 9 se muestran ejemplos de la aplicación de este algoritmo sobre las imágenes de GSA, y en el apartado 3.5.2 se definen los parámetros que proporciona.

Figura 9. Imágenes representativas de las resultantes del análisis con CurveAlign y CT-FIRE (Página siguiente). A) Imagen de CB superficial con MEDF y GSA. El asterisco blanco marca los nidos tumorales que surgen de la epidermis. B) Imagen de glándulas sebáceas (asteriscos blancos) con MEDF y GSA. C-d) Imágenes correspondientes aislando la señal de GSA. Los asteriscos blancos marcan las áreas sin señal que corresponden al tumor y a las glándulas sebáceas respectivamente. E-f)

Imágenes que genera el software CurveAlign tras procesar las imágenes correspondientes de GSA. G-h) Imágenes que proporciona el software CT-FIRE tras procesar las imágenes de GSA. Nótese cómo CurveAlign detecta haces completos de colágeno, mientras que CT-FIRE detecta la señal procedente de fibras individuales mediante la segmentación de la imagen. Aumento de las imágenes: 20x.



3.4.3 Análisis de la intensidad de la señal de generación de segundo armónico mediante la densidad óptica integrada:

La intensidad de la señal en las imágenes de GSA se puede analizar mediante un parámetro conocido como densidad óptica integrada (DOI), calculado mediante el software ImageJ. Este parámetro recoge la suma del valor de todos los píxeles en una imagen, ponderándola por el área que ocupan y en relación con la escala de dicha imagen. Se calcula mediante el producto entre el valor gris promedio de los píxeles de cada objeto presente en la imagen y el área de la imagen en la que están contenidos dichos objetos.

A partir del cálculo del DOI en las imágenes del colágeno mediante GSA se puede inferir la intensidad de dicha señal. En el presente estudio, al presentar todas las imágenes una misma escala, el valor del DOI entre las imágenes obtenidas es comparable. En la Figura 10 se muestran ejemplos de imágenes con diferente intensidad de señal de GSA y por tanto diferente valor de DOI.

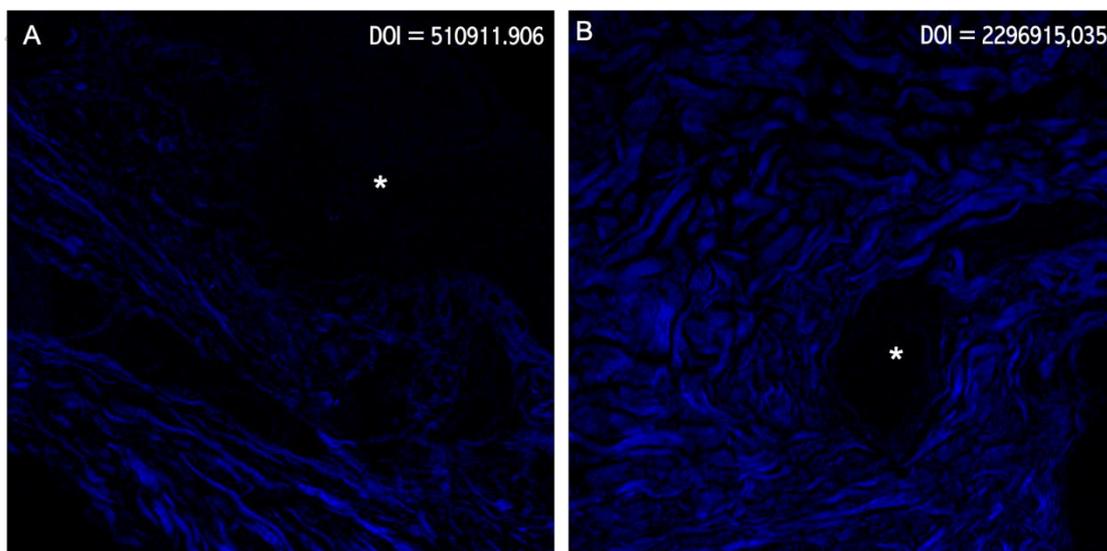


Figura 10. Cálculo del valor de la densidad óptica integrada para evaluar la intensidad de la señal de GSA. A) Imagen de GSA de un CB nodular con las fibras de colágeno tipo I peritumorales. El asterisco blanco señala el área sin señal que correspondería al nido tumoral. En la esquina superior derecha aparece el valor de la DOI de la imagen. B) Imagen de GSA de una glándula sebácea con las fibras de colágeno que la rodean. Con el asterisco blanco se indica el área que ocupa una glándula sebácea. En la esquina superior derecha aparece calculada la DOI de la imagen. Nótese que en la

imagen B (glándula sebácea) de aprecia una mayor intensidad de la señal de GSA que en la imagen A (CB), que se corresponde con un valor más alto de DOI. Puesto que las imágenes corresponden a una misma área y están en una misma escala espacial, la intensidad de la señal medida mediante este índice es comparable entre ambas. Aumento de las imágenes: 20x.

3.5 Definición de las variables del estudio:

3.5.1 Definición de variables independientes:

- **Tipo histológico en las imágenes:** se obtuvieron y clasificaron las imágenes atendiendo al tipo histológico, de acuerdo con las secciones de H&E que se utilizaron como guía (ver el punto 3.3 y la Figura 5). Se incluyeron 5 categorías:
 - **Carcinoma basocelular:** se incluyeron imágenes de los tumores acompañados de parte del estroma peritumoral. A partir de esta categoría se generó una nueva variable atendiendo a los subtipos histológicos de estas imágenes:
 - **Carcinomas basocelulares indolentes:** de acuerdo con la literatura [2], se consideraron subtipos histológicos de bajo riesgo los subtipos nodular y superficial.
 - **Carcinomas basocelulares agresivos:** se incluyeron los subtipos infiltrante y micronodular. También se incluyeron en este grupo los tumores de subtipo histológico mixto con presencia de alguno de estos dos componentes.
 - **Epidermis:** se incluyeron imágenes de la epidermis y del colágeno adyacente en dermis papilar y/o reticular. Se seleccionaron áreas del tejido con epidermis significativamente separada de la zona con transformación tumoral.
 - **Glándulas sebáceas:** se seleccionaron imágenes de las glándulas sebáceas con estroma adyacente.
 - **Folículos pilosos:** se tomaron imágenes de diferentes áreas de los folículos y del colágeno adyacente.

- **Lesiones benignas:** al igual que en las anteriores, se incluyeron en las imágenes tanto la lesión como el estroma adyacente. Dentro de este grupo, se recogió como nueva variable el tipo de lesión benigna: queratosis actínica, queratosis seborreica, queratosis liquenoide, tricoepitelioma desmoplático, angiofibroma y adenoma sebáceo.

3.5.2 Definición de variables dependientes:

- **Índice de orientación del colágeno (IOC):** se calcula a través de las imágenes de FFT con el software ImageJ. Este índice mide el grado de isotropía/anisotropía de las fibras de colágeno y su valor está entre 0 y 1. Su definición y fórmula se recogen en el apartado 3.4.1.
- **Empaquetamiento de los haces de colágeno (EHC):** se calcula a través de las imágenes de FFT con el software ImageJ. Este índice mide la densidad de empaquetamiento de los haces de colágeno y su valor está entre 0 y 1. Su definición y fórmula se recogen en el apartado 3.4.1.
- **Alineamiento:** calculado mediante CurveAlign, este índice calcula la orientación de las fibras con respecto al resto del haz. Su valor varía de 0 a 1, donde 1 indica que todas las fibras están alineadas en una dirección y 0 que están distribuidas de una forma completamente aleatoria.
- **Orientación:** calculado mediante CurveAlign, este índice mide en forma de ángulo relativo el alineamiento de las fibras de colágeno con respecto a un límite previamente establecido. Su valor varía entre 0 y 90°.
- **Longitud:** corresponde a la longitud media de las fibras a nivel individual medida en píxeles, este parámetro lo proporciona el software CT-FIRE.
- **Ancho:** corresponde a la anchura media de las fibras a nivel individual medida en píxeles, este parámetro lo proporciona el software CT-FIRE.
- **Rectitud:** la rectitud se define como la distancia entre los extremos de la fibra dividida por la longitud de la fibra. Se presenta como un índice cuyo valor varía de 0 a 1, donde 1 indica una fibra perfectamente recta. Por el contrario, cuanto menor sea el valor de este parámetro, más ondulada indica que es la fibra. Se calcula mediante el software CT-FIRE.

- **Ángulo:** mide el ángulo medio de las fibras individuales de colágeno con respecto a la región de interés. Su valor varía entre 0 y 90°. Este parámetro se obtiene mediante el software CT-FIRE.
- **Densidad óptica integrada (DOI):** se calcula con el software ImageJ. Este índice mide de forma relativa la intensidad de la señal de una imagen, con relación a la escala espacial en la que se encuentre dicha imagen. Su definición y cálculo se recogen en el apartado 3.4.3.

3.6 Métodos estadísticos:

Todos los análisis estadísticos del presente estudio se realizaron usando el software SPSS v25.0 (IBM Corporation, EE.UU.).

En primer lugar, se determinó la no normalidad de los datos con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Posteriormente, para el análisis de los datos se usó como test de contraste de hipótesis la prueba de la U de Mann-Whitney (también llamada de Mann-Whitney-Wilcoxon) para la comparación entre dos categorías de variables independientes continuas. En el caso de tres o más categorías, se utilizó el test de Kruskal-Wallis, también conocido como test H. Para las comparaciones *post hoc* se utilizó la prueba de Mann-Whitney entre cada par de grupos con el ajuste de Bonferroni.

Se consideraron significativos los valores de p inferiores a 0,05.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Factores demográficos de la población a estudio:

Se incluyeron un total de 64 pacientes en el estudio que se trataron en el hospital MSKCC de Nueva York (EE.UU.). La edad media de los pacientes fue 63 años, con una desviación estándar de 13 años, oscilando en un rango entre los 35 y los 90 años. En cuanto al sexo, el 51% (33/64) eran varones y el 49% (31/64) eran mujeres.

Procedentes de estos pacientes, se incluyeron un total de 52 muestras de CB de diferentes subtipos histológicos: 15 casos de CB superficial, 11 de CB nodular, 17 de CB infiltrante y 9 casos de CB de subtipos histológicos mixtos. También se incluyeron 12 lesiones benignas: 3 queratosis actínicas, 2 queratosis seborreicas, 3 queratosis liquenoides, 1 tricoepitelioma desmoplático, 1 angiofibroma y 2 adenomas sebáceos. La mayoría de estas lesiones, un 34,4% (22/64), se localizaban en cabeza y cuello. Las características demográficas de los pacientes y las características de las lesiones se detallan en la Tabla 6.

Tabla 6. Resumen de los datos demográficos de la población a estudio

Población	64 pacientes
Edad en años, media (DE)	63 (\pm 13)
Sexo, % (n)	
Hombres	51% (33/64)
Mujeres	49% (31/64)
Localización de las lesiones, % (n)	64 lesiones
Cabeza y cuello	34,4% (22/64)
Extremidades superiores	25% (16/64)
Tronco	29,7% (19/64)
Extremidades inferiores	10,9% (7/64)

Abreviaturas: DE es desviación estándar, n es número total.

4.2 Imágenes de generación de segundo armónico del colágeno:

A partir de las muestras descritas se generaron un total de 459 imágenes de microscopía multifotón y GSA para el análisis. De estas, se incluyeron 418 en el estudio y las restantes 41 se rechazaron por la presencia de artefactos producidos durante el procesamiento de las muestras o la toma de imágenes al microscopio. La distribución de imágenes por categorías está descrita en la Tabla 7. Un ejemplo de las imágenes de colágeno obtenidas y su correlación con las de H&E puede visualizarse en la Figura 11.

Tabla 7. Resumen de las muestras incluidas y del número de imágenes de microscopía multifotón en cada categoría

Número de muestras cutáneas usadas para la obtención de las imágenes	Estructuras estudiadas en las muestras cutáneas	Número de imágenes de MMF adquiridas	
Carcinoma basocelular (n=52) Nodular (n=11) Superficial (n=15) Infiltrante (n=17) Subtipo mixto (n=9)	Epidermis	133	225
	Folículo piloso	49	
	Glándula sebácea	43	
	Carcinoma basocelular Subtipo histológico agresivo Subtipo histológico indolente	157 61 96	157
Lesiones benignas (n=12) Queratosis actínica (n=3) Queratosis seborreica (n=2) Queratosis liquenoide (n=3) Tricoepitelioma desmoplásico (n=1) Angiofibroma (n=1) Adenoma sebáceo (n=2)	Queratosis actínica	13	36
	Queratosis seborreica	4	
	Queratosis liquenoide	6	
	Tricoepitelioma desmoplásico	4	
	Angiofibroma	3	
	Adenoma sebáceo	6	

Abreviaturas: MMF es microscopía multifotón, n es número total

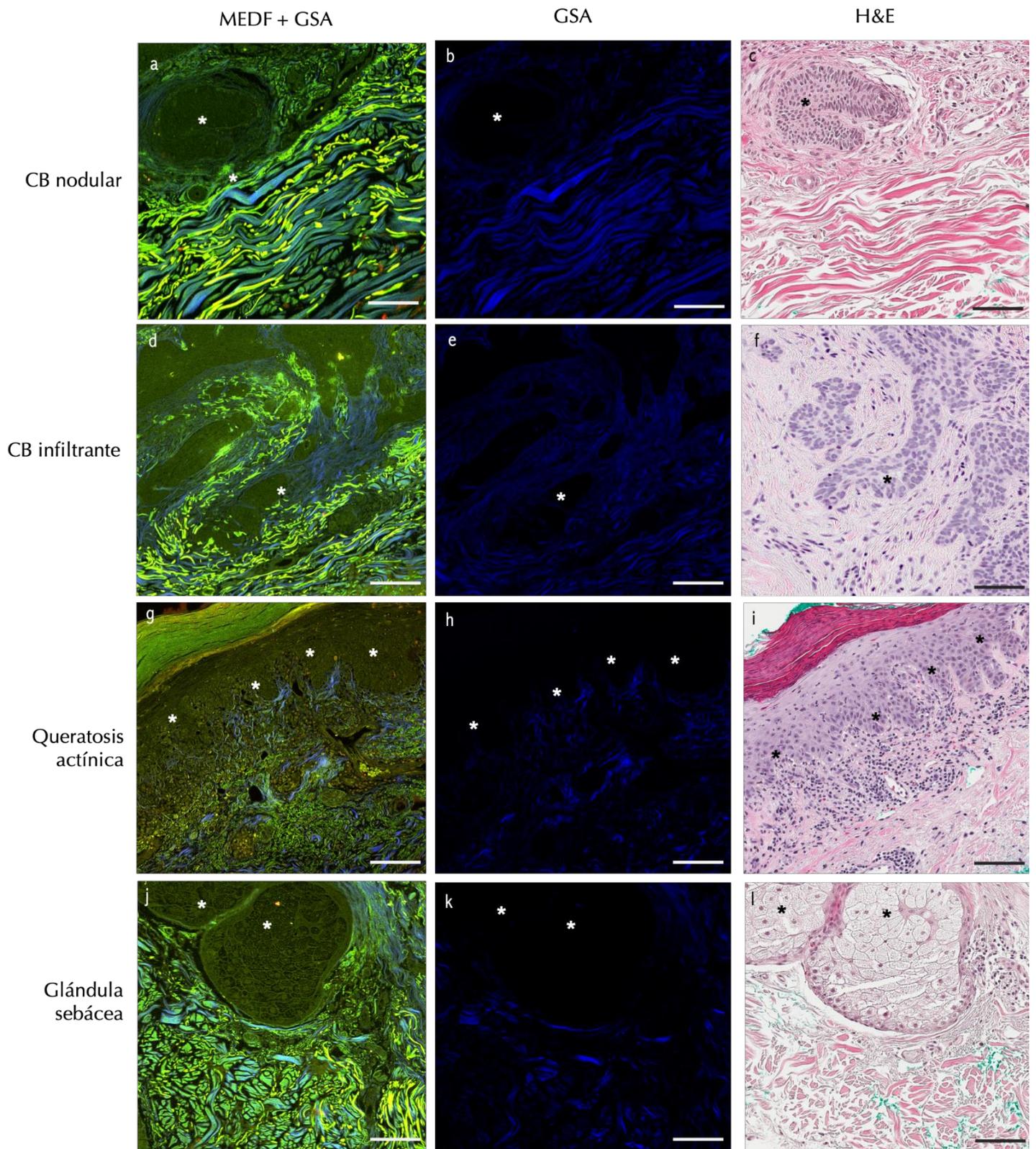


Figura 11. Imágenes representativas de microscopía multifotón y su correspondencia con las imágenes de H&E. Ejemplos de un carcinoma basocelular nodular (a-c), un carcinoma basocelular infiltrante (d-f), una queratosis actínica (g-i) y una glándula sebácea (j-l). En la primera columna del panel (imágenes a, d, g, f) se

visualizan las imágenes de multifotón con la señal de MEDF (codificadas en color amarillo/verde/rojo) y la GSA (codificada en color azul). La segunda columna muestra la señal de GSA aislada (b, e, h, k) utilizadas para el análisis cuantitativo del colágeno tipo I. En la tercera (c, f, i, l) se muestra las imágenes correspondientes de H&E que se usaron como mapa para obtener las imágenes de MMF. Los asteriscos muestran la zona lesional o con la estructura normal de interés de todas las imágenes. Nótese que en las imágenes de GSA, al no incluirse las señales de autofluorescencia, las zonas lesionales o las estructuras normales aparecen oscuras y sólo se visualiza el colágeno tipo I de la periferia. Barras de escala: 100 μm .

4.3 Análisis cuantitativo del colágeno:

4.3.1 Análisis cuantitativo de las fibras de colágeno adyacentes al carcinoma basocelular *versus* las adyacentes a estructuras normales de la piel (epidermis, glándulas sebáceas, folículos pilosos):

Un primer análisis mediante la prueba Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas en todos los índices estudiados ($p < 0,05$). Se realizó un análisis *post hoc* comparativo con la prueba U de Mann Whitney y corrección de Bonferroni para analizar cuáles eran las categorías responsables de las diferencias halladas. Un resumen de los resultados de cada uno de los índices tras la comparación entre el CB y las estructuras normales se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Resultados del análisis comparativo entre las fibras de colágeno que rodean al carcinoma basocelular *versus* a las estructuras normales de la piel

Colágeno circundante al CB (n= 157) vs. a estructuras normales de la piel (epidermis n=133, folículos pilosos n= 49, glándulas sebáceas n=43)			
Índice	Grupos	Mediana (RIC)	p
IOC	CB	0,53 (0,45-0,61)	
	vs. epidermis	0,34 (0,16-0,47)	< 0,001
	vs. glándula sebácea	0,25 (0,17-0,41)	< 0,001
	vs. folículo piloso	0,39 (0,25-0,54)	< 0,001
EHC	CB	19,88 (15,05-25,94)	
	vs. epidermis	32 (23,81-39,84)	< 0,001
	vs. glándula sebácea	30,11 (27,67-40,96)	< 0,001
	vs. folículo piloso	32 (24,97-43,59)	< 0,001
Orientación	CB	70,2 (47,8-81,6)	
	vs. epidermis	70,35 (52,37-80,55)	1,000
	vs. glándula sebácea	79,3 (66,62-84,7)	0,005
	vs. folículo piloso	66,4 (50-78,7)	1,000
Alineamiento	CB	0,78 (0,66-0,88)	
	vs. epidermis	0,61 (0,4-0,78)	< 0,001
	vs. glándula sebácea	0,59 (0,46-0,8)	< 0,001
	vs. folículo piloso	0,49 (0,33-0,67)	< 0,001
Longitud	CB	48,4 (45,45-51,7)	
	vs. epidermis	51,35 (47,4-56,65)	< 0,001
	vs. glándula sebácea	53,4 (50,3-55,60)	< 0,001
	vs. folículo piloso	50,3 (45,65-52,95)	1,000
Rectitud	CB	0,9 (0,89-0,91)	
	vs. epidermis	0,9 (0,9-0,91)	0,038
	vs. glándula sebácea	0,9 (0,9-0,91)	0,921
	vs. folículo piloso	0,9 (0,89-0,91)	1,000
Anchura	CB	3,3 (3-3,7)	
	vs. epidermis	3,7 (3,22-4,2)	< 0,001
	vs. glándula sebácea	4 (3,8-4,3)	< 0,001
	vs. folículo piloso	3,5 (3,25-3,8)	0,171
Ángulo	CB	70,4 (61,42-78,9)	
	vs. epidermis	70,9 (57,9-79,1)	1,000
	vs. glándula sebácea	78,45 (73,62-83,92)	0,001
	vs. folículo piloso	73,5 (63,2-83,1)	1,000
DOI	CB	459467,33 (284421,76-914188,79)	
	vs. epidermis	839659,65 (461200,23-2033545,63)	< 0,001
	vs. glándula sebácea	1523861,67 (763009,62-2726225,7)	< 0,001
	vs. folículo piloso	512826,88 (374045,72-1545245,29)	0,927

Tabla 8. Resultados del análisis comparativo entre las fibras de colágeno circundantes al carcinoma basocelular *versus* a las estructuras normales de la piel (Página anterior). Resultados de la prueba H de Kruskal-Wallis con análisis *post hoc* mediante U de Mann-Whitney y corrección de Bonferroni. Sólo se muestran en la tabla los resultados comparativos con respecto al CB. El resto de las comparaciones por parejas pueden consultarse en el Anexo II. n = número de imágenes de GSA analizadas. Los valores de orientación y ángulo se expresan en grados, los de anchura y longitud en píxeles. Los valores de *p* estadísticamente significativos ($<0,05$) se muestran en negrita. Abreviaturas: CB, carcinoma basocelular; EHC, índice de empaquetamiento del colágeno; DOI, densidad óptica integrada; IOC, índice de orientación del colágeno; RIC, rango intercuartil.

El análisis basado en las imágenes de la FFT mostró que el IOC alrededor del CB es mayor que el que presentan las estructuras normales de la piel (epidermis, glándulas sebáceas, folículos pilosos), con una mediana de 0,53 (rango intercuartil [RIC] 0,45-0,61) en el caso del CB frente a una de 0,34 (RIC 0,16-0,47) en la epidermis, de 0,25 (RIC 0,17-0,41) en glándulas sebáceas y de 0,39 (RIC 0,25-0,54) en folículos pilosos, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p<0,001$) (Tabla 8 y Figura 12). En cuanto al índice de EHC del colágeno, alrededor del CB la mediana fue de 19,88 (RIC 15,05-25,94) *versus* de 32 (RIC 23,81-39,84) en el caso de la epidermis, de 30,11 (RIC 27,67-40,96) en glándulas sebáceas, y de 32 (RIC 24,97-43,59) en el caso de los folículos pilosos. Los valores del índice EHC fueron por tanto significativamente menores en el caso del CB en comparación a todas estructuras normales de la piel ($p<0,001$), como se observa en la Tabla 8 y en la Figura 12.

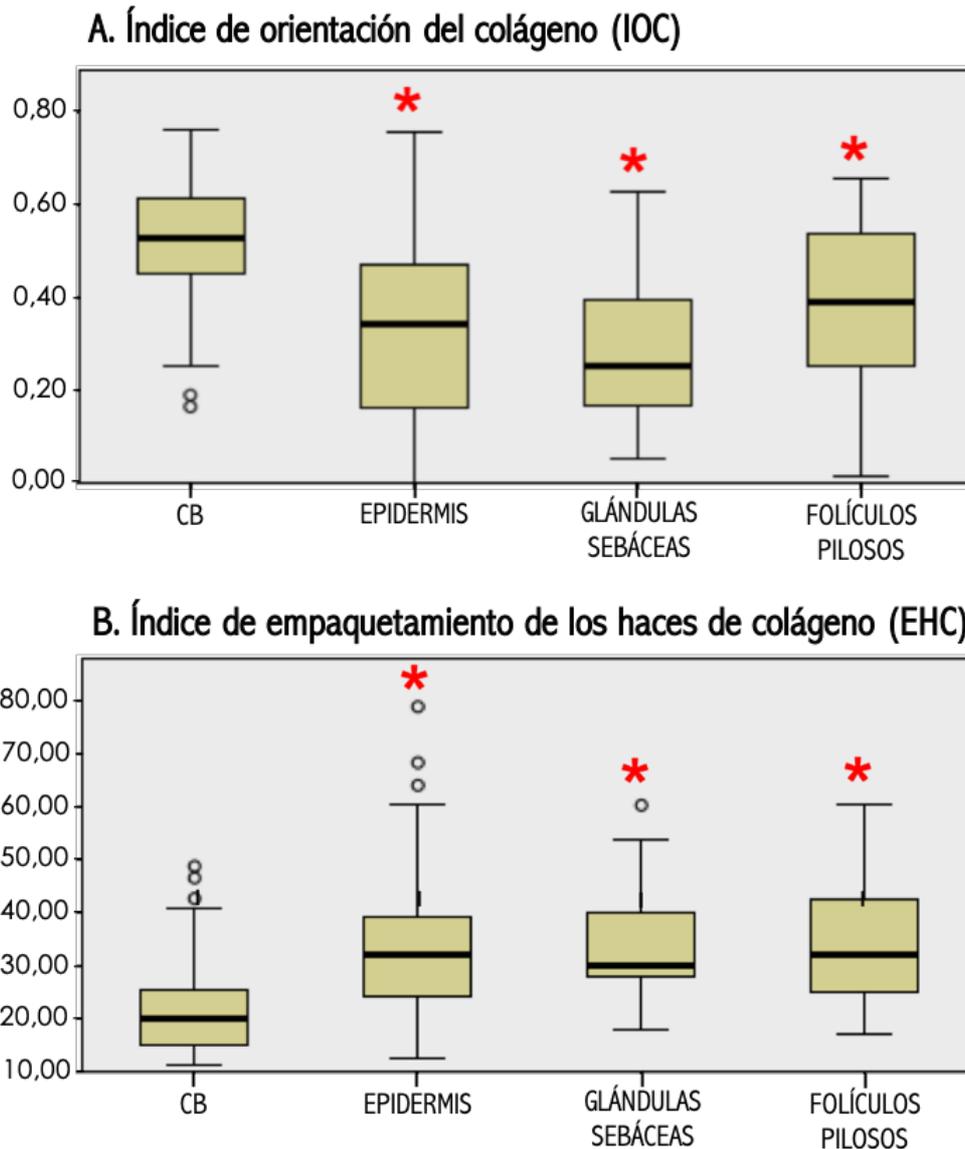


Figura 12. Diagrama de caja y bigotes que muestra los resultados del análisis comparativo basado en la FFT entre el colágeno adyacente al CB y el adyacente a las estructuras normales de la piel. A) Índice de orientación del colágeno (IOC). B) Índice de empaquetamiento de los haces de colágeno (EHC). Con el asterisco rojo se muestran las categorías con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con el CB.

Por su parte, el análisis de los haces de colágeno mediante CurveAlign mostró que el colágeno tiene un mayor índice de alineamiento alrededor del CB (mediana 0,78, RIC 0,66-0,88) en comparación al que presenta alrededor de la epidermis (mediana 0,61, RIC

0,4-0,78), de las glándulas sebáceas (mediana 0,59, RIC 0,46-0,8) y de los folículos pilosos (mediana 0,49, RIC 0,33-0,67). Todas estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0,001$). Con respecto a la orientación, sólo se encontraron diferencias entre el ángulo de las fibras alrededor del CB y de las glándulas sebáceas ($p = 0,005$), siendo menor en el caso del carcinoma (Tabla 8 y Figura 13).

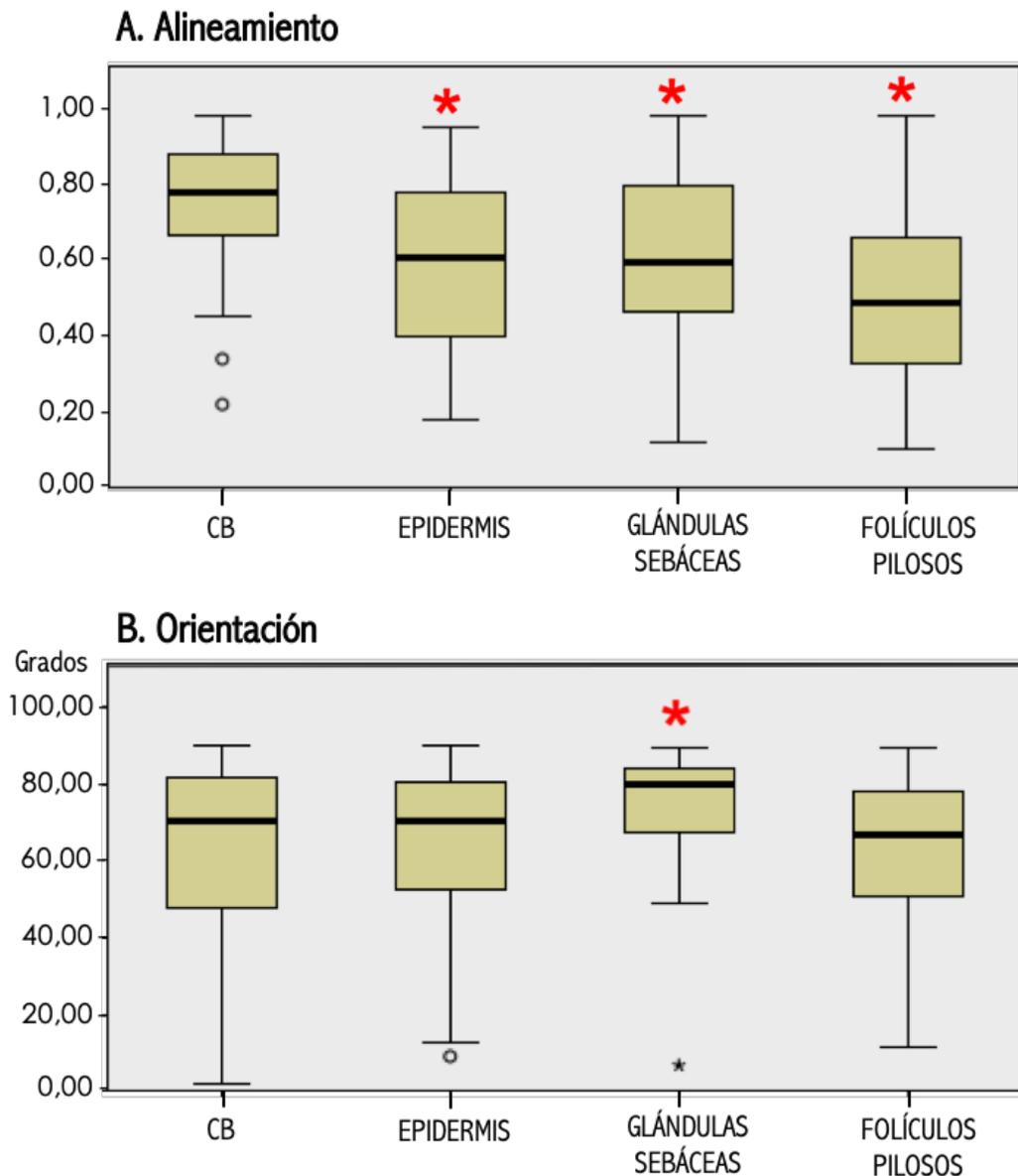
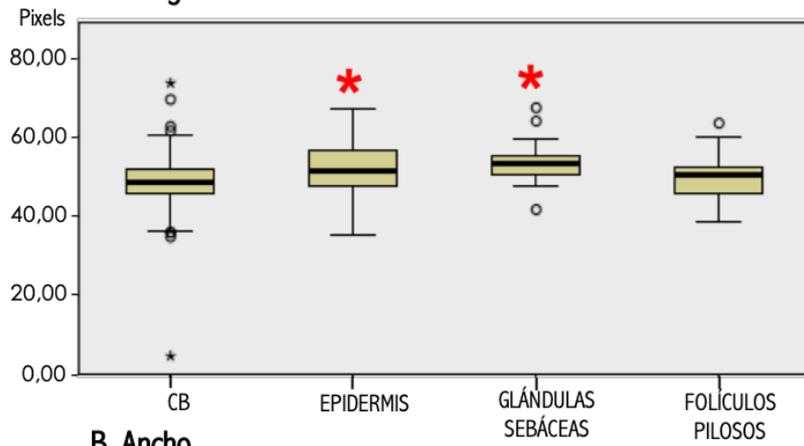


Figura 13. Diagrama de caja y bigotes que muestra los resultados del análisis comparativo mediante CurveAlign entre los haces de colágeno adyacentes al CB y los que se encuentran adyacentes a las estructuras normales de la piel. A)

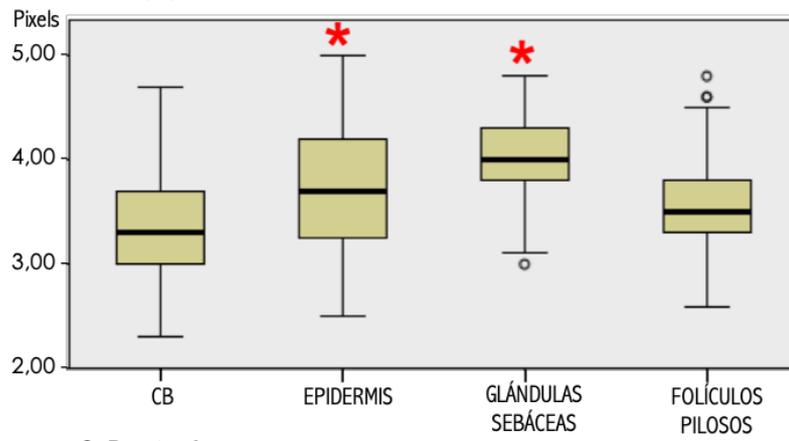
Alineamiento. B) Orientación. Con el asterisco rojo se muestran las categorías con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con el CB.

Se estudiaron las diferencias de las fibras de colágeno a nivel individual mediante CT-FIRE (Tabla 8 y Figura 14). En cuanto a la longitud, las fibras de colágeno alrededor del CB fueron más cortas y estrechas que las que rodean la epidermis y las glándulas sebáceas ($p < 0,001$). Además, en el caso de la epidermis, estas fibras tenían una morfología ligeramente más recta en comparación a las que rodean al CB ($p = 0,038$). En cuanto a su ángulo, las fibras presentaban menor angulación rodeando al CB en comparación a las glándulas sebáceas ($p = 0,001$), sin encontrarse diferencias significativas con el resto de las variables. No se encontraron diferencias significativas entre las fibras individuales que rodean al CB y las que rodean a los folículos pilosos en ninguno de los índices estudiados mediante CT-FIRE.

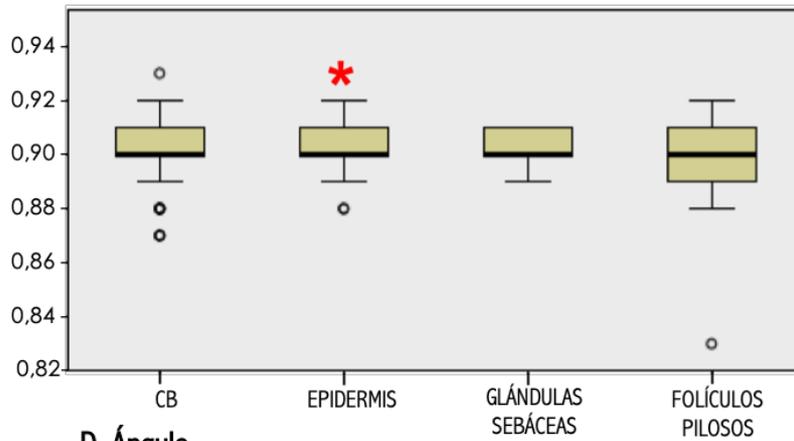
A. Longitud



B. Ancho



C. Rectitud



D. Ángulo

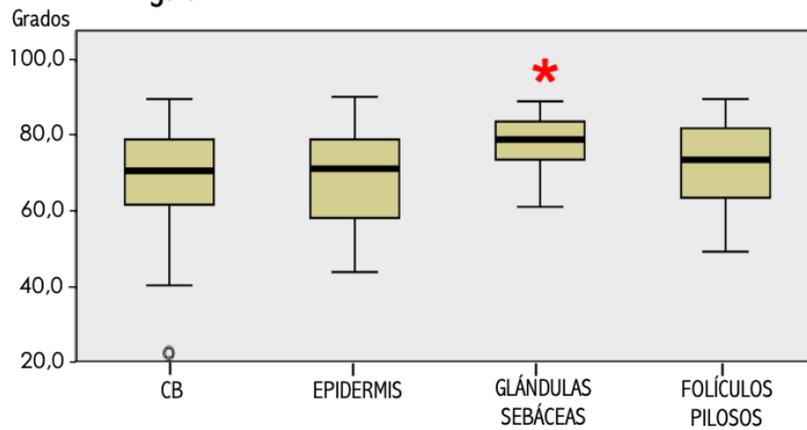


Figura 14. Diagrama de caja y bigotes que muestra los resultados del análisis de las fibras de colágeno a nivel individual mediante CT-FIRE en la periferia del CB comparadas con las que se encuentran en la periferia de las estructuras normales de la piel (Página anterior). A) Longitud. B) Ancho. C) Rectitud. D) Ángulo. Con el asterisco rojo se muestran las categorías con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con el CB.

Por último, se estudiaron las diferencias entre la DOI de la señal de las imágenes de las fibras que rodean al CB en comparación a la de las estructuras normales de la piel (Tabla 8 y Figura 15). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el valor de la DOI de las imágenes de CB y las de folículos pilosos ($p = 0,927$).

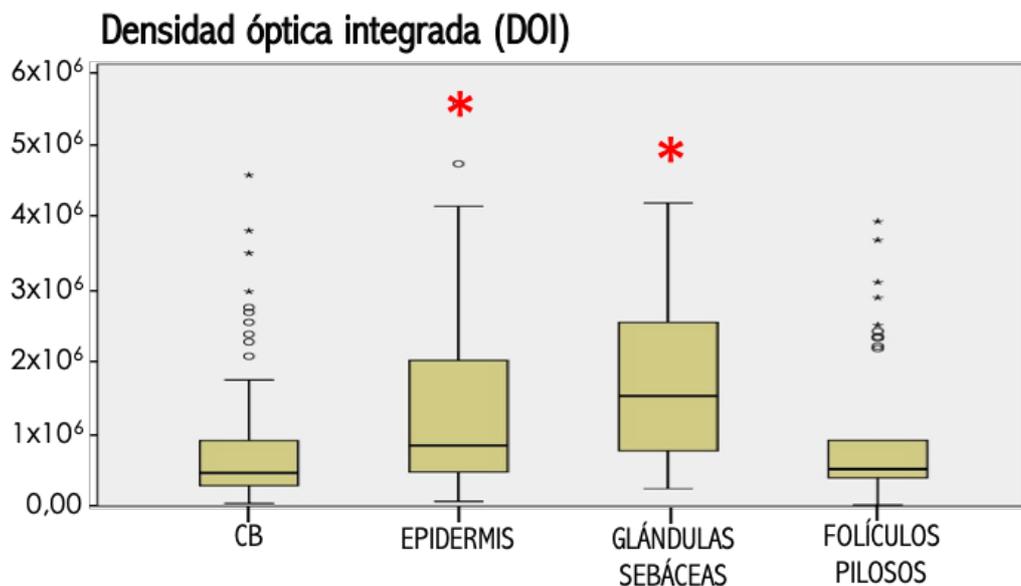


Figura 15. Diagrama de caja y bigotes que muestra los resultados del análisis comparativo entre la DOI de las imágenes del colágeno adyacente al CB frente a la de las imágenes del colágeno adyacente a las estructuras normales de la piel. Con el asterisco rojo se muestran las categorías con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con el CB.

4.3.2 Análisis cuantitativo de las fibras de colágeno adyacentes al carcinoma basocelular *versus* las adyacentes a lesiones cutáneas benignas:

Los resultados del análisis cuantitativo de las fibras de colágeno del estroma circundante al CB y a las lesiones benignas se encuentran sintetizados en la Tabla 9.

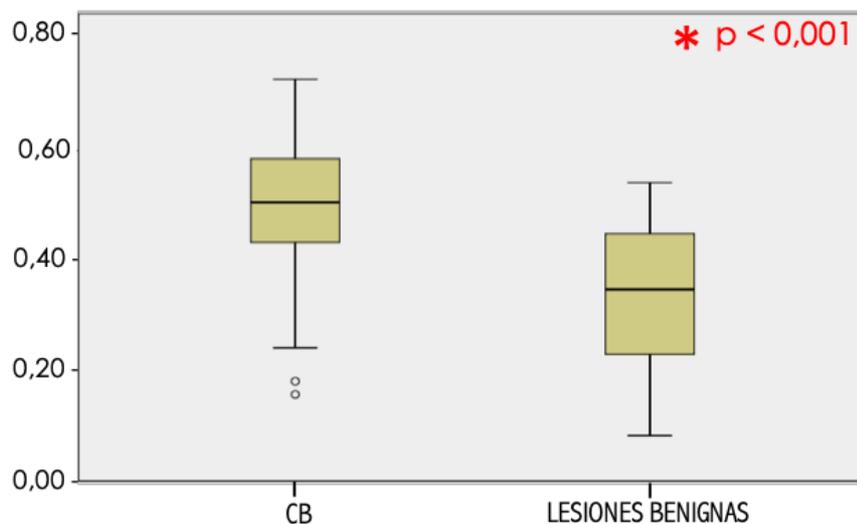
Tabla 9. Resultados del análisis comparativo entre las fibras de colágeno adyacentes al carcinoma basocelular *versus* las adyacentes a lesiones benignas de la piel

Colágeno circundante al CB (n=157) vs. a lesiones cutáneas benignas (n=36)			
Índice	Grupos	Mediana (RIC)	<i>p</i>
IOC	CB	0,53 (0,45-0,61)	< 0,001
	Lesiones benignas	0,36 (0,24-0,47)	
EHC	CB	19,88 (15,05-25,94)	< 0,001
	Lesiones benignas	35,94 (27,13-44,52)	
Orientación	CB	70,2 (47,8-81,6)	0,271
	Lesiones benignas	74,85 (57,37-82,75)	
Alineamiento	CB	0,78 (0,66-0,88)	< 0,001
	Lesiones benignas	0,58 (0,36 -0,71)	
Longitud	CB	48,4 (45,45-51,7)	0,981
	Lesiones benignas	49,05 (45,5-52,27)	
Rectitud	CB	0,9 (0,89-0,91)	0,03
	Lesiones benignas	0,9 (0,89-0,9)	
Ancho	CB	3,3 (3-3,7)	0,179
	Lesiones benignas	3,45 (3,1-3,67)	
Ángulo	CB	70,4 (61,42-78,9)	< 0,001
	Lesiones benignas	81,25 (75,1-84,72)	
DOI	CB	459467,33 (284421,76-914188,79)	0,898
	Lesiones benignas	397604,246 (274775,08-992388,56)	

Resultados de la prueba U-Mann Whitney. n = número de imágenes de GSA analizadas. Los valores de orientación y ángulo se expresan en grados, los de anchura y longitud en píxeles. Los valores de *p* estadísticamente significativos (<0,05) se muestran en negrita. Abreviaturas: CB, carcinoma basocelular; EHC, índice de empaquetamiento del colágeno; DOI, densidad óptica integrada; IOC, índice de orientación del colágeno; RIC, rango intercuartil.

El análisis de las fibras de colágeno adyacentes al CB en comparación a las adyacentes a lesiones benignas basado en la FFT mostró que el colágeno que rodea a los tumores tiene una orientación más paralela (mayor IOC, con una mediana de 0,53 [RIC 0,45-0,61]) en comparación a las lesiones cutáneas benignas (mediana de 0,36 [RIC 0,24-0,47]), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,001$). El colágeno peritumoral también mostró estar distribuido en haces más densos (un menor índice EHC; mediana de 19,88 [RIC 15,05-25,94]) que el de las lesiones cutáneas benignas (mediana de 35,94 [RIC 27,13-44,52]), siendo de nuevo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,001$) (Tabla 9 y Figura 16).

A. Índice de orientación del colágeno (IOC)



B. Índice de empaquetamiento de los haces de colágeno (EHC)

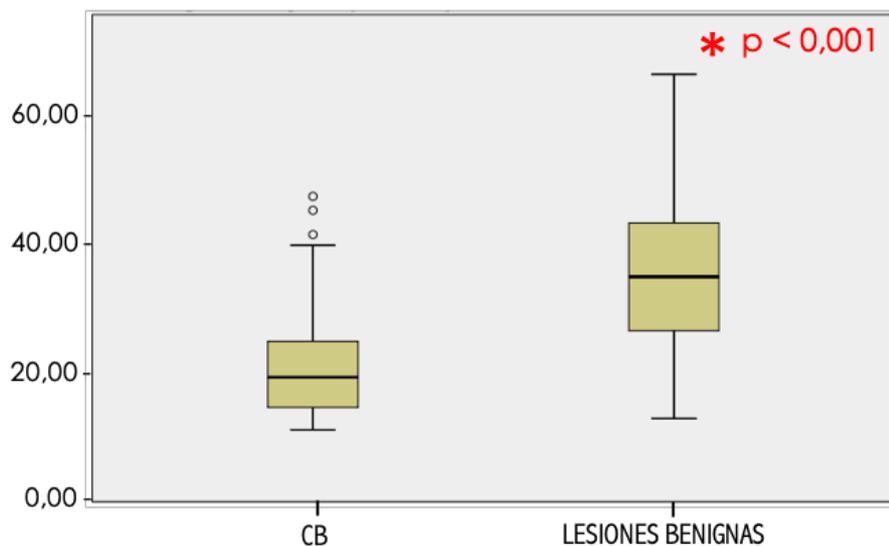
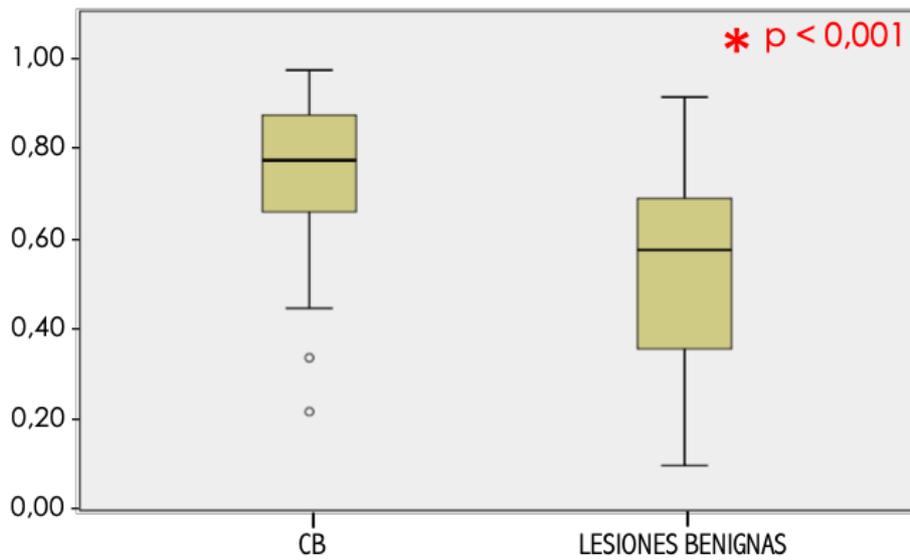


Figura 16. Diagrama de caja y bigotes que muestra los resultados del análisis comparativo basado en la FFT entre el colágeno adyacente al CB y el adyacente a las lesiones benignas de la piel (Página anterior). A) IOC. B) EHC. Con el asterisco rojo se muestran las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el CB y las lesiones benignas.

El análisis mediante CurveAlign mostró que las fibras alrededor del tumor tienen un mayor índice de alineamiento (mediana de 0,78 [RIC 0,66-0,88]) que las que se encuentran rodeando las lesiones benignas de la piel (mediana de 0,58 [RIC 0,36 -0,71]), de forma estadísticamente significativa ($p < 0,001$). Por el contrario, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al ángulo de orientación entre las fibras de colágeno que rodean a los tumores malignos con respecto a los benignos ($p = 0,271$) (Tabla 9 y Figura 17).

A. Alineamiento



B. Orientación

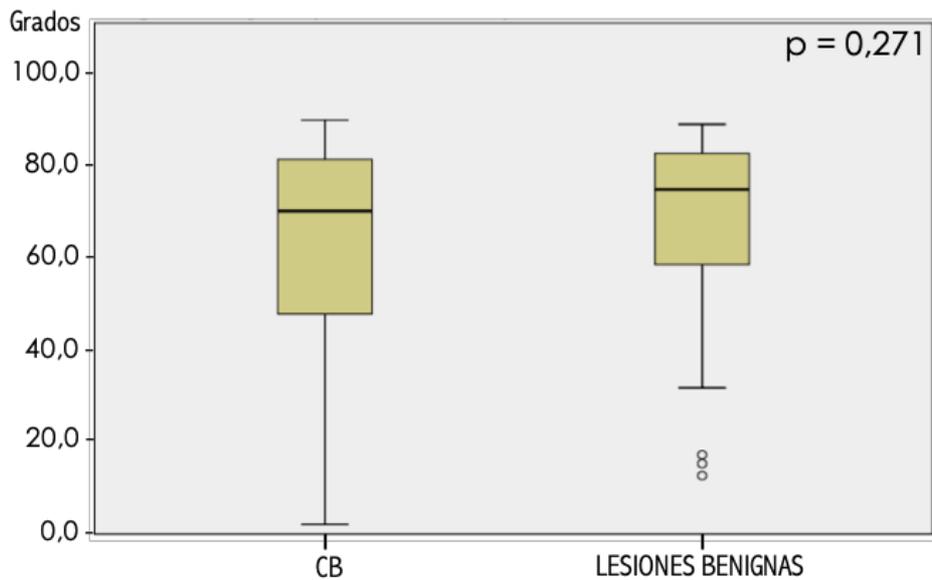
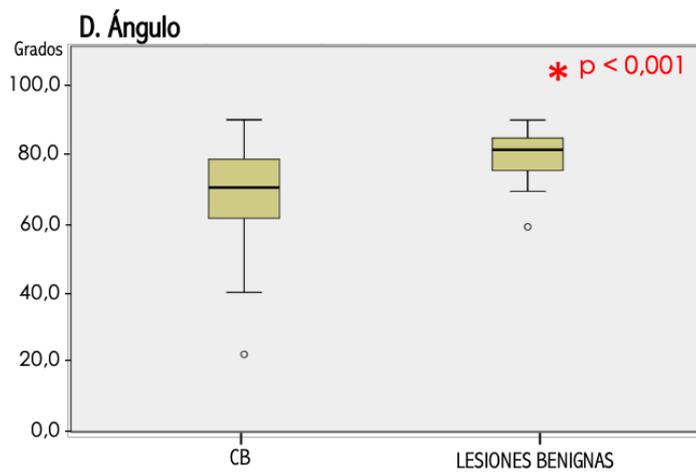
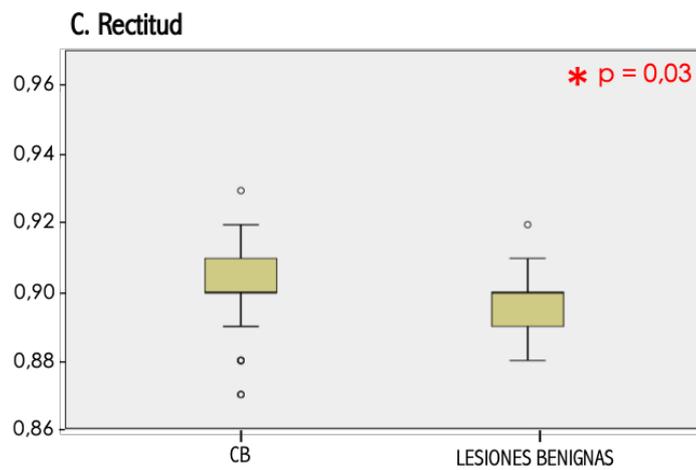
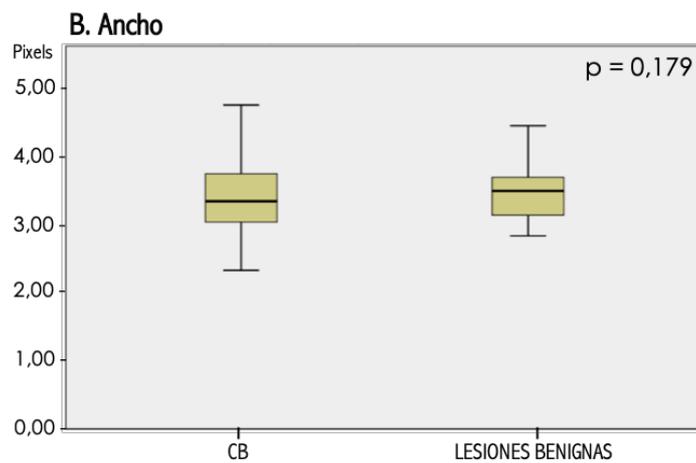
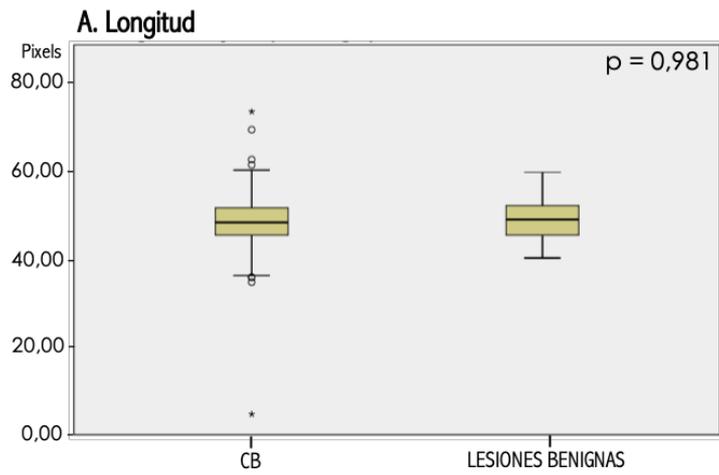


Figura 17. Diagrama de caja y bigotes que muestra los resultados del análisis comparativo mediante CurveAlign entre los haces de colágeno adyacentes al CB y los que se encuentran adyacentes a las lesiones benignas de la piel. A) Alineamiento. B) Orientación. Con el asterisco rojo se muestran las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el CB y las lesiones benignas.

Por su parte, el análisis entre las fibras a nivel individual que rodean el CB y las que rodean las lesiones benignas mostró que las fibras alrededor del tumor tienen un ángulo menor (mediana CB 70,4° [RIC 61,42-78,9] vs. mediana lesiones benignas 81,25° [RIC 75,1-84,72]) ($p < 0,001$) y son más rectas ($p = 0,03$). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a su longitud ($p = 0,981$) y anchura ($p = 0,179$) (Tabla 9 y Figura 18).

Figura 18. Diagrama de caja y bigotes que muestra los resultados del análisis de las fibras de colágeno a nivel individual mediante CT-FIRE en la periferia del CB comparadas con las que se encuentran en la periferia de las lesiones benignas de la piel (Página siguiente). A) Longitud. B) Ancho. C) Rectitud. D) Ángulo. Con el asterisco rojo se muestran las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).



Por último, el análisis entre la DOI de las fibras de colágeno que rodean el CB y las que rodean las lesiones benignas aportó resultados equivalentes y no demostró diferencias estadísticamente significativas ($p=0,898$) (Tabla 9 y Figura 19).

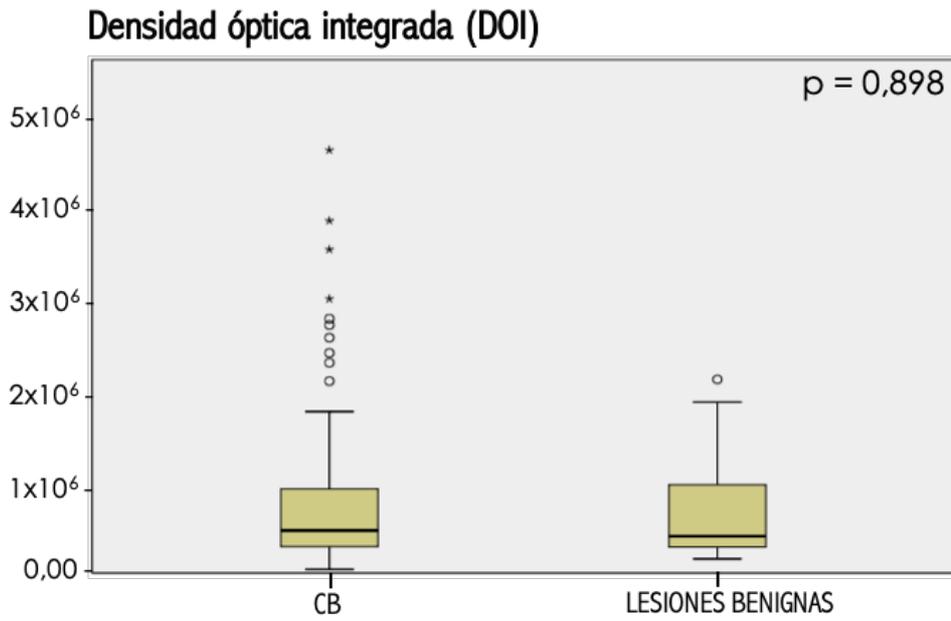


Figura 19. Diagrama de caja y bigotes que muestra los resultados del análisis comparativo entre la DOI de las imágenes del colágeno adyacente al CB frente a la de las imágenes del colágeno adyacente a las lesiones benignas de la piel. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,898$).

4.3.3 Análisis cuantitativo de las fibras de colágeno adyacentes a carcinomas basocelulares agresivos *versus* las adyacentes a carcinomas indolentes:

Los resultados del análisis cuantitativo entre las fibras de colágeno que forman parte del estroma adyacente a los CB agresivos *versus* aquellas fibras que forman parte del estroma de los tumores indolentes se encuentran sintetizados en la Tabla 10.

Tabla 10. Resumen de los resultados del análisis comparativo entre las fibras de colágeno adyacentes a carcinomas basocelulares agresivos *versus* las adyacentes a carcinomas indolentes

Colágeno circundante a CB indolentes (superficiales y nodulares, n=96) vs. agresivos (infiltrantes y micronodulares, n=61)			
Índice	Grupos	Mediana (RIC)	<i>p</i>
IOC	CB agresivos	0,48 (0,43-0,60)	0,018
	CB indolentes	0,56 (0,47-0,63)	
EHC	CB agresivos	20,48 (16,52-31,03)	0,098
	CB indolentes	18,62 (15,06-23,81)	
Orientación	CB agresivos	73,9 (49,95-83,25)	0,057
	CB indolentes	67,85 (38,72-79,25)	
Alineamiento	CB agresivos	0,75 (0,59-0,87)	0,021
	CB indolentes	0,82 (0,69-0,9)	
Longitud	CB agresivos	47,15 (43,2-50,27)	0,001
	CB indolentes	49,2 (46,4-52,8)	
Rectitud	CB agresivos	0,9 (0,9-0,91)	0,955
	CB indolentes	0,9 (0,89-0,91)	
Ancho	CB agresivos	3,2 (2,7-3,67)	0,037
	CB indolentes	3,3 (3,1-3,7)	
Ángulo	CB agresivos	71,25 (65,6-80,95)	0,054
	CB indolentes	69,4 (59,02-78,17)	
DOI	CB agresivos	381375,97 (224229,65-824853,06)	0,181
	CB indolentes	465864,21 (317173,82-958314,27)	

Resultados de la prueba U-Mann Whitney. n = número de imágenes de GSA analizadas. Los valores de orientación y ángulo se expresan en grados, los de anchura y longitud en píxeles. Los valores de *p* estadísticamente significativos (<0,05) se muestran en negrita. Abreviaturas: CB, carcinoma basocelular; EHC, índice de empaquetamiento del colágeno; DOI, densidad óptica integrada; IOC, índice de orientación del colágeno; RIC, rango intercuartil.

El análisis basado en la FFT mostró que el colágeno que rodea a los tumores indolentes (CB superficiales y nodulares) presentaba un IOC mayor ($p=0,018$) que el colágeno que rodea a los tumores más agresivos (CB infiltrantes y micronodulares); con un valor de mediana de 0,56 (RIC 0,47-0,63) en el caso de los indolentes *versus* uno de 0,48 (RIC 0,43-0,60) en el caso de los agresivos. Por otro lado, aunque los tumores indolentes

presentaron un índice EHC menor que los agresivos, estos resultados no fueron estadísticamente significativos ($p= 0,098$) (Tabla 10 y Figura 20).

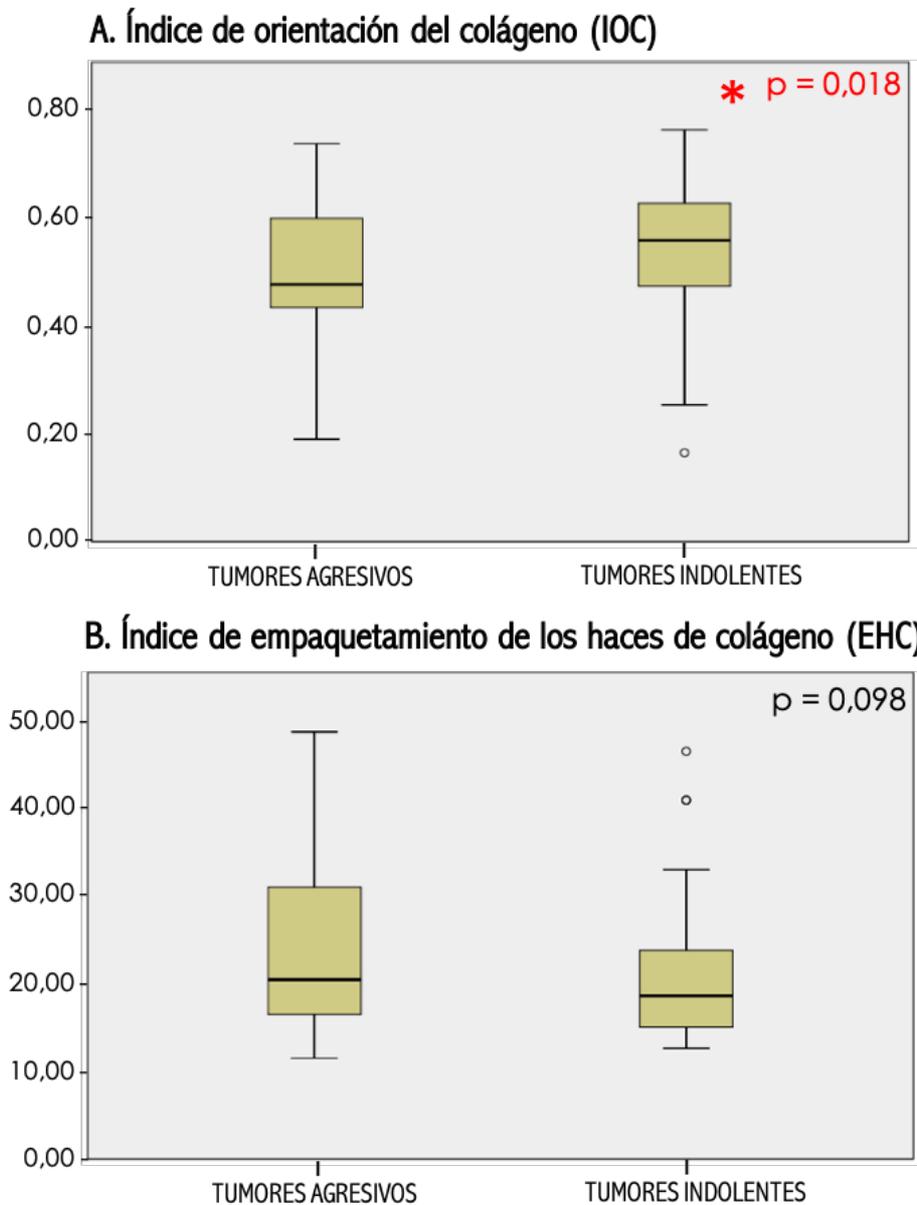


Figura 20. Diagrama de caja y bigotes que muestra los resultados del análisis comparativo basado en la FFT entre el colágeno adyacente los CB agresivos y el adyacente a los CB indolentes. A) IOC. B) EHC. Con el asterisco rojo se muestran las diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$) entre los subtipos histológicos.

El análisis mediante CurveAlign mostró un aumento del alineamiento de las fibras alrededor de los tumores indolentes (mediana 0,82 [RIC 0,69-0,9]) comparadas con los tumores agresivos (mediana 0,75 [RIC 0,59-0,87]), con diferencias estadísticamente significativas ($p=0,021$). En cuanto a la orientación, el ángulo relativo de los haces de colágeno con respecto al límite de los tumores agresivos fue mayor (mediana $73,9^\circ$ [RIC 49,95-83,25]) que en el caso de los tumores indolentes (mediana $67,85^\circ$ [RIC 38,72-79,25]), aunque estas diferencias entre ambos grupos no fueron estadísticamente significativas ($p=0,057$) (Tabla 10 y Figura 21).

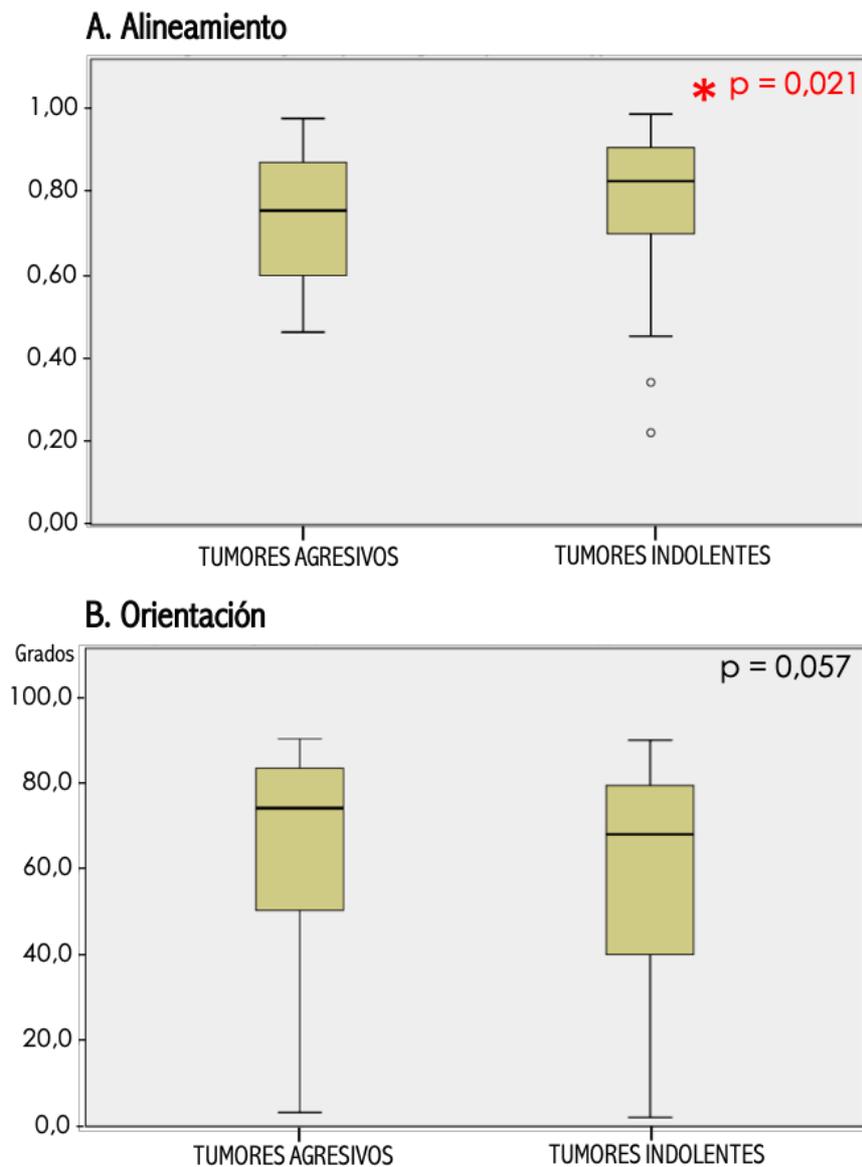
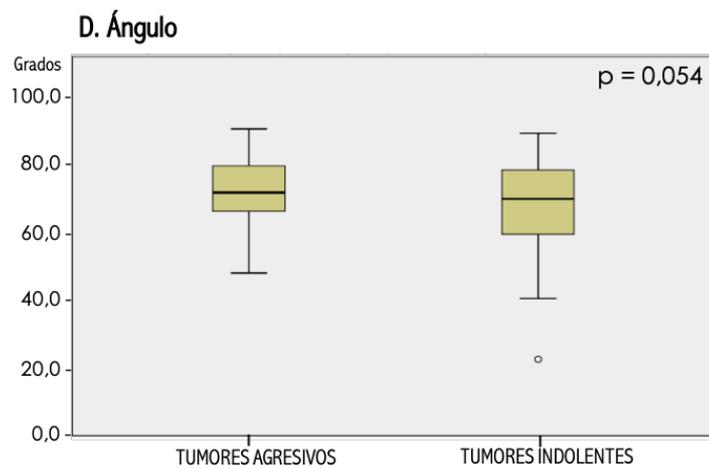
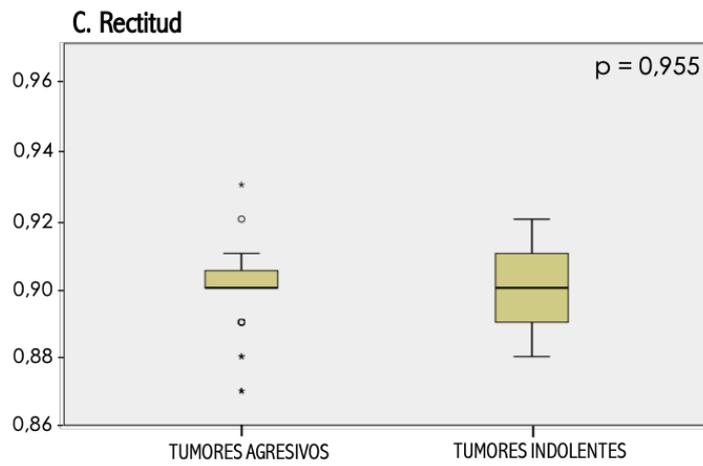
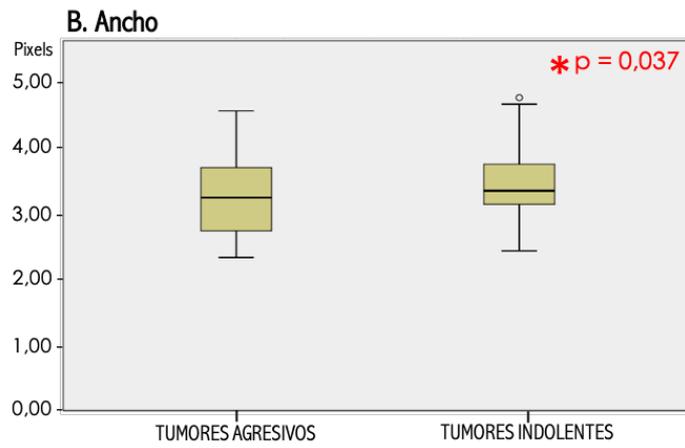
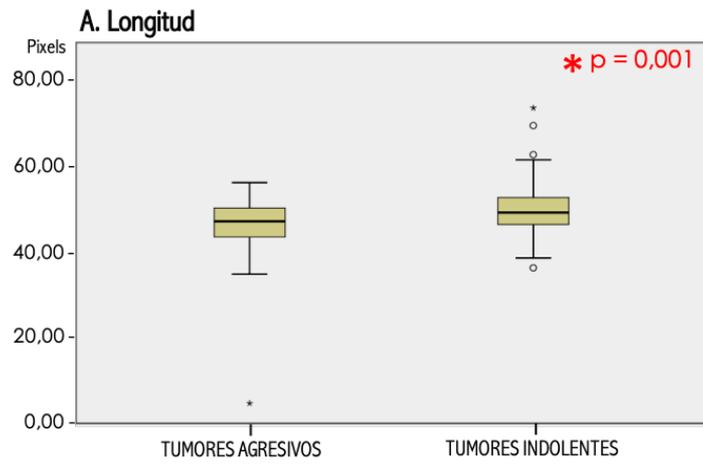


Figura 21. Diagrama de caja y bigotes que muestra los resultados del análisis comparativo mediante CurveAlign entre los haces de colágeno adyacentes los CB

agresivos y los que se encuentran adyacentes a los CB indolentes. A) Alineamiento. B) Orientación. Con el asterisco rojo se muestran las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los subtipos histológicos de CB.

Por su parte, el análisis de las fibras individuales mediante CT-FIRE mostró que las fibras que rodean a los tumores indolentes tienden a ser más largas ($p = 0,001$) y más anchas ($p = 0,037$) que aquellas que rodean a los tumores agresivos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la rectitud de las fibras ($p = 0,955$) o al ángulo ($p = 0,054$) entre los diferentes subtipos histológicos de CB (Tabla 10 y Figura 22).

Figura 22. Diagrama de caja y bigotes que muestra los resultados del análisis de las fibras de colágeno a nivel individual mediante CT-FIRE en la periferia de los CB agresivos comparadas con las que se encuentran en la periferia de los CB indolentes (Página siguiente). A) Longitud. B) Ancho. C) Rectitud. D) Ángulo. Con el asterisco rojo se muestran las categorías con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con el CB.



Por último, el análisis de la DOI de las fibras de colágeno que rodean a los CB agresivos mostró que la intensidad de la señal del colágeno es menor en estas imágenes que en las imágenes de carcinomas basocelulares indolentes. No obstante, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p=0,181$) (Figura 23).

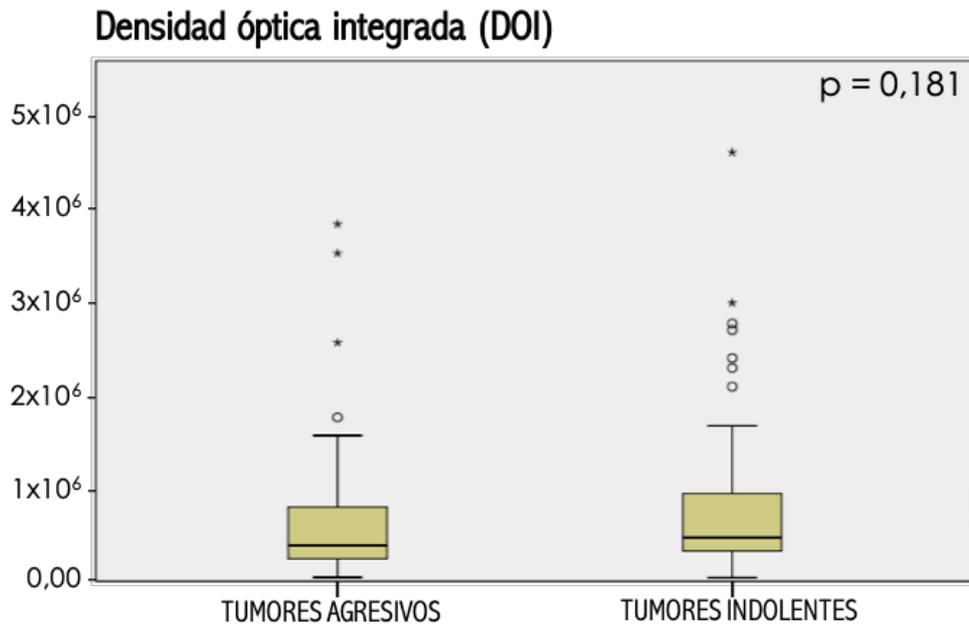


Figura 23. Diagrama de caja y bigotes que muestra los resultados del análisis comparativo entre la DOI de las imágenes del colágeno adyacente los CB agresivos frente a la de las imágenes del colágeno adyacente a los CB indolentes. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,181$).

CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

Los cambios en la MEC se han relacionado los últimos años con el desarrollo y la progresión del cáncer [79,80]. La MMF es una herramienta útil para el estudio de los cambios de la MEC. Gracias al uso de la GSA, se puede distinguir mediante MMF el colágeno tipo I de la elastina y de otros componentes de la MEC. De esta forma, con esta tecnología se puede obtener información cualitativa y cuantitativa de la distribución del colágeno alrededor de los tumores [88]. Aunque la MMF se ha utilizado previamente para describir cambios en la MEC tanto en tejidos sanos como en tumorales, existen muy pocos estudios que analicen los cambios en el colágeno asociados al CB. En el presente trabajo se muestra por primera vez la capacidad de la MMF, no sólo para diferenciar el CB de las estructuras cutáneas normales, sino también para distinguirlo de tumores benignos e incluso para clasificar estos tumores desde un punto de vista histológico entre tumores indolentes (CB superficiales y nodulares) y agresivos (CB infiltrantes y micronodulares), únicamente gracias al análisis cuantitativo del colágeno. Para la cuantificación de la distribución espacial del colágeno, se utilizaron parámetros y herramientas previamente descritos en la literatura, como los índices IOC y EHC (basados en el análisis matemático mediante la FFT) [111], la DOI (que estudia la intensidad de la señal y se calculó mediante el software ImageJ) [113] y los softwares CurveAlign y CT-FIRE (con capacidad de segmentación de las fibras individuales, y que se basan en la transformada Curvelet) [23]. Mediante el uso de estos parámetros se muestran en el presente trabajo cambios cuantificables en el colágeno que forma el estroma circundante al CB, y que ayudan a distinguirlo de estructuras cutáneas normales, de lesiones cutáneas benignas y a clasificarlo según subtipos histológicos con impacto pronóstico.

5.1 ¿Qué relación tiene el colágeno con la génesis y progresión tumoral?

Cada vez es más conocido el papel activo que juega la MEC en diferentes procesos celulares. En los últimos años se ha avanzado notablemente en el conocimiento de esta estructura. Más allá de ser únicamente un sostén del componente celular, se ha comprobado que la MEC influye en diferentes procesos celulares, como la migración y

diferenciación de las células, o la curación de heridas [78]. Además, es cada vez más conocido que los cambios en la MEC juegan un papel crítico en la patogénesis de los tumores y en su progresión.

El microambiente tumoral está compuesto tanto de elementos celulares como de no celulares, entre ellos las proteínas que constituyen la MEC. Se ha comprobado que existe una relación recíproca entre las células tumorales y los componentes de la MEC. Por un lado, las células tumorales inducen la migración al microambiente tumoral de células no malignas, como los fibroblastos o las células inmunitarias, a través de mecanismos directos o indirectos [116]. A su vez, estos elementos no tumorales parecen tener influencia en la génesis y progresión del tumor.

Dentro de los elementos no tumorales que forman parte del microambiente del tumor, destacan los fibroblastos asociados al cáncer (CAFs, del inglés *cancer-associated fibroblasts*). Los CAFs son fibroblastos que se activan en el microambiente tumoral y favorecen la progresión de diferentes tipos de tumores [117–119]. Además de estimular la proliferación, la angiogénesis y la metástasis de las células tumorales, los CAFs también influyen en la génesis tumoral regulando el colágeno de la MEC, pues al activarse estos fibroblastos inducen la producción de colágeno tipo I. Este aumento del colágeno tipo I favorece la progresión tumoral puesto que se ha relacionado con la transición epitelio-mesénquima. Esta transición es el proceso biológico en el que las células epiteliales alcanzan un fenotipo de tipo mesenquimal que favorece su migración; y en el caso de las células tumorales permite la invasión de los tejidos adyacentes y finalmente las metástasis a distancia [120,121].

Centrándonos en el papel del colágeno en el microambiente tumoral, cambios y remodelamiento de estas fibras se han descrito en todas las fases de la génesis y progresión de los tumores [122]. La relación recíproca ya mencionada que existe entre las células tumorales y los componentes de la MEC incluye al colágeno. Por un lado, se conoce que las células tumorales influyen al colágeno produciendo cambios estructurales a través de diferentes mecanismos en relación con los oncogenes, factores de transcripción, vías de transducción o receptores celulares [123]:

- **Mutaciones en oncogenes:** mutaciones en el gen supresor de tumores *P53* regulan la formación de TACS-3 (del inglés: *Tumor Associated Collagen Signature-3*) en el cáncer de mama. Los TACS son un sistema que se describió por primera vez en 2006 y que diferencia tres capas de colágeno alrededor del cáncer de mama invasivo [124]. Concretamente, TACS-3 se refiere a una angulación perpendicular del colágeno con respecto al borde del tumor que se ha correlacionado con la invasión tumoral [124,125]. Otro ejemplo serían las mutaciones en el gen *PTEN*, que resultan en el aumento del reclutamiento de CAFs y en el aumento de la producción de colágeno [116].
- **Factores de transcripción:** mutaciones en los factores de transcripción celular pueden llevar a la aparición de tumores y pueden afectar a la expresión del colágeno en estos. Yoshida et al. [126] mostraron los roles funcionales del factor nuclear (NF- κ B)/p65 y Sox9 regulando el colágeno tipo II alfa-1 en tumores de estirpe sarcomatosa.
- **Vías de transducción:** las células cancerosas influyen al colágeno a través de las vías de transducción de señales que regulan los procesos celulares. Como ejemplo, un estudio reciente de Sun et al. [127] muestra como la inactivación de la vía TGF- β /Smad (conocida por tener un papel principal en la fibrogénesis de diferentes del colágeno en órganos y tumores) altera la expresión del colágeno tipo X alfa 1 en el cáncer de cérvix. En el caso del melanoma, es conocida que la mutación *BRAF*(V600E) activa constitutivamente la vía de señalización Ras-Raf-Mek-Erk MAPK y facilita la expresión tumoral. Vemurafenib, un fármaco inhibidor de esta vía que se usa en el tratamiento del melanoma no resecable o metastásico, ha demostrado aumentar la síntesis del colágeno tipo I a nivel celular [128].
- **Receptores celulares:** los receptores acoplados a proteína G están implicadas en la regulación de diferentes procesos celulares, como la proliferación de las células o la estructuración citoesqueleto. También se conoce que regulan la rigidez de la matriz extracelular a través del alineamiento del colágeno [123]. Un ejemplo es la reducción de la expresión de G3BP2 (*Ras GTPase-activating protein-binding protein 2*) que produce un mayor alineamiento del colágeno (y en consecuencia

un incremento de la rigidez del microambiente tumoral) y predice un peor pronóstico en el cáncer de mama [129].

Por otro lado, el colágeno a su vez influye sobre las células y la progresión tumorales. El colágeno puede unirse con los receptores del dominio de discoidina (DDR de sus siglas en inglés: *Discoidin domain receptor*). Estos receptores forman parte de la familia de los receptores de las tirosinas quinasas y se han relacionado con el desarrollo embrionario y la homeostasis celular. En los últimos años, se ha comprobado como estos receptores también modulan la MEC y tienen un papel importante en varios tumores humanos, favoreciendo la supervivencia de las células tumorales y la resistencia a determinados tratamientos. Existen dos receptores principales: DDR1, que se expresa fundamentalmente en células epiteliales; y DDR2, que lo hace en las mesenquimales [130]. Con ambos receptores pueden interaccionar tanto los colágenos tipo I, II y III [131], y es conocido que se encuentran sobreexpresados en diferentes tipos de cáncer, relacionándose con la progresión de la enfermedad y con un mal pronóstico [130].

En atención a todos estos datos, podemos afirmar que el papel del colágeno en la génesis tumoral es altamente complejo. Se necesitan más estudios para comprender de forma completa su función en el desarrollo de tumores y así poder desarrollar en el futuro dianas terapéuticas dirigidas al mismo.

5.2 ¿Qué papel juega la microscopía multifotón en el estudio del colágeno?

El colágeno puede estudiarse mediante multitud de técnicas de laboratorio. Tradicionalmente, el colágeno se ha estudiado desde un punto de vista histológico (mediante técnicas de H&E) o histoquímico (tinción tricrómica de Masson, tinción de Van Gieson, Picrosirius red...). También puede abordarse su estudio mediante la microscopía electrónica. En todos estos casos, los tejidos se estudiarán *ex vivo* y requerirán una serie de preparaciones que podrían alterar de forma secundaria la matriz extracelular [105].

En los últimos años, el interés por el estudio de técnicas *in vivo* que permitan valorar los tejidos sin procesamiento y que agilicen los procesos diagnósticos, es cada vez mayor. Al ser la piel un órgano tan accesible, estas técnicas han tenido un desarrollo especialmente extenso en el campo de la dermatología oncológica. Entre ellas, destacan la TOC, la MCR y la MMF como técnicas de imagen no invasivo que permiten el diagnóstico directo sobre la piel del carcinoma basocelular, entre otros.

No obstante, estas técnicas presentan una limitación en común: el CB carece de señal nuclear y en las imágenes aparece como una silueta oscura. En ocasiones, esta falta de señal nuclear puede dificultar el correcto diagnóstico de las masas tumorales y hacer que puedan confundirse con otras estructuras de la piel, como los folículos pilosos o las glándulas sebáceas. Por ejemplo, en el caso de la MCR, el diagnóstico del CB se asocia a una sensibilidad alta, de entorno al 80-90% [18], pero una especificidad más baja ($\approx 54\%$) [19]. En este contexto, la MMF podría incrementar la especificidad diagnóstica del CB, gracias a la posibilidad que ofrece de distinguir elementos de la matriz extracelular. Mientras que la MCR no puede diferenciar claramente entre los componentes de la matriz extracelular, la MMF puede extraer información de la matriz que puede ayudar al diagnóstico de los tumores. Mediante la señal de GSA, la MMF puede proporcionar información cualitativa y cuantitativa del colágeno, fundamentalmente del tipo I, distinguiéndolo de otros elementos de la matriz extracelular como la elastina [88]. Las estructuras no centrosimétricas, como el colágeno fibrilar, son las responsables de la señal GSA. Dentro de los diferentes tipos de colágeno, el colágeno tipo I es el más frecuente y el que tiene la estructura más ordenada, y por tanto, el que emite la señal de GSA de forma más intensa [105]. Tras ser estimulados por los fotones, estas moléculas de colágeno emiten a su vez fotones con la mitad de energía que los absorbidos, lo que permite aislar fácilmente la señal GSA y separarla de las señales de autofluorescencia que proporcionan a los tejidos la NADH o la melanina (que también son captadas por el MMF). Esta capacidad de la MMF la convierte en una técnica idónea para estudiar cualitativa y cuantitativamente el colágeno peritumoral, y su relación con la progresión del cáncer. Otras ventajas de esta técnica son la alta capacidad de penetración en tejidos biológicos, su escasa fototoxicidad fuera del plano focal, o la no necesidad de usar tinciones para evaluar los tejidos [132], por lo que en los últimos años cada vez son más los estudios en modelos humanos y animales con esta tecnología.

Existen varios métodos para analizar el colágeno mediante MMF a partir de la señal de GSA, que se pueden agrupar fundamentalmente en tres categorías: métodos basados en la “textura” del colágeno en las imágenes, métodos basados en la FFT y aquellos que se centran en la segmentación y estudio de las fibras de colágeno a nivel individual [105].

Los estudios basados en la textura se fundamentan en el uso de métodos estadísticos directamente sobre las imágenes o en matrices generadas a través de los píxeles de estas. Un ejemplo de estos métodos sería el cálculo de la media y desviación estándar de la intensidad de la señal de los píxeles de la imagen. Este cálculo traduce la intensidad de la señal de GSA, y, en consecuencia, pretende medir la concentración de colágeno en la imagen. La medida de la densidad óptica integrada (DOI) también sería un ejemplo de este tipo de mediciones [113,133]. Otras medidas estadísticas que se pueden utilizar para analizar la textura del colágeno son la curtosis o la entropía. Un punto importante a tener en cuenta es que dentro de este grupo de mediciones sobre el colágeno, la terminología no es constante y pueden existir discrepancias entre términos que lleven a confusión y dificulten las comparaciones [105]. Por otra parte, los estudios basados en la FFT cuentan con un respaldo amplio en la literatura y nos informan de la isotropía/anisotropía de las fibras de colágeno en las imágenes. Ejemplos de índices basados en este cálculo serían el IOC o el índice de EHC [112,113]. Finalmente, los métodos de segmentación (como el algoritmo CT-FIRE) analizan propiedades geométricas de las fibras a nivel individual: longitud, ancho o curvatura, entre otras [23].

Aunque se habían descrito previamente mediante estos análisis cambios en el colágeno con relación a diferentes tumores en la literatura [134–140], hasta el momento existían muy pocos estudios que analizaran al menos alguno de estos aspectos con relación al CB [113,141], y ninguno que estudiase las diferencias entre estos tumores y otros benignos, o entre los diferentes subtipos histológicos del mismo. En el presente trabajo, gracias a las imágenes de MMF y GSA, se han identificado las fibras de colágeno que rodean al CB y se han utilizado diferentes tipos de medidas cuantitativas para extraer información sobre estas: medidas relacionadas con la FFT (IOC, EHC), medidas de “textura” (DOI) y medidas de segmentación (CT-FIRE). A continuación, profundizaremos en la aportación de cada uno de estos parámetros al análisis del colágeno.

5.2.1 ¿Cuál es la contribución de la transformada de Fourier al análisis del colágeno peritumoral en el carcinoma basocelular?

El análisis de la orientación de los haces de colágeno mediante la FFT se describió por primera vez en 2002 por Van Zuijlen et al. [111]. Estos autores demostraron que el análisis mediante la FFT permitía cuantificar la organización de los haces de colágeno de una manera más fiable y objetiva que la observación directa de los tejidos. Gracias a la FFT se puede conocer la isotropía/anisotropía de los tejidos mediante los diagramas de 2D que se generan tras el análisis. Así, un diagrama con una morfología más elíptica indica una organización mayor de las fibras (mayor anisotropía), mientras que una morfología del diagrama más circular indica una distribución más aleatoria (menor anisotropía). En su estudio, Van Zuijlen et al. analizaron 152 muestras de dermis sana y de tejido cicatricial, fijadas en formalina y teñidas mediante H&E, y estudiadas mediante el microscopio confocal y microscopía óptica convencional. Estas imágenes fueron evaluadas por cuatro expertos que las puntuaron mediante una escala de cinco rangos: haces con una organización extremadamente paralela, predominantemente paralela, mixta, predominantemente aleatoria y extremadamente aleatoria. Los resultados se promediaron y se compararon con los resultados tras realizar el análisis de Fourier. Para calcular la exactitud de la prueba se utilizaron imágenes generadas por ordenador con una orientación fijada y previamente conocida al crear la imagen, puesto que no existe un *gold-standard* universalmente aceptado para conocer la orientación de las fibras de colágeno en una imagen histológica [111]. El análisis de la orientación del colágeno en estas imágenes mediante la FFT mostró una mayor correlación que la orientación promedio indicada por los 4 evaluadores. En consecuencia, con este estudio se propuso por primera vez que este análisis matemático permitía una evaluación más objetiva y exacta de la distribución de los haces de colágeno que la mera observación al microscopio.

En un estudio posterior, se comprobó y validó que la FFT también es útil para cuantificar la orientación de los haces de colágeno en tinciones clásicas para el colágeno como Picrosirius red y el tricrómico de Masson [142]. Estos autores demostraron en 46 muestras de piel sana y 8 de piel con esclerodermia que el análisis matemático mediante la FFT era superior a la observación por varios expertos. Además, el análisis mediante la FFT no sólo se considera superior a la observación directa, sino que también es más específico

que los análisis de texturas que se basan en la intensidad de los píxeles, como la DOI [105].

En el caso de las imágenes de GSA, que permiten aislar la señal concreta de estructuras no centrosimétricas como el colágeno fibrilar, son varios los estudios que han utilizado con éxito la FFT para cuantificar la orientación de las fibras en modelos animales [143–148] y tejidos humanos [88,144,149]. En este último grupo, destaca un estudio de van Zuijlen et al. [150], en el que analizaron la disposición de los haces de colágeno en piel sana y cicatricial. Los autores pusieron a prueba la hipótesis por la cual los haces de colágeno se disponen de forma paralela en las cicatrices según la tensión mecánica a la que estén sometidas durante el proceso de cicatrización. Aunque este extremo no pudo ser demostrado, sí encontraron un IOC mayor (mayor alineamiento paralelo de los haces de colágeno) y un EHC menor (mayor densidad en el empaquetamiento de los haces) en la piel cicatricial con respecto a los controles de piel normal.

También se ha aplicado este análisis sobre imágenes de GSA diferentes tipos tumores malignos, intentando distinguirlos de estructuras benignas. En cáncer de mama, Falzon et al. [151] demostraron diferencias entre las fibras de colágeno que forman parte del estroma normal de la mama, y las que forman parte de mamas con cambios benignos (como los fibroadenomas) o de las circundantes a los carcinomas malignos e invasivos. Estos autores observaron que las fibras de colágeno son más rectas y se disponen más paralelas alrededor de los tumores malignos. Otros estudios han mostrado hallazgos similares, demostrando mediante la FFT que las fibras de colágeno están más alineadas alrededor de los tumores malignos de mama [152,153]. Un estudio más reciente refiere que el análisis mediante la FFT podría, no sólo distinguir entre tumores malignos y lesiones benignas de la mama, sino detectar diferencias entre carcinomas invasivos de mama de diferentes grados histológicos (grados 0, I, II and III) [149]. También se han estudiado mediante FFT, entre otros índices, el colágeno presente en adenopatías positivas en cáncer de mama. Kakkad et al. [154] encontraron que las linfadenopatías positivas para metástasis de cáncer de mama presentaban significativamente mayor densidad de colágeno tipo I que aquellas sin metástasis. Los autores proponían explorar este biomarcador como un detector precoz para la detección de metástasis ganglionares en estos tumores. Además, un hallazgo importante de este trabajo fue mostrar que la fijación e inclusión en parafina que forma parte del procesamiento rutinario de las

muestras histológicas ganglionares no tiene impacto posterior en la detección y cuantificación del colágeno tipo I en las imágenes de GSA. De esta forma, la MMF podría implementarse en un futuro como método de rutina en el estudio del colágeno de las piezas tras su procesamiento histológico habitual.

Hallazgos similares se han observado en otros tumores, como los tumores ováricos, donde mediante la FFT entre otros análisis se han encontrado cambios que permiten distinguir los tumores ováricos de los tejidos benignos, pero por el momento no los diferentes tipos tumorales entre sí [155–157]. Además, no sólo se han encontrado cambios mediante la FFT en el colágeno adyacente tejidos tumorales, sino que hay estudios recientes como el de Despotović et al. [122] que muestran cambios en la organización del colágeno en fragmentos de colon sano hasta 20 cm alejados del tumor.

En cuanto al CB, existían muy pocos datos sobre la orientación del colágeno perilesional analizada mediante la FFT. El análisis de imágenes mediante la FFT puede realizarse a través de varios paquetes de software, entre ellos MATLAB (MathWorks, Natick, MA, EE.UU.) o ImageJ [105]. En nuestro estudio, realizamos el análisis mediante la FFT a través del software ImageJ para calcular la orientación de las fibras de colágeno y lo cuantificamos con dos índices previamente descritos y validados en la literatura: el índice de orientación del colágeno (IOC) y el índice de empaquetamiento de los haces de colágeno (EHC) [111,112,150]. De acuerdo con los resultados obtenidos en nuestro trabajo, los haces de colágeno que rodean al CB presentan un IOC más alto que los que rodean a estructuras las cutáneas normales, lo que sugiere que un mayor alineamiento del colágeno que rodea a los tumores. Es decir, alrededor de los CB los haces de colágeno adquieren una orientación más paralela entre sí que cuando se disponen alrededor de estructuras cutáneas normales, como las glándulas sebáceas o los folículos pilosos. Estos datos van en línea con un estudio más pequeño previo, realizado por Kiss et al. en 2019 [113]. En su estudio, los autores compararon 10 muestras de CB normales con muestras de tejido completamente sano, encontrando un IOC mayor en las muestras de CB que en el tejido sano. En nuestro estudio, comparamos los CB con las estructuras cutáneas normales que formaban parte dentro de ese mismo tejido peritumoral, que generalmente en el caso de los carcinomas (más frecuentes en áreas fotoexpuestas) presenta unas características de daño actínico que pueden alterar el colágeno de la muestra. La matriz extracelular es una estructura dinámica que se modifica en su composición y estructura

con el paso de los años, y los cambios a nivel del colágeno se incluyen en este proceso de fotoenvejecimiento. En las pieles jóvenes, el colágeno es abundante, densamente empaquetado y bien organizado en fibrillas. Con el paso del tiempo, y especialmente en la presencia de daño solar, las fibras de colágeno se fragmentan y se degradan [158]. El conocimiento de este hecho justificó el enfoque de nuestro estudio, en el que quisimos eliminar la influencia de este factor comparando al CB con estructuras normales adyacentes al tumor, pero procedentes de un mismo tejido con unas mismas condiciones de fotoenvejecimiento. Esta aproximación es más cercana a la práctica clínica real de la cirugía de Mohs entre otras, en la que el cirujano ha de discriminar si una estructura corresponde a infiltración maligna del tumor o a una estructura normal de la piel que se encuentre adyacente al carcinoma en la misma muestra. Además, en nuestro trabajo realizamos un análisis comparativo entre las principales estructuras normales que pueden simular un CB para un cirujano de Mohs: fragmentos de epidermis, folículos pilosos y glándulas sebáceas. También incluimos la comparación con tumores benignos. Con cada una de estas estructuras se encontraron cambios significativos en el IOC, presentando el CB un IOC mayor (mayor alineamiento de las fibras) que todas las estructuras normales de la piel estudiadas y también que los tumores benignos.

Finalmente, nuestros resultados indican que el índice IOC puede ser útil para distinguir los diferentes subtipos histológicos de CB. En atención a los mismos, los carcinomas más indolentes (los subtipos superficial y nodular) presentan un IOC mayor que los agresivos (subtipos infiltrante y micronodular) ($p=0,018$). En otras palabras, los CB indolentes mostraron mayor alineamiento en las fibras de colágeno perilesionales que los tumores agresivos. En histopatología, hallazgos similares (haces de colágeno organizados de forma paralela alrededor de los límites tumorales) se han observado en CB superficiales [74]. Nuestro estudio muestra que el IOC es un instrumento con potencial para discriminar entre diferentes tipos histológicos de CB y, por tanto, ayudar a los clínicos a determinar el pronóstico de los tumores y el consecuente tratamiento más adecuado para los mismos.

Por otra parte, el índice de EHC mostró que los haces de colágeno están más densamente empaquetados alrededor de los tumores malignos en comparación a estructuras normales de la piel (EHC menor, $p<0,001$). En el estudio de Kiss et al. [113], se invirtieron los valores de dicha relación, hallando estos autores un EHC mayor en los tumores, aunque

no se alcanzó la significación estadística en el resultado. También se encontró un menor índice EHC con relación a los CB con relación a tumores benignos ($p < 0,001$), indicando que los haces de colágenos son más compactos alrededor de los tumores malignos. Por su parte, en el análisis entre subtipos histológicos en el caso de los CB indolentes, pero en este último caso no se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,098$).

En atención a estos resultados, se puede afirmar que el análisis del colágeno con la FFT y mediante los índices IOC y EHC permitiría obtener información consistente para distinguir los tumores malignos de las estructuras normales de la piel, de los tumores benignos e incluso hacer distinciones entre los diferentes subtipos histológicos.

5.2.2 ¿Cuál es la contribución de los softwares CurveAlign y CT-FIRE al análisis del colágeno peritumoral en el carcinoma basocelular?

CurveAlign y CT-FIRE son potentes instrumentos para el estudio cuantitativo del colágeno basados en la transformada de Curvelet [23], que permite reducir el ruido de las imágenes e incrementar el contraste de los bordes de las fibras para una mejor representación de las mismas. Estos softwares de código abierto integrados en MATLAB combinan una gran capacidad para definir la orientación de las fibras basada en la transformada de Curvelet, y la posibilidad de extraer información de las fibras individuales mediante el algoritmo de extracción de fibras (FIRE, del inglés *Fiber extraction algorithm*).

CurveAlign se desarrolló en primer lugar para informar sobre la disposición espacial de del grueso de los haces de colágeno, y tiene como objetivo fundamental cuantificar el alineamiento (o anisotropía) y el ángulo de los haces de colágeno en una región de interés en relación con un límite establecido por el usuario, que puede ser un límite tumoral [114]. Posteriormente, los creadores del software buscaron profundizar en el conocimiento del papel que juega el colágeno en la génesis y crecimiento de los tumores, así como en la progresión y pronóstico de los mismos. Para ello, desarrollaron CT-FIRE, que se integra en CurveAlign y permite proporcionar información sobre cada fibra a nivel individual.

La combinación de ambas herramientas nos ofrece información amplia de la distribución del colágeno en aquellas zonas que queramos estudiar.

Aunque estos algoritmos permiten la medición de las fibras individuales en cuanto a su longitud o su grosor, los propios autores de la herramienta indican que el mayor potencial de esta es la identificación del alineamiento y orientación (o ángulo) de las fibras colágenas, pues son estos marcadores los que más consistentemente se han relacionado con el pronóstico de diferentes tumores [23].

Uno de los primeros estudios clínicos basado en la aplicación de estos softwares para la medición de colágeno fue el estudio de Bredfeldt et al. [134]. Previamente, Provenzano et al. [124] habían propuesto en 2006 un sistema de cambios o “firmas” en el colágeno peritumoral (las ya mencionadas *Tumor-Associated Collagen Signatures* o TACS) que definían el pronóstico del tumor. Los autores usaron un modelo animal de ratón con cáncer de mama y sano para tomar las muestras, que analizaron con MMF obteniendo imágenes de autofluorescencia y de GSA. También se tomaron muestras para realizar un estudio histológico y obtener imágenes teñidas con H&E, tricrómico y Picosirius red, que permitieran identificar las fibras de colágeno y caracterizar la morfología del tumor más fácilmente en las imágenes de microscopía multifotón. Gracias a las imágenes de MMF y GSA se identificaron 3 distribuciones diferentes del colágeno que rodeaba al cáncer de mama. Por un lado, TACS-1, que se define como la presencia de colágeno denso en la región cercana al tumor (identificado como un aumento en la densidad de la señal). Conforme aumentaba el tamaño del tumor, los autores encontraron una segunda firma de colágeno, llamada TACS-2, que consiste en fibras de colágeno tensas y estiradas alrededor del mismo. Esta distribución posiblemente se debe al crecimiento de la masa tumoral, que hace que las fibras se dispongan de forma paralela alrededor del límite del tumor. Por último, en las regiones en las que las masas tumorales presentan de forma inminente riesgo de invasión, los autores hallaron una tercera distribución del colágeno o TACS-3: fibras alineadas en dirección a la invasión tumoral, o lo que es lo mismo, dispuestas perpendicular a los límites del tumor o con un ángulo cercano a los 90°. De esta forma, se conoce como TACS-3 a una disposición radial de las fibras alrededor de los límites del tumor (es decir, un ángulo de las fibras mayor) que se ha considerado predictora de invasión tumoral y metástasis.

Estos hallazgos preliminares en modelos animales se confirmaron en pacientes humanos en un estudio posterior. Conklin et al. [135] analizaron mediante imágenes de GSA el colágeno peritumoral de 196 muestras de carcinoma de mama. Para el estudio de la distribución espacial del colágeno, los autores tuvieron que seleccionar de forma manual el borde del tumor y las regiones de interés en las que analizar la orientación de las fibras de colágeno. Tres observadores independientes clasificaron las imágenes en dos categorías: TACS-3 positivas o negativas, según la distribución perpendicular o no de las fibras de colágeno con respecto al borde del tumor. A continuación, analizaron la supervivencia específica de enfermedad y la supervivencia libre de enfermedad, que se compararon mediante una prueba *log-rank* entre grupos (pacientes TACS-3 positivos y TACS-3 negativos). Además, se realizó un estudio multivariante para eliminar la influencia de otros factores que pudieran estar influyendo en el pronóstico del tumor (tamaño tumoral, edad, sexo, expresión de HER-2, etc.). De acuerdo con sus resultados, los pacientes TACS-3 positivos tenían peores supervivencias específica y libre de enfermedad, de forma estadísticamente significativa. De esta forma, los autores proponían que TACS-3 podía considerarse un biomarcador sólido con información pronóstica en el caso del cáncer de mama. También señalaban los autores que TACS-3 no aparecía alrededor del perímetro completo del tumor, sino sólo en algunas áreas de este de forma local. Esto mismo se había observado en el estudio previo en ratones, en los que estas áreas TACS-3 coincidieron con las zonas de invasión tumoral [124]. Teniendo en cuenta estos datos, los autores teorizaban que TACS-3 se relacionaba con un peor pronóstico en cáncer de mama en humanos, porque la disposición radial de las fibras podría favorecer la invasión tumoral.

Aunque los hallazgos de Conklin et al. fueron muy relevantes al demostrar que la distribución de las fibras de colágeno alrededor del carcinoma de mama definía su pronóstico, tanto en su caso como en el estudio de Provenzano et al., la medición manual de la orientación y ángulo de las fibras dificultaba la estandarización de este método. Por ello, en un trabajo posterior, Bredfeldt et al. [134] buscaron validar los TACS automatizando el método de identificación del ángulo de las fibras. Para ello, los autores usaron las muestras de la misma cohorte de pacientes, pero en este caso, aplicaron en las imágenes de GSA el software CT-FIRE para la extracción automatizada del ángulo relativo de las fibras con respecto a los bordes del tumor. Estos bordes a su vez se identificaron mediante algoritmos, que tras un aprendizaje semisupervisado,

identificaban las células epiteliales que forman el límite tumoral. De esta forma, los algoritmos clasificaron las imágenes de forma semiautomática en TACS-3 positivas y negativas. Los autores encontraron que efectivamente los pacientes con muestras TACS-3 positivas presentaron una supervivencia significativamente menor. Además, los autores hallaron que la correlación con la medición manual que se había realizado en esa misma cohorte en el estudio previo de Conklin et al. fue alta. En consecuencia, afirmaban que la medición semiautomática del ángulo de las fibras de colágeno mediante CT-FIRE y otros algoritmos de procesamiento de las imágenes proporcionaba información pronóstica de interés en pacientes cáncer de mama.

Posteriormente, parte de este mismo grupo de trabajo quiso analizar si el colágeno que rodea al tumor permitía predecir la recurrencia del carcinoma ductal *in situ* [136]. Aunque no llegaron a demostrar este hecho, los autores sí mostraron mediante el uso de CurveAlign en las imágenes de GSA que las fibras que rodeaban al carcinoma ductal *in situ* tenían tendencia a mostrarse más perpendiculares (es decir, a presentar un ángulo u orientación mayor) al límite del conducto que aquellas que rodeaban los conductos normales. Estos resultados se consideraron en línea con los estudios previos de este mismo grupo [134,135].

Recientemente, Bondelon et al. [159] utilizaron ambos softwares (CurveAlign y CT-FIRE) para analizar cuantitativamente el colágeno de biopsias con carcinoma de mama y tejido mamario sano, y correlacionar la arquitectura del colágeno con la densidad de las mamografías. El aumento de densidad en las mamografías se ha relacionado en estudios epidemiológicos con un aumento de riesgo de cáncer de mama [160], aunque la relación entre ambos fenómenos no está aclarada. En su estudio, Bondelon et al. encontraron que la densidad de las fibras de colágeno se correlacionaba positivamente con la densidad mamográfica, no a nivel global, pero sí en los puntos de biopsia mamaria y 2 mm a su alrededor. De acuerdo con sus resultados, conforme aumentaba la severidad de la lesión desde tejido sano hasta maligno, las fibras tendían a ser más cortas, más finas, más rectas y más alineadas entre sí. Gracias al estudio del ángulo de las fibras, los autores también analizaron las firmas de colágeno o TACs anteriormente mencionadas. En la misma línea que estos estudios previos, en su cohorte TACS-3 estaba ausente en la mayoría de las muestras de tejido sano o con patología benigna; mientras que estaba presente en un porcentaje amplio de los carcinomas, especialmente en aquellos mayores de 1 cm. En

consecuencia, hipotetizaban los autores que TACS-3 podría ser un marcador tardío en cuanto a la progresión e invasión tumoral [159].

Estudios similares se han realizado en otros tumores, como es el caso del carcinoma de páncreas. Drifka et al. [161] en 2015 analizaron las diferencias existentes entre el colágeno que compone el estroma del adenocarcinoma pancreático ductal, de la pancreatitis crónica y del tejido pancreático normal. Sobre imágenes de GSA aplicaron CurveAlign y CT-FIRE para medir el alineamiento, la longitud, el ancho y la rectitud de las fibras de colágeno. Los autores encontraron que el colágeno se organizaba de una forma más alineada y paralela alrededor de los adenocarcinomas ductales en comparación al tejido pancreático sano o al tejido con pancreatitis crónica, de forma estadísticamente significativa. Al clasificar los tumores pancreáticos por grados, no se encontró relación entre el grado tumoral y el nivel de alineamiento del colágeno. Interesantemente, observaron que el colágeno se organizaba de forma alineada y paralela en aquellas zonas en las que el adenocarcinoma infiltraba los tejidos circundantes, siguiendo la misma dirección que la invasión tumoral. Estos datos están en la línea de otros estudios que indican que el colágeno podría guiar la migración de las células tumorales en la cascada metastásica [162,163].

Posteriormente, los autores quisieron comprobar si el análisis morfológico del colágeno podía predecir el pronóstico de pacientes con carcinoma de páncreas [137]. Para ello, se valieron de nuevo de CurveAlign y CT-FIRE, y analizaron imágenes de GSA del colágeno de muestras de 114 pacientes con adenocarcinoma de páncreas. Los autores observaron que un alineamiento mayor del colágeno se asociaba a una menor supervivencia, al igual que ocurría con el cáncer de mama [134]. Además, el alineamiento del colágeno mostró tras un análisis multivariante ser un factor independiente de mal pronóstico más allá de los factores pronósticos clásicos en el adenocarcinoma ductal de páncreas (márgenes afectos, grado tumoral, estadio...). Finalmente, otro objetivo del trabajo fue definir un perfil fenotípico de la transición epitelio-mesénquima de estos tumores. Para ello, los autores analizaron los niveles de marcadores inmunohistoquímicos relacionados con los fibroblastos asociados al cáncer (CAFs), como la alfa actina del músculo liso (α -SMA, del inglés *alpha-smooth muscle actin*) y el sindecano-1. Los autores comprobaron que, en el adenocarcinoma ductal de páncreas, el nivel de alineamiento de las fibras de colágeno tenía una correlación directa con los niveles de

expresión tanto de α -SMA como de sindecano-1. De esta forma, la disposición paralela de las fibras y la expresión de estas proteínas se podrían considerar biomarcadores de mal pronóstico en el caso de estos tumores. En atención a los resultados de su análisis, teorizaban los autores que esta relación con tumores de mal pronóstico podría deberse a que las células tumorales se valen de los cambios de la MEC (incremento de alineamiento del colágeno y expresión de marcadores de transición epitelio-mesénquima como la α -SMA o el sindecano-1), para favorecer la invasión tumoral y comenzar la cascada de la metástasis.

En nuestro estudio, el análisis de las fibras individuales basado en CT-FIRE mostró que las fibras colágenas que rodean al CB son más cortas y estrechas que las que rodean la epidermis y las glándulas sebáceas, sin encontrarse diferencias con los folículos pilosos. Este resultado es contradictorio con los hallazgos de Kiss et al. [113], que describieron que las fibras de colágeno que rodean al CB son fibras más largas que las que se encuentran alrededor de las muestras de piel sana, sin encontrar diferencias en cuanto al ancho. Estas diferencias pueden deberse a la ya expuesta desigualdad entre las muestras incluidas en cada estudio: en el caso de Kiss et al. se compararon muestras de CB nodulares con muestras distintas de piel completamente sana; mientras que en nuestro estudio se comparó el CB con las estructuras circundantes normales que se encontraban adyacentes al tumor en el mismo tejido. En cuanto al ángulo, Kiss et al. describieron un menor ángulo relativo en las fibras de colágeno que rodean al CB con respecto a los controles. En nuestro estudio observamos ese menor ángulo con relación a las glándulas sebáceas ($p=0,001$), sin identificarse diferencias en cuanto a los folículos pilosos o la epidermis. También se encontró un menor ángulo relativo de las fibras de colágeno del CB con respecto a las fibras de lesiones benignas ($p<0,001$). Interesantemente, los CB agresivos (infiltrantes y micronodulares) presentaron un mayor ángulo relativo de las fibras con respecto a los CB indolentes (superficiales y nodulares). Esta disposición más perpendicular de las fibras con respecto al borde de los tumores agresivos se tradujo en un p -valor cercano a la significación estadística ($p=0,054$), aunque sin alcanzarla. Este resultado iría en línea con los hallazgos de Provenzano et al. en cáncer de mama, que propusieron que un TACS-3 o una disposición radial de las fibras alrededor de los límites del tumor (es decir, un ángulo de las fibras mayor), se consideraba un predictor de invasión tumoral inminente y metástasis [124]. En nuestro caso, los tumores con más riesgo de invasión presentaron también fibras de colágeno con un ángulo mayor con

respecto al borde tumoral que los tumores indolentes, con un p -valor cercano a la significación estadística. No obstante, puesto que en el caso de lesiones sin riesgo de invasión, como son los tumores benignos y las glándulas sebáceas de la piel, el ángulo de las fibras fue mayor que en el de los CB, y en esta ocasión con significación estadística, por el momento habría que considerar el ángulo de las fibras un índice menos consistente que otros parámetros para el estudio del CB.

En cuanto al análisis con CurveAlign, demostró un alineamiento mayor de las fibras de colágeno alrededor del CB con respecto a las estructuras normales de la piel ($p < 0,001$), resultado equiparable al obtenido por Kiss et al. en piel normal [113]. Además, también se encontró este mayor alineamiento del colágeno rodeando a los CB en comparación a los tumores benignos. Este mayor alineamiento también se había observado en nuestro estudio con el análisis mediante la FFT y el índice IOC, reflejando la solidez del resultado. También detectamos en nuestro estudio mayor alineamiento de las fibras que rodean a los tumores indolentes en comparación a los CB agresivos ($p = 0,018$). Hallazgos similares se habían observado en histopatología, estando descrito que los CB superficiales están típicamente rodeados por fibras de colágeno que forman haces alineados y paralelos [74]. También se han observado estos cambios en el estroma tumoral que rodea al CB en relación con el tejido conectivo normal con otras técnicas de imagen como la microscopía confocal de reflectancia [164,165], y también en estudios previos mediante MMF *in vivo* [166]. Sin embargo, al contrario que en nuestro trabajo, en dichos estudios no se encontraron diferencias en la organización del colágeno entre diferentes subtipos histológicos de CB [165,166], o se encontraron únicamente en relación a los CB nodulares, pero no en relación a los superficiales [164].

En cuanto a la orientación de los haces de colágeno, también analizada mediante CurveAlign, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los CB y las estructuras normales de la piel ni con los tumores benignos. Al igual que ocurría en el caso del análisis de las fibras individuales mediante CT-FIRE, en la comparación entre subtipos histológicos se observaba un incremento del ángulo de los haces de colágeno que rodean a los CB agresivos con respecto a los indolentes, cercano a la significación estadística ($p = 0,057$). Esto apoyaría el hallazgo de que las fibras de colágeno perpendiculares a los bordes tumorales se relacionan con un mayor riesgo de invasión, como se ha visto en el cáncer de mama [124,134–136,159]. No obstante, en atención a

nuestros resultados, la organización paralela de los haces de colágeno sería un marcador más consistente que el ángulo de los mismos, y serían necesarios más estudios para profundizar en el papel que juega el ángulo de las fibras en relación al pronóstico del tumor.

5.2.3 ¿Cuál es la contribución del análisis de la intensidad de la señal mediante la densidad óptica integrada al análisis del colágeno peritumoral en el carcinoma basocelular?

El análisis de la densidad óptica integrada (DOI) de las imágenes de GSA nos informa de la intensidad de dicha señal en las mismas. Estudios previos han analizado la intensidad de las señales de MMF en procesos fisiológicos en piel sana, como pueden ser el envejecimiento [167] o la cicatrización de la piel [88]; y también en procesos patológicos, como los tumores [113,141].

Lin et al. [167] estudiaron la intensidad de las señales de MMF en piel sana de pacientes de diferentes edades e introdujeron un índice llamado SAAID (*second-harmonic to autofluorescence aging index of dermis*). El índice SAAID relaciona la intensidad de las señales de autofluorescencia (AF) con las de GSA, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{SAAID} = (\text{GSA} - \text{AF}) / (\text{GSA} + \text{AF})$$

Según este índice, valores positivos o altos del índice SAAID indican una mayor intensidad de la señal de GSA (y por tanto mayor presencia de colágeno), mientras que valores negativos del índice SAAID indicarían mayor intensidad de la señal de autofluorescencia (por menor presencia de colágeno y presencia de otras sustancias autofluorescentes, como la elastina, en su lugar). En el estudio de Lin et al., el índice se utilizó para evaluar los cambios por fotoenvejecimiento de la piel. Mediante MMF se estudiaron muestras *ex vivo* de piel facial de tres pacientes de 20, 40 y 70 años de edad, y se calculó el índice SAAID de las imágenes obtenidas. Los resultados mostraron que el índice SAAID disminuye con la edad, o lo que es lo mismo, la intensidad de la señal de autofluorescencia aumenta y la de GSA disminuye con el envejecimiento. Los resultados de este trabajo fueron concordantes con lo conocido previamente gracias a la histología

convencional: se produce una progresiva reducción del colágeno de la piel durante el envejecimiento de la misma [158]. Este estudio *ex vivo* preliminar se complementa con el estudio *in vivo* de Koehler et al. [168], en el que analizaron la piel de 18 pacientes entre los 21 y 84 años de edad y demostraron de nuevo una correlación negativa entre el índice SAAID y la edad de los pacientes. Así, con el aumento de edad del paciente los valores del índice van volviéndose negativos, indicando una menor presencia de colágeno y mayor de elastina. Estos cambios asociados a la edad fueron más marcados en el caso de las mujeres. Un estudio posterior también *in vivo*, encontró la misma correlación negativa entre la intensidad de la señal de GSA y el índice SAAID con el envejecimiento [169].

Otro proceso fisiológico en el que se han analizado la intensidad de las señales de AF ha sido la cicatrización de la piel. Cicchi et al. [88] realizaron un estudio *ex vivo* para cuantificar mediante imágenes de MMF la cantidad de colágeno presente en la piel sana con respecto a las cicatrices normales y patológicas (queloides). A partir de 5 pacientes obtuvieron 3 muestras de piel sana, 2 de cicatrices normales y 3 de queloides. Secciones congeladas de estas muestras se analizaron mediante MMF, y se calculó el índice SAAID de las mismas. En atención a los resultados de los autores, el índice SAAID es negativo en las cicatrices normales, porque estas presentan una mayor señal fluorescente debido al aumento de la elastina. Por el contrario, los queloides tienen una mayor concentración de colágeno en comparación a la piel normal, y como consecuencia, una señal más intensa de GSA y un mayor índice SAAID.

También se ha utilizado el estudio de la intensidad de las señales de MMF para monitorizar la respuesta a diferentes tratamientos. Por un lado, Cicchi et al. [170] demostraron que se podía visualizar *in vivo* el resultado del tratamiento mediante *resurfacing* con láseres ablativos fraccionales. Es conocido que el calor inducido por los láseres sobre la piel estimula a los fibroblastos en la producción de colágeno, por lo que mediante estos láseres se puede enlentecer parcialmente el envejecimiento de la piel. El tratamiento del envejecimiento de la piel mediante *resurfacing* se ha vuelto muy frecuente en los últimos años, pero el resultado del tratamiento es complejo de cuantificar sin técnicas invasivas como una biopsia que nos permita analizar las modificaciones del colágeno. En el estudio de Cicchi et al., los autores demostraron que la MMF es una técnica útil para cuantificar de forma no invasiva los cambios en el colágeno 40 días después de un tratamiento con láser micro-ablativo fraccionado. Los autores encontraron

que, calculado sobre la piel *in vivo*, el índice SAAID aumentaba (como consecuencia del aumento de la señal GSA con respecto a la AF por aumento del colágeno en la piel) tras el tratamiento láser, especialmente en los sujetos más mayores.

Por otro lado, autores como Wu et al. [171] también han aplicado la MMF para evaluar la respuesta a tratamientos, en este caso quimioterapia neoadyuvante para el cáncer de mama. Se estudiaron 33 muestras de tejido mamario, incluyéndose tanto tejido mamario sano como carcinomas ductales tratados con quimioterapia y otros que no habían recibido tratamiento. Se obtuvieron imágenes mediante MMF *ex vivo* y se cuantificó la intensidad de las señales de GSA y AF, que se relacionaron con la ratio GSA/AF. Los resultados demostraron que la señal de GSA es alta en el tejido mamario normal, decrece de forma estadísticamente significativa en los carcinomas ductales, y aumenta de nuevo tras la quimioterapia. Estos resultados indican que el colágeno se destruye en el estroma peritumoral, pero que se recupera con el tratamiento de quimioterapia. Además, también comprobaron que, aunque se recuperaran parcialmente los niveles de colágeno tras el tratamiento con quimioterapia, no se alcanzaba la intensidad de la señal de los tejidos previa a ser tratados. En consecuencia, la regeneración (aunque parcial) de la señal de GSA tras un tratamiento con quimioterapia, podría considerarse como un indicador de regresión del tumor. El estudio demostró por tanto la utilidad de la MMF como monitorización post-tratamiento, pues puede proporcionar información determinante sobre el pronóstico del paciente. Otros autores, como Lukina et al. [172], han demostrado hallazgos similares en cuanto a la regeneración colágena en relación a quimioterapia en modelos animales. Estos autores evaluaron la respuesta a diferentes quimioterápicos (cisplatino, paclitaxel e irinotecan) en cáncer colorrectal en ratones. Describieron entre sus hallazgos un aumento del índice SAAID en los tumores que habían sido tratados con cisplatino y paclitaxel en estadios precoces del tratamiento, en comparación a los controles que no habían recibido tratamiento. Proponían los autores que estos cambios serían resultado de un aumento del colágeno del estroma tumoral tras la quimioterapia, estando estos resultados en línea con los previamente mencionados en cáncer de mama [171]. También realizaron estudios metabólicos y morfológicos sobre los tumores, afirmando los autores que la cantidad de colágeno fibrilar parece ser el parámetro más sensible a los cambios precoces en el tejido por quimioterapia [172].

Más allá de procesos fisiológicos o de monitorización de tratamientos, la cuantificación de las señales de MMF también se ha aplicado para la caracterización de tumores malignos, como el carcinoma de vejiga. Cicchi et al. [173], compararon biopsias de mucosa sana y carcinoma *in situ* de vejiga en 5 pacientes, y las estudiaron mediante MMF. Entre otros parámetros, los autores analizaron la intensidad de las señales de GSA y autofluorescencia mediante el índice SAAID, y encontraron que este era más alto en las muestras de biopsia sana que en las de carcinoma *in situ*. Teorizan los autores que esto podría deberse a una desestructuración del colágeno en los tejidos tumorales.

En el caso del CB, estudios previos han mostrado que el estroma del CB proporciona una señal de GSA más baja que el estroma de la dermis normal [113,141]. En el ya mencionado estudio de Kiss et al. [113], los autores detectaron una menor intensidad de la señal (menor DOI) en el caso del CB con respecto a la dermis normal, tanto en las imágenes de GSA como en las de autofluorescencia. En nuestro estudio, se demuestran diferencias en la misma línea, identificándose una menor DOI en las imágenes de CB en comparación con las glándulas sebáceas y la epidermis ($p < 0,001$). Sin embargo, no se encontraron diferencias con respecto a los folículos pilosos. Mientras que en el estudio de Kiss et al. analizaron muestras de CB y las compararon con otras de piel completamente sana, otro estudio anterior utilizó una aproximación más cercana a la utilizada en nuestro trabajo, comparando las áreas tumorales de CB con la dermis normal pero adyacente al tumor en una misma muestra [141]. En dicho estudio, Lin et al. analizaron a través de 9 muestras de CB nodular la intensidad de la señal de las imágenes de AF y GSA, pero sin realizar un análisis cuantitativo mediante parámetros morfológicos. De acuerdo con sus hallazgos, en el estroma peritumoral la intensidad de la señal de GSA disminuye con respecto a la dermis normal, siendo este resultado concordante con los hallazgos de Kiss et al. [113] y los del presente trabajo. No obstante, también encontraron un aumento de la señal autofluorescente en el estroma peritumoral [141], al contrario que Kiss et al., que describieron que esta señal está disminuida en las imágenes de CB [113]. La disminución de la señal de colágeno en el área peritumoral al CB se ha podido también observar con otras técnicas de imagen, como la espectroscopía Raman [174].

Con relación a estos análisis sobre la intensidad de las señales, estudios previos han destacado que para la comparación de la intensidad de las señales (ya sea mediante DOI,

SAAID u otros índices) es necesario que los equipos de adquisición de las imágenes y los softwares usados sean equiparables [168]. Es importante tener en cuenta que la intensidad de las señales de MMF no sólo depende de las características intrínsecas de los tejidos a estudio, sino que también se ve afectada por circunstancias externas que pueden alterar los resultados. Así, la intensidad láser usada, la profundidad a la que estemos realizando la visualización de las imágenes en el tejido, o el grosor de la epidermis en el caso de la piel, pueden influir en la intensidad de la señal de la imagen [113]. Por todo ello, el índice DOI (y el resto de los parámetros utilizados para el estudio de la intensidad) aunque proporcionan información útil sobre las imágenes de MMF, deben considerarse a priori parámetros menos consistentes que los que componen el análisis morfológico cuantitativo (IOC, EHC, etc.), que no se ven afectados por circunstancias externas.

5.3 Limitaciones del estudio:

El presente trabajo cuenta con una serie de limitaciones a tener en cuenta. Aunque nuestro estudio representa la cohorte más amplia de CB publicada hasta la fecha en la literatura, el número de lesiones cutáneas benignas que incluye la muestra es limitado (n=12).

Otra limitación de nuestro trabajo es la naturaleza *ex vivo* del estudio. Puesto que uno de los principales potenciales de la MMF es su aplicación directa sobre la piel, son necesarios nuevos estudios en el futuro que permitan generalizar nuestros resultados a una aplicación *in vivo* de esta tecnología. Hasta la fecha, los prototipos de microscopio multifotón *in vivo* presentan dos limitaciones importantes ya mencionadas: ofrecen un campo de visión pequeño y la velocidad a la que pueden obtener las imágenes es lenta [25]. Todo ello, unido al alto precio de los dispositivos, hace que la MMF *in vivo* no tenga hasta el momento prácticamente representación en la práctica médica habitual, a pesar de su potencial. En dermatología, los cada vez más frecuentes estudios *ex vivo* e *in vivo* con esta tecnología, amplían el conocimiento existente en cuanto al colágeno en piel sana y patológica, y favorecen que la implementación de la MMF sea más alta en el futuro.

Una tercera limitación sería intrínseca a la técnica, y es la ausencia de contraste nuclear proveniente del CB, que hace que los tumores aparezcan como áreas oscuras en las imágenes de MMF (similar a lo que ocurre con la MCR o la TOC). A pesar de la gran

resolución de la técnica, que permite una visualización a nivel subcelular de los tejidos, la visualización de los tumores es compleja por su falta de autofluorescencia. En las imágenes de MMF la autofluorescencia proviene fundamentalmente del estroma y de las estructuras normales de la piel, siendo los tumores más difíciles de identificar. Todo ello dificulta la interpretación de las imágenes por aquellas personas que no sean expertas en MMF. Por lo tanto, la implementación en práctica clínica real de esta tecnología requeriría un entrenamiento previo a los facultativos, que por la similitud de las imágenes a los cortes histológicos habituales y su alta resolución no tendría que ser muy amplio. En el caso de otras técnicas de imagen, como la microscopía confocal *ex vivo* con tinción digital de H&E, Mu et al. demostraron que un breve entrenamiento de 5 minutos mediante 6 ejemplos, aumentaba significativamente la capacidad diagnóstica de los dermatólogos que usaban la técnica [175]. De forma paralela, el conocimiento previo del tipo de imágenes que genera la MMF favorecería la aceptación de la técnica por los facultativos implicados.

Finalmente, otra limitación a destacar en nuestro trabajo es que todas las imágenes usadas se obtuvieron de muestras provenientes de un único centro, en este caso el Memorial Sloan Kettering Cancer Center de Nueva York (EE.UU.). En el futuro, serían necesarios estudios multicéntricos para validar nuestros hallazgos.

5.4. Direcciones futuras:

La MMF ofrece grandes ventajas para la investigación biomédica, pues permite el análisis de las muestras sin tinciones ni procesamiento elaborado, y la detección de moléculas específicas como el colágeno tipo I sin necesidad de marcadores, gracias a la generación de segundo armónico. Mientras que la MCR y la TOC aplicadas *in vivo* ofrecen imágenes en escala de grises, en el caso de la MMF podemos obtener de forma directa imágenes a color con resolución subcelular, semejantes a las obtenidas clásicamente con H&E. Por ello, son cada vez más estudios los publicados en relación con esta tecnología y se prevé que siga aumentando los próximos años el interés en ella [176].

El futuro de esta tecnología se relaciona con la mejora de sus principales desventajas, que fueron mencionadas apartados anteriores. Es necesario que se desarrollen en un futuro

nuevos dispositivos *in vivo* que superen las limitaciones de los existentes, que presentan un campo visual estrecho y una velocidad de adquisición de imágenes lenta [25]. En el campo de la dermatología, el campo visual estrecho entorpece la capacidad diagnóstica, puesto que las lesiones pueden ser no uniformes (por ejemplo, al desarrollarse un melanoma sobre un nevus), lo que puede dar lugar a falsos negativos. Además, debido al alto volumen asistencial al que se enfrentan los dermatólogos en su práctica clínica habitual, la implementación de cualquier nueva tecnología requiere que esté dotada cierta agilidad para su realización. Especialmente, si se plantea un uso intraoperatorio de la misma, como ocurre en cirugía de Mohs. En un estudio reciente en muestras de piel de cirugía de Mohs, Giacomelli et al. [177] aplicaron un fluoróforo exógeno, el naranja de acridina, para mejorar la resolución de las imágenes. El naranja de acridina es un fluoróforo que se une al ADN y ARN de forma selectiva y que no deteriora las muestras para su posterior procesamiento en H&E [107]. No obstante, este fluoróforo no puede aplicarse *in vivo* sobre piel humana por su posible efecto mutagénico [178]. En líneas generales, la detección de señales de fluorescencia exógena permite aumentar la velocidad de adquisición de las imágenes por parte del microscopio multifotón, al aumentar la intensidad de la señal. En la actualidad, el reto de la aplicación de la MMF *in vivo* sobre la piel es alcanzar una velocidad mayor a la vez que se detectan las señales endógenas de fluorescencia, que tienen intensidad de señal intrínseca baja. Sin embargo, el naranja de acridina no podría utilizarse con este propósito directamente sobre la piel por su posible mutagenicidad.

A este respecto, se han producido algunos avances en los últimos años. Por un lado, una aproximación novedosa es el uso de moxifloxacino como agente de contraste. El moxifloxacino es un antibiótico de la familia de las fluorquinolonas de cuarta generación, aprobado tanto por la FDA (del inglés, *Food and Drug Administration*) como por la EMA (*European Medicines Agency*) para su uso en humanos. Wang et al. [179] describieron como el moxifloxacino tiene una fluorescencia intrínseca detectable mediante microscopía multifotón. Este antibiótico presenta una buena capacidad de penetrar los tejidos, lo que le permite alcanzar concentraciones altas a nivel intracelular. En su estudio, los autores aplicaron el moxifloxacino *in vitro* en diferentes líneas celulares, e *in vivo* en modelos animales. Posteriormente, aplicaron este agente de contraste a diferentes muestras humanas *ex vivo* de CB, carcinoma de células escamosas y dermatofibrosarcoma protuberans, y las visualizaron mediante MMF. Los autores

compararon las imágenes obtenidas con las que se obtienen con microscopía confocal de fluorescencia con naranja de acridina y con el procesamiento tradicional de las imágenes con H&E. De acuerdo con sus resultados, el uso de moxifloxacino en MMF proporcionaba una resolución equiparable al uso de naranja de acridina en microscopía confocal de fluorescencia, con la ventaja de tener potencial para ser aplicado *in vivo*. Según los autores, el uso de moxifloxacino permitiría incrementar la velocidad de la adquisición de las imágenes de MMF gracias al aumento de contraste de la señal.

Además de mejorar la velocidad de adquisición de las imágenes, el uso de agentes de contraste puede ser útil para mejorar la falta de contraste nuclear del CB (que aparece como áreas oscuras en las imágenes de MMF, como se ha comentado anteriormente). En microscopía confocal de reflectancia se ha usado PARPi-FL, un marcador fluorescente que ha demostrado mejorar el contraste nuclear en el caso del CB [180]. Este fluoróforo tiene aprobación como *Investigational New Drug* por la FDA para su uso *in vivo* en humanos, y está en este momento bajo estudio en un ensayo clínico para la detección precoz del cáncer oral [181].

Por otro lado, para superar las limitaciones de la técnica actual más allá del uso de agentes de contraste, también se han propuesto nuevos prototipos con tecnología mejorada. Por ejemplo, Fast et al. [182] publicaron recientemente un trabajo sobre un nuevo prototipo llamado FLAME (*Fast Large Area Multiphoton Exoscope*). Esta plataforma combina mecanismos ópticos y mecánicos de escáner con algoritmos de inteligencia artificial, que mejoran resolución de las imágenes. De esta forma, los autores refieren que con su plataforma es posible incrementar la velocidad de adquisición de las imágenes mientras se mantiene la resolución subcelular, sin necesidad de utilizar fluoróforos ni tinciones exógenas.

Otra solución potencial para mejorar la velocidad de adquisición de las imágenes sería la creación de un instrumento multimodal, que combinase la tecnología MMF con otra técnica de imagen más rápida, como la microscopía confocal de reflectancia. Wang et al. [183] integraron la MCR con la MMF para visualizar *in vivo* la piel. Sin embargo, las imágenes que se generaban con este dispositivo combinado continuaban presentado un campo de visualización estrecho. En el futuro, los ya existentes microscopios confocales de reflectancia usados en práctica clínica [16], podrían combinarse puntualmente con un

dispositivo *in vivo* de MMF. Así, el microscopio confocal de reflectancia podría proporcionar imágenes con un amplio campo de visión (que midiesen hasta 8x8 mm²) como primer screening. Posteriormente, sería la MMF la que, en un segundo momento, aumentaría la especificidad de la técnica para diagnosticar lesiones como el CB al proporcionar imágenes con resolución subcelular, además de un análisis cuantitativo del colágeno mediante la GSA. Esta combinación de técnicas permitiría mejorar la capacidad diagnóstica en los casos de carcinoma y posiblemente proporcionar información pronóstica sobre estos en base al estudio del colágeno.

Por último, es importante destacar que, aunque la MMF puede mejorar el diagnóstico del CB, la lectura de las imágenes puede ser compleja para aquellos que se estén iniciando en la técnica. Por ello, la integración de algoritmos de inteligencia artificial puede ser útil en esta tecnología, más allá de para aumentar la velocidad del dispositivo como ocurre en la plataforma FLAME [182]. En un trabajo previo de nuestro grupo, demostramos que el uso de algoritmos de inteligencia artificial a través de redes neuronales convolucionales podía automatizar el diagnóstico del CB en microscopía confocal de fluorescencia [184]. Hallazgos similares se han publicado posteriormente en relación a la microscopía confocal de reflectancia [185]. En MMF se han realizado estudios similares en los que el uso de *Deep Learning* permitía identificar tumores como el carcinoma renal [186] o la recurrencia del hepatocarcinoma [187]. Hasta la fecha, no se han aplicado algoritmos de inteligencia artificial para facilitar el diagnóstico del CB en imágenes de MMF, siendo esta la línea de investigación que nuestro grupo pretende explorar los próximos años.

CAPÍTULO 6.
CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. El análisis cuantitativo de las imágenes de microscopía multifotón *ex vivo* consigue identificar cambios morfológicos en el colágeno que rodea al CB, que permiten distinguirlo de estructuras normales de la piel y de lesiones cutáneas benignas, así como diferenciar entre subtipos histológicos.
2. El colágeno presenta una organización más paralela en el estroma alrededor del CB que en el estroma alrededor de las estructuras normales y lesiones benignas de la piel.
3. Los haces de colágeno que rodean al CB están más densamente empaquetados que los que rodean a estructuras normales y lesiones benignas de la piel.
4. El colágeno se encuentra más alineado adyacente a los CB con subtipo histológico indolente (superficial y nodular) que a aquellos con subtipo más agresivo (infiltrante y micronodular).
5. Las fibras colágenas que rodean a los tumores agresivos presentan una disposición más perpendicular con respecto al límite tumoral (mayor ángulo relativo) que las que rodean a los tumores indolentes; siendo estas diferencias cercanas a la significación estadística, aunque sin alcanzarla. Estos hallazgos son concordantes con los observados en otros tumores como el cáncer de mama.
6. El presente trabajo demuestra por primera vez que la señal de GSA que proviene del colágeno tipo I puede ayudar no sólo al diagnóstico del CB, sino que puede proporcionar información pronóstica de estos tumores al identificar los subtipos histológicos de mayor riesgo.
7. Estos hallazgos sientan las bases iniciales para una futura cuantificación del colágeno mediante MMF *in vivo*, que permita obtener información diagnóstica y pronóstica del CB directamente sobre la piel del paciente.

CAPÍTULO 7.
BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Cameron MC, Lee E, Hibler BP, Barker CA, Mori S, Cordova M, et al. Basal cell carcinoma: Epidemiology; pathophysiology; clinical and histological subtypes; and disease associations. *J Am Acad Dermatol* 2019;80:303–17. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2018.03.060>.
- [2] Nehal KS, Bichakjian CK. Update on keratinocyte carcinomas. *N Engl J Med* 2018;379:363–74. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1708701>.
- [3] Bichakjian C, Armstrong A, Baum C, Bordeaux JS, Brown M, Busam KJ, et al. Guidelines of care for the management of basal cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 2018;78:540–59. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2017.10.006>.
- [4] Peris K, Fargnoli MC, Garbe C, Kaufmann R, Bastholt L, Seguin NB, et al. Diagnosis and treatment of basal cell carcinoma: European consensus-based interdisciplinary guidelines. *Eur J Cancer* 2019;118:10–34. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2019.06.003>.
- [5] Weinstein DA, Konda S, Coldiron BM. Use of skin biopsies among dermatologists. *Dermatologic Surg* 2017;43:1348–57. <https://doi.org/10.1097/DSS.0000000000001188>.
- [6] Kadouch DJ, With A van H de, Limpens J, Wal AC van der, Wolkerstorfer A, Bekkenk MW, et al. Is a punch biopsy reliable in subtyping basal cell carcinoma? A systematic review. *Br J Dermatol* 2016;175:401–3. <https://doi.org/10.1111/BJD.14458>.
- [7] Haws AL, Rojano R, Tahan SR, Phung TL. Accuracy of biopsy sampling for subtyping basal cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 2012;66:106–11. <https://doi.org/10.1016/J.JAAD.2011.02.042>.
- [8] Richmond-Sinclair NM, Pandeya N, Ware RS, Neale RE, Williams GM, Van Der Pols JC, et al. Incidence of basal cell carcinoma multiplicity and detailed anatomic distribution: longitudinal study of an Australian population. *J Invest Dermatol* 2009;129:323–8. <https://doi.org/10.1038/JID.2008.234>.
- [9] Van Loo E, Mosterd K, Krekels GAM, Roozeboom MH, Ostertag JU, Dirksen CD, et al. Surgical excision versus Mohs' micrographic surgery for basal cell carcinoma of the face: A randomised clinical trial with 10 year follow-up. *Eur J*

- Cancer 2014;50:3011–20. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2014.08.018>.
- [10] Galimberti G, Pontón Montaña A, Ferrario D, Kowalczyk A, Galimberti R. Mohs micrographic surgery for the treatment of basal cell carcinoma. *Actas Dermosifiliogr* 2010;101:853–7. [https://doi.org/10.1016/S1578-2190\(10\)70732-0](https://doi.org/10.1016/S1578-2190(10)70732-0).
- [11] Ragazzi M, Longo C, Piana S. Ex vivo (fluorescence) confocal microscopy in surgical pathology: State of the art. *Adv Anat Pathol* 2016;23:159–69. <https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000114>.
- [12] Wan B, Ganier C, Du-Harpur X, Harun N, Watt FM, Patalay R, et al. Applications and future directions for optical coherence tomography in dermatology. *Br J Dermatol* 2021;184:1014–22. <https://doi.org/10.1111/BJD.19553>.
- [13] Nori S, Rius-Díaz F, Cuevas J, Goldgeier M, Jaen P, Torres A, et al. Sensitivity and specificity of reflectance-mode confocal microscopy for in vivo diagnosis of basal cell carcinoma: A multicenter study. *J Am Acad Dermatol* 2004;51:923–30. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2004.06.028>.
- [14] Denk W, Strickler JH, Webb WW. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 1990;248(4951):73-6. doi: 10.1126/science.2321027.
- [15] Lin SJ, Jee SH, Dong CY. Multiphoton microscopy: A new paradigm in dermatological imaging. *Eur J Dermatology* 2007;17:361–6. <https://doi.org/10.1684/ejd.2007.0232>.
- [16] Jain M, Rajadhyaksha M, Nehal K. Implementation of fluorescence confocal mosaicking microscopy by “early adopter” Mohs surgeons and dermatologists: recent progress. *J Biomed Opt* 2017;22:24002. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.22.2.024002>.
- [17] Yamashita T, Kuwahara T, González S, Takahashi M. Non-invasive visualization of melanin and melanocytes by reflectance-mode confocal microscopy. *J Invest Dermatol* 2005;124:235–40. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.23562.x>.
- [18] Rajadhyaksha M, Marghoob A, Rossi A, Halpern AC, Nehal KS. Reflectance confocal microscopy of skin in vivo: From bench to bedside. *Lasers Surg Med* 2017;49:7–19. <https://doi.org/10.1002/lsm.22600>.
- [19] Łudzik J, Witkowski AM, Roterman-Konieczna I, Bassoli S, Farnetani F, Pellacani G. Improving diagnostic accuracy of dermoscopically equivocal pink cutaneous lesions with reflectance confocal microscopy in telemedicine settings: Double reader concordance evaluation of 316 cases. *PLoS One* 2016;11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162495>.

- [20] Wang S, Larina I V. High-resolution imaging techniques in tissue engineering. Woodhead Publishing; 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100603-0.00008-0>.
- [21] Cicchi R, Kapsokalyvas D, Pavone FS. Clinical Nonlinear Laser Imaging of Human Skin: A Review. *Biomed Res Int* 2014;2014. <https://doi.org/10.1155/2014/903589>.
- [22] Tsai TH, Jee SH, Dong CY, Lin SJ. Multiphoton microscopy in dermatological imaging. *J Dermatol Sci* 2009;56:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2009.06.008>.
- [23] Liu Y, Keikhosravi A, Pehlke CA, Bredfeldt JS, Dutson M, Liu H, et al. Fibrillar Collagen Quantification With Curvelet Transform Based Computational Methods. *Front Bioeng Biotechnol* 2020;8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00198>.
- [24] Yew E, Rowlands C, So PTC. Application of multiphoton microscopy in dermatological studies: A mini-review. *J Innov Opt Health Sci* 2014;7. <https://doi.org/10.1142/S1793545813300103>.
- [25] Lentsch G, Baugh EG, Lee B, Aszterbaum M, Zachary CB, Kelly KM, et al. Research Techniques Made Simple: Emerging Imaging Technologies for Noninvasive Optical Biopsy of Human Skin. *J Invest Dermatol* 2022;142:1243-1252.e1. <https://doi.org/10.1016/J.JID.2022.01.016>.
- [26] Dinnes J, Deeks JJ, Chuchu N, Saleh D, Bayliss SE, Takwoingi Y, et al. Reflectance confocal microscopy for diagnosing keratinocyte skin cancers in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2018;2018. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD013191>.
- [27] Shahriari N, Grant-Kels JM, Rabinovitz H, Oliviero M, Scope A. Reflectance confocal microscopy: Diagnostic criteria of common benign and malignant neoplasms, dermoscopic and histopathologic correlates of key confocal criteria, and diagnostic algorithms. *J Am Acad Dermatol* 2021;84:17–31. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2020.05.154>.
- [28] Ahlgrimm-Siess V, Cao T, Oliviero M, Laimer M, Hofmann-Wellenhof R, Rabinovitz HS, et al. Seborrheic keratosis: Reflectance confocal microscopy features and correlation with dermoscopy. *J Am Acad Dermatol* 2013;69:120–6. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2012.12.969>.
- [29] Navarrete-Dechent C, DeRosa AP, Longo C, Liopyris K, Oliviero M, Rabinovitz H, et al. Reflectance confocal microscopy terminology glossary for non-

- melanocytic skin lesions: A systematic review. *J Am Acad Dermatol* 2018;80:1414-1427.e3. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2018.12.007>.
- [30] De Carvalho N, Farnetani F, Ciardo S, Ruini C, Witkowski AM, Longo C, et al. Reflectance confocal microscopy correlates of dermoscopic patterns of facial lesions help to discriminate lentigo maligna from pigmented nonmelanocytic macules. *Br J Dermatol* 2015;173:128–33. <https://doi.org/10.1111/bjd.13546>.
- [31] Xiong YD, Ma S, Li X, Zhong X, Duan C, Chen Q. A meta-analysis of reflectance confocal microscopy for the diagnosis of malignant skin tumours. *J Eur Acad Dermatology Venereol* 2016;30:1295–302. <https://doi.org/10.1111/jdv.13712>.
- [32] Serban ED, Farnetani F, Pellacani G, Constantin MM. Role of in vivo reflectance confocal microscopy in the analysis of melanocytic lesions. *Acta Dermatovenerologica Croat* 2018;26:64–7.
- [33] Ahlgrimm-Siess V, Hofmann-Wellenhof R, Cao T, Oliviero M, Scope A, Rabinovitz HS. Reflectance Confocal Microscopy in the Daily Practice. *Semin Cutan Med Surg* 2009;28:180–9. <https://doi.org/10.1016/j.sder.2009.06.008>.
- [34] Jain M, Pulijal SV, Rajadhyaksha M, Halpern AC, Gonzalez S. Evaluation of Bedside Diagnostic Accuracy, Learning Curve, and Challenges for a Novice Reflectance Confocal Microscopy Reader for Skin Cancer Detection In Vivo. *JAMA Dermatology* 2018;154:962. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2018.1668>.
- [35] Vílchez-Márquez F, Borregón-Nofuentes P, Barchino-Ortiz L, Ruíz-de-Casas A, Palacios-Álvarez I, Soria-Rivas A, et al. Carcinoma basocelular cutáneo: diagnóstico y tratamiento en atención especializada dermatológica. *Guía de Práctica Clínica de la AEDV. Actas Dermosifiliogr* 2020;111:291–9. <https://doi.org/10.1016/J.AD.2019.07.006>.
- [36] Verkouteren JAC, Ramdas KHR, Wakkee M, Nijsten T. Epidemiology of basal cell carcinoma: scholarly review. *Br J Dermatol* 2017;177:359–72. <https://doi.org/10.1111/bjd.15321>.
- [37] Lomas A, Leonardi-Bee J, Bath-Hextall F. A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol* 2012;166:1069–80. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2012.10830.x>.
- [38] Aggarwal P, Knabel P, Fleischer AB. United States burden of melanoma and non-melanoma skin cancer from 1990 to 2019. *J Am Acad Dermatol* 2021;85:388–95. <https://doi.org/10.1016/J.JAAD.2021.03.109>.

- [39] Tejera-Vaquerizo A, Descalzo-Gallego MA, Otero-Rivas MM, Posada-García C, Rodríguez-Pazos L, Pastushenko I, et al. Skin Cancer Incidence and Mortality in Spain: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Actas Dermo-Sifiliográficas* (English Ed 2016;107:318–28. <https://doi.org/10.1016/j.adengl.2016.02.015>).
- [40] Smedinga H, Verkouteren JAC, Steyerberg EW, Hofman A, Nijsten T, Vergouwe Y. Occurrence of metachronous basal cell carcinomas: a prognostic model. *Br J Dermatol* 2017;177:1113–21. <https://doi.org/10.1111/bjd.15771>.
- [41] Bielsa I, Soria X, Esteve M, Ferrándiz C. Population-based incidence of basal cell carcinoma in a Spanish Mediterranean area. *Br J Dermatol* 2009;161:1341–6. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2009.09468.x>.
- [42] Wu W, Weinstock MA. Trends of keratinocyte carcinoma mortality rates in the United States as reported on death certificates, 1999 through 2010. *Dermatologic Surg* 2014;40:1395–401. <https://doi.org/10.1097/DSS.000000000000194>.
- [43] Sendín-Martin M, Durán-Romero AJ, Martín-Carrasco P, Conejo-Mir J, Pereyra-Rodríguez J-J. Mortality associated with non-melanoma skin cancer in Spain from 1979 to 2018: trends and age-adjusted rates. *Eur J Dermatol* 2021. <https://doi.org/10.1684/ejd.2021.4110>.
- [44] Marcil I, Stern RS. Risk of Developing a Subsequent Nonmelanoma Skin Cancer in Patients With a History of Nonmelanoma Skin Cancer. *Arch Dermatol* 2000;136:1524–30. <https://doi.org/10.1001/archderm.136.12.1524>.
- [45] Marghoob A, Kopf AW, Bart RS, Sanfilippo L, Silverman MK, Lee P, et al. Risk of another basal cell carcinoma developing after treatment of a basal cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 1993;28:22–8. [https://doi.org/10.1016/0190-9622\(93\)70003-C](https://doi.org/10.1016/0190-9622(93)70003-C).
- [46] Karagas MR, Stukel TA, Greenberg ER, Baron JA, Mott LA, Stern RS. Risk of Subsequent Basal Cell Carcinoma and Squamous Cell Carcinoma of the Skin Among Patients With Prior Skin Cancer. *JAMA* 1992;267:3305–10. <https://doi.org/10.1001/JAMA.1992.03480240067036>.
- [47] Wehner MR, Linos E, Parvataneni R, Stuart SE, Boscardin WJ, Chren MM. Timing of subsequent new tumors in patients who present with basal cell carcinoma or cutaneous squamous cell carcinoma. *JAMA Dermatology* 2015;151:382–8. <https://doi.org/10.1001/JAMADERMATOL.2014.3307>.
- [48] Conejo-Mir J, Molina Ruíz AM. Carcinoma basocelular. En: Conejo-Mir J, Moreno Jiménez JC, Camacho Martínez FM, Editores. *Manual de dermatología*.

1ª ed. Grupo Aula Médica S.L.; 2010. p. 1165-1183.

- [49] Vitasa BC, Taylor HR, Strickland PT, Rosenthal FS, West S, Abbey H, et al. Association of nonmelanoma skin cancer and actinic keratosis with cumulative solar ultraviolet exposure in Maryland watermen. *Cancer* 1990;65:2811–7. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19900615\)65:12<2811::AID-CNCR2820651234>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19900615)65:12<2811::AID-CNCR2820651234>3.0.CO;2-U).
- [50] Khalesi M, Whiteman DC, Tran B, Kimlin MG, Olsen CM, Neale RE. A meta-analysis of pigmentary characteristics, sun sensitivity, freckling and melanocytic nevi and risk of basal cell carcinoma of the skin. *Cancer Epidemiol* 2013;37:534–43. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2013.05.008>.
- [51] Zanetti R, Rosso S, Martinez C, Nieto A, Miranda A, Mercier M, et al. Comparison of risk patterns in carcinoma and melanoma of the skin in men: a multi-centre case–control study. *Br J Cancer* 2006;94:743–51. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602982>.
- [52] Gallagher RP, Hill GB, Bajdik CD, Fincham S, Coldman AJ, McLean DI, et al. Sunlight exposure, pigmentary factors, and risk of nonmelanocytic skin cancer. I. Basal cell carcinoma. *Arch Dermatol* 1995;131:157–63. <https://doi.org/10.1001/archderm.1995.01690140048007>.
- [53] Dam RM v., Huang Z, Rimm EB, Weinstock MA, Spigelman D, Colditz GA, et al. Risk Factors for Basal Cell Carcinoma of the Skin in Men: Results from the Health Professionals Follow-up Study. *Am J Epidemiol* 1999;150:459–68. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a010034>.
- [54] Marzuka AG, Book SE. Basal cell carcinoma: pathogenesis, epidemiology, clinical features, diagnosis, histopathology, and management. *Yale J Biol Med* 2015;88:167–79.
- [55] Wehner MR, Shive ML, Chren M-M, Han J, Qureshi AA, Linos E. Indoor tanning and non-melanoma skin cancer: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2012;345:e5909–e5909. <https://doi.org/10.1136/bmj.e5909>.
- [56] Stern RS, Liebman EJ, Väkevä L. Oral Psoralen and Ultraviolet-A Light (PUVA) Treatment of Psoriasis and Persistent Risk of Nonmelanoma Skin Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst* 1998;90:1278–84. <https://doi.org/10.1093/jnci/90.17.1278>.
- [57] Patel R V., Clark LN, Lebwohl M, Weinberg JM. Treatments for psoriasis and the risk of malignancy. *J Am Acad Dermatol* 2009;60:1001–17. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2008.12.031>.

- [58] Robinson SN, Zens MS, Perry AE, Spencer SK, Duell EJ, Karagas MR. Photosensitizing Agents and the Risk of Non-Melanoma Skin Cancer: A Population-Based Case-Control Study. *J Invest Dermatol* 2013;133:1950. <https://doi.org/10.1038/JID.2013.33>.
- [59] Lichter MD. Therapeutic Ionizing Radiation and the Incidence of Basal Cell Carcinoma and Squamous Cell Carcinoma. *Arch Dermatol* 2000;136:1007. <https://doi.org/10.1001/archderm.136.8.1007>.
- [60] Levi F, Moeckli R, Randimbison L, Te V-C, Maspoli M, La Vecchia C. Skin cancer in survivors of childhood and adolescent cancer. *Eur J Cancer* 2006;42:656–9. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.08.042>.
- [61] Karagas MR, McDonald JA, Greendberg ER, Stukel TA, Weiss JE, Baron JA, et al. Risk of Basal Cell and Squamous Cell Skin Cancers After Ionizing Radiation Therapy. *JNCI J Natl Cancer Inst* 1996;88:1848–53. <https://doi.org/10.1093/jnci/88.24.1848>.
- [62] Naruke Y, Nakashima M, Suzuki K, Kondo H, Hayashi T, Soda M, et al. Genomic instability in the epidermis induced by atomic bomb (A-bomb) radiation. *Cancer* 2009;115:3782–90. <https://doi.org/10.1002/cncr.24405>.
- [63] Karagas MR, Gossai A, Pierce B, Ahsan H. Drinking Water Arsenic Contamination, Skin Lesions, and Malignancies: A Systematic Review of the Global Evidence. *Curr Environ Heal Reports* 2015;2:52–68. <https://doi.org/10.1007/s40572-014-0040-x>.
- [64] Moloney FJ, Comber H, O’Lorcain P, O’Kelly P, Conlon PJ, Murphy GM. A population-based study of skin cancer incidence and prevalence in renal transplant recipients. *Br J Dermatol* 2006;154:498–504. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2005.07021.x>.
- [65] Euvrard S, Kanitakis J, Claudy A. Skin Cancers after Organ Transplantation. *N Engl J Med* 2003;348:1681–91. <https://doi.org/10.1056/NEJMra022137>.
- [66] Omland SH, Gniadecki R, Hædersdal M, Helweg-Larsen J, Omland LH. Skin Cancer Risk in Hematopoietic Stem-Cell Transplant Recipients Compared With Background Population and Renal Transplant Recipients. *JAMA Dermatology* 2016;152:177. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2015.3902>.
- [67] Silverberg MJ, Leyden W, Warton EM, Quesenberry CP, Engels EA, Asgari MM. HIV Infection Status, Immunodeficiency, and the Incidence of Non-Melanoma Skin Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst* 2013;105:350–60.

- <https://doi.org/10.1093/jnci/djs529>.
- [68] Monserrat García MT, Domínguez Cruz JJ, Conejo-Mir J. Carcinoma basocelular: biología molecular y nuevas dianas terapéuticas Basal cell carcinoma: molecular biology and new therapeutic targets. *Med Cutan Iber Lat Am* 2016;44:89–99.
- [69] Pellegrini C, Maturo MG, Nardo L Di, Ciciarelli V, García-Rodrigo CG, Fagnoli MC. Understanding the Molecular Genetics of Basal Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci* 2017;18. <https://doi.org/10.3390/IJMS18112485>.
- [70] Palacios-Álvarez I, González-Sarmiento R, Fernández-López E. Síndrome de Gorlin. *Actas Dermosifiliogr* 2018;109:207–17. <https://doi.org/10.1016/J.AD.2017.07.018>.
- [71] Black JO. Xeroderma Pigmentosum. *Head Neck Pathol* 2016;10:139–44. <https://doi.org/10.1007/s12105-016-0707-8>.
- [72] AlSabbagh MM, Baqi MA. Bazex-Dupré-Christol syndrome: review of clinical and molecular aspects. *Int J Dermatol* 2018;57:1102–6.
- [73] Scrivener Y, Grosshans E, Cribier B. Variations of basal cell carcinomas according to gender, age, location and histopathological subtype. *Br J Dermatol* 2002;147:41–7. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2002.04804.x>.
- [74] Kirkham N, Aljefri K. Tumors and Cysts of the Epidermis. In: Elder DE, Elenitsas R, Rosenbach M, Murphy GF, Rubin AI, Xu X, editors. *Lever's Histopathology of the skin*. 11th ed. Lippincott Williams & Wilkins (LWW); 2015.
- [75] Nagarajan P, Tetzlaff MT, Curry JL. Histopathology of Basal Cell Carcinoma and Its Variants. In: Midgen MR, Chen L, Silapunt S, editors. *Basal cell carcinoma. Advances in Treatment and Research*. 1st ed. Springer; 2020. p. 25–45.
- [76] González S, Sánchez V, González-Rodríguez A, Parrado C, Ullrich M. Patrones de microscopia confocal para el cáncer cutáneo no melanoma y aplicaciones clínicas. *Actas Dermosifiliogr* 2014;105:446–58. <https://doi.org/10.1016/J.AD.2013.03.010>.
- [77] Bahadoran P, Perrin C, Aberdam D, Spadafora-Pisani A, Meneguzzi G, Ortonne J-P. Altered expression of the hemidesmosome-anchoring filament complex proteins in basal cell carcinoma: possible role in the origin of peritumoral lacunae. *Br J Dermatol* 1997;136:35–42. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2133.1997.D01-1139.X>.
- [78] Kular JK, Basu S, Sharma RI. The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering.

- J Tissue Eng 2014;5. <https://doi.org/10.1177/2041731414557112>.
- [79] Pickup MW, Mouw JK, Weaver VM. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep* 2014;15:1243–53. <https://doi.org/10.15252/EMBR.201439246>.
- [80] Walker C, Mojares E, Del Río Hernández A. Role of Extracellular Matrix in Development and Cancer Progression. *Int J Mol Sci* 2018;19. <https://doi.org/10.3390/IJMS19103028>.
- [81] Gurrara R, Byrne CE, Brown LM, Tiongco RFP, Matossian MD, Savoie JJ, et al. Quantifying Breast Cancer-Driven Fiber Alignment and Collagen Deposition in Primary Human Breast Tissue. *Front Bioeng Biotechnol* 2021;9. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2021.618448>.
- [82] Wolf K, Alexander S, Schacht V, Coussens LM, von Andrian UH, van Rheenen J, et al. Collagen-based cell migration models in vitro and in vivo. *Semin Cell Dev Biol* 2009;20:931–41. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2009.08.005>.
- [83] Hansen LK, Wilhelm J, Fassett JT. Regulation of hepatocyte cell cycle progression and differentiation by type I collagen structure. *Curr Top Dev Biol* 2006;72:205–36. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(05\)72004-4](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(05)72004-4).
- [84] Cooper GM, Hausman RE. Paredes celulares, matriz extracelular e interacciones celulares. En: Cooper GM, Hausman RE, editores. *La célula*. 5ª Ed. Madrid: Marban Libros SL; 2010. p. 578.
- [85] Kistenev Y V., Vrazhnov DA, Nikolaev V V., Sandykova EA, Krivova NA. Analysis of Collagen Spatial Structure Using Multiphoton Microscopy and Machine Learning Methods. *Biochemistry (Mosc)* 2019;84:108–23. <https://doi.org/10.1134/S0006297919140074>.
- [86] Shin JW, Kwon SH, Choi JY, Na JI, Huh CH, Choi HR, et al. Molecular Mechanisms of Dermal Aging and Antiaging Approaches. *Int J Mol Sci* 2019;20. <https://doi.org/10.3390/IJMS20092126>.
- [87] Uitto J, Olsen DR, Fazio MJ. Extracellular matrix of the skin: 50 years of progress. *J Invest Dermatol* 1989;92:61S-77S. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.EP13075039>.
- [88] Cicchi R, Kapsokalyvas D, De Giorgi V, Maio V, Van Wiechen A, Massi D, et al. Scoring of collagen organization in healthy and diseased human dermis by multiphoton microscopy. *J Biophotonics* 2010;3:34–43. <https://doi.org/10.1002/jbio.200910062>.

- [89] Pfisterer K, Shaw LE, Symmank D, Weninger W. The Extracellular Matrix in Skin Inflammation and Infection. *Front Cell Dev Biol* 2021;9. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.682414>.
- [90] Nelson DL, Cox MM. Glúcidos y glucobiología. En: Lehninger. Nelson DL, Cox MM, editores. Principios de bioquímica. 5ª ed. Barcelona: Publicaciones Omega; 2009. p. 249-255.
- [91] Reiter O, Mimouni I, Gdalevich M, Marghoob AA, Levi A, Hodak E, et al. The diagnostic accuracy of dermoscopy for basal cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *J Am Acad Dermatol* 2019;80:1380–8. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2018.12.026>.
- [92] Sood A, Ayyaswami V, Prabhu A V., Benedek TG. Frederic Edward Mohs, MD—The Pioneer of Chemosurgery. *JAMA Dermatology* 2017;153:522. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2017.0723>.
- [93] Connolly SM, Baker DR, Coldiron BM, Fazio MJ, Storrs PA, Vidimos AT, et al. AAD/ACMS/ASDSA/ASMS 2012 appropriate use criteria for Mohs micrographic surgery: A report of the American Academy of Dermatology, American College of Mohs Surgery, American Society for Dermatologic Surgery Association, and the American Society for Mohs Surgery. *J Am Acad Dermatol* 2012;67:531–50. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2012.06.009>.
- [94] Paoli J, Cogrel O, Van Der Geer S, Krekels G, De Leeuw J, Moehrle M, et al. ESMS Position document on the use of Mohs Micrographic surgery and other micrographic surgery techniques in Europe. 2019.
- [95] Smeets NWJ, Krekels GAM, Ostertag JU, Essers BAB, Dirksen CD, Nieman FHM, et al. Surgical excision vs Mohs' micrographic surgery for basal-cell carcinoma of the face: randomised controlled trial. *Lancet (London, England)* 2004;364:1766–72. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17399-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17399-6).
- [96] Mosterd K, Krekels GA, Nieman FH, Ostertag JU, Essers BA, Dirksen CD, et al. Surgical excision versus Mohs' micrographic surgery for primary and recurrent basal-cell carcinoma of the face: a prospective randomised controlled trial with 5-years' follow-up. *Lancet Oncol* 2008;9:1149–56. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(08\)70260-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(08)70260-2).
- [97] Leibovitch I, Huilgol SC, Selva D, Richards S, Paver R. Basal cell carcinoma treated with Mohs surgery in Australia III. Perineural invasion. *J Am Acad Dermatol* 2005;53:458–63. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2005.04.089>.

- [98] Benedetto PX, Poblete-Lopez C. Mohs Micrographic Surgery Technique. *Dermatol Clin* 2011;29:141–51. <https://doi.org/10.1016/j.det.2011.02.002>.
- [99] Cook J, Zitelli JA. Mohs micrographic surgery: A cost analysis. *J Am Acad Dermatol* 1998;39:698–703. [https://doi.org/10.1016/S0190-9622\(98\)70041-6](https://doi.org/10.1016/S0190-9622(98)70041-6).
- [100] Sebaratnam DF, Choy B, Lee M, Paver R, Fernández Peñas P. Direct Cost-Analysis of Mohs Micrographic Surgery and Traditional Excision for Basal Cell Carcinoma at Initial Margin Clearance. *Dermatologic Surg* 2016;42:633–8. <https://doi.org/10.1097/DSS.0000000000000756>.
- [101] Ebede TL, Lee EH, Dusza SW, Busam KJ, Nehal KS. Clinical Value of Paraffin Sections in Association with Mohs Micrographic Surgery for Nonmelanoma Skin Cancers. *Dermatologic Surg* 2012;38:1631–8. <https://doi.org/10.1111/j.1524-4725.2012.02570.x>.
- [102] Hoover EE, Squier JA. Advances in multiphoton microscopy technology. *Nat Photonics* 2013;7:93–101. <https://doi.org/10.1038/nphoton.2012.361>.
- [103] Grzybowski A, Pietrzak K. Maria Goepfert-Mayer (1906–1972): two-photon effect on dermatology. *Clin Dermatol* 2013;31:221–5. <https://doi.org/10.1016/J.CLINDERMATOL.2012.06.002>.
- [104] Dunn KW, Young PA. Principles of multiphoton microscopy. *Nephron - Exp Nephrol* 2006;103. <https://doi.org/10.1159/000090614>.
- [105] Dudenkova V V., Shirmanova M V., Lukina MM, Feldshtein FI, Virkin A, Zagainova E V. Examination of Collagen Structure and State by the Second Harmonic Generation Microscopy. *Biochemistry (Mosc)* 2019;84:89–107. <https://doi.org/10.1134/S0006297919140062>.
- [106] Chen X, Nadiarynkh O, Plotnikov S, Campagnola PJ. Second harmonic generation microscopy for quantitative analysis of collagen fibrillar structure. *Nat Protoc* 2012;7:654–69. <https://doi.org/10.1038/NPROT.2012.009>.
- [107] Keena S, Que T. Research Techniques Made Simple: Noninvasive Imaging Technologies for the Delineation of Basal Cell Carcinomas. *J Invest Dermatol* 2016;136:e33–8. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.02.012>.
- [108] Obeidy P, Tong PL, Weninger W. Research Techniques Made Simple: Two-Photon Intravital Imaging of the Skin. *J Invest Dermatol* 2018;138:720–5. <https://doi.org/10.1016/J.JID.2018.01.017>.
- [109] Olsen J, Holmes J, Jemec GBE. Advances in optical coherence tomography in dermatology-a review. *J Biomed Opt* 2018;23:1.

- <https://doi.org/10.1117/1.JBO.23.4.040901>.
- [110] Pierce MC, Strasswimmer J, Park BH, Cense B, De Boer JF. Advances in optical coherence tomography imaging for dermatology. *J Invest Dermatol* 2004;123:458–63. <https://doi.org/10.1111/J.0022-202X.2004.23404.X>.
- [111] Van Zuijlen PPM, De Vries HJC, Lamme EN, Coppens JE, Van Marle J, Kreis RW, et al. Morphometry of dermal collagen orientation by Fourier analysis is superior to multi-observer assessment. *J Pathol* 2002;198:284–91. <https://doi.org/10.1002/PATH.1219>.
- [112] Wu S, Li H, Yang H, Zhang X, Li Z, Xu S. Quantitative analysis on collagen morphology in aging skin based on multiphoton microscopy. *J Biomed Opt* 2011;16:040502. <https://doi.org/10.1117/1.3565439>.
- [113] Kiss N, Haluszka D, Lőrincz K, Gyöngyösi N, Bozsányi S, Bánvölgyi A, et al. Quantitative Analysis on *Ex vivo* Nonlinear Microscopy Images of Basal Cell Carcinoma Samples in Comparison to Healthy Skin. *Pathol Oncol Res* 2019;25:1015–21. <https://doi.org/10.1007/s12253-018-0445-1>.
- [114] Liu Y, Keikhosravi A, Mehta GS, Drifka CR, Eliceiri KW. Methods for Quantifying Fibrillar Collagen Alignment. *Methods Mol Biol* 2017;1627:429–51. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7113-8_28.
- [115] Candès EJ, Donoho DL. Curvelets-A Surprisingly Effective Nonadaptive Representation For Objects with Edges 2000.
- [116] Jolly LA, Novitskiy S, Owens P, Massoll N, Cheng N, Fang W, et al. Fibroblast-Mediated Collagen Remodeling Within the Tumor Microenvironment Facilitates Progression of Thyroid Cancers Driven by BrafV600E and Pten Loss. *Cancer Res* 2016;76:1804–13. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2351>.
- [117] Affo S, Yu LX, Schwabe RF. The Role of Cancer-Associated Fibroblasts and Fibrosis in Liver Cancer. *Annu Rev Pathol* 2017;12:153–86. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PATHOL-052016-100322>.
- [118] Penet MF, Kakkad S, Pathak AP, Krishnamachary B, Mironchik Y, Raman V, et al. Structure and Function of a Prostate Cancer Dissemination-Permissive Extracellular Matrix. *Clin Cancer Res* 2017;23:2245–54. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1516>.
- [119] Houthuijzen JM, Jonkers J. Cancer-associated fibroblasts as key regulators of the breast cancer tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev* 2018;37:577–97. <https://doi.org/10.1007/S10555-018-9768-3>.

- [120] Shintani Y, Maeda M, Chaika N, Johnson KR, Wheelock MJ. Collagen I promotes epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer cells via transforming growth factor-beta signaling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008;38:95–104. <https://doi.org/10.1165/RCMB.2007-0071OC>.
- [121] Zhang Y, Weinberg RA. Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities. *Front Med* 2018;12:361–73. <https://doi.org/10.1007/S11684-018-0656-6>.
- [122] Despotović SZ, Milićević ĐN, Krmpot AJ, Pavlović AM, Živanović VD, Krivokapić Z, et al. Altered organization of collagen fibers in the uninvolved human colon mucosa 10 cm and 20 cm away from the malignant tumor. *Sci Rep* 2020;10. <https://doi.org/10.1038/S41598-020-63368-Y>.
- [123] Xu S, Xu H, Wang W, Li S, Li H, Li T, et al. The role of collagen in cancer: from bench to bedside. *J Transl Med* 2019;17. <https://doi.org/10.1186/S12967-019-2058-1>.
- [124] Provenzano PP, Eliceiri KW, Campbell JM, Inman DR, White JG, Keely PJ. Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. *BMC Med* 2006;4. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-4-38>.
- [125] Kenny TC, Schmidt H, Adelson K, Hoshida Y, Koh AP, Shah N, et al. Patient-derived Interstitial Fluids and Predisposition to Aggressive Sporadic Breast Cancer through Collagen Remodeling and Inactivation of p53. *Clin Cancer Res* 2017;23:5446–59. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-0342>.
- [126] Yoshida T, Hashimura M, Kuwata T, Matsumoto T, Suzuki E, Tazo Y, et al. Transcriptional regulation of the alpha-1 type II collagen gene by nuclear factor κB/p65 and Sox9 in the chondrocytic phenotype of uterine carcinosarcomas. *Hum Pathol* 2013;44:1780–8. <https://doi.org/10.1016/J.HUMPATH.2012.12.019>.
- [127] Sun Y, Ling J, Liu L. Collagen type X alpha 1 promotes proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition of cervical cancer through activation of TGF-β/Smad signaling. *Physiol Int* 2022;109:204–14. <https://doi.org/10.1556/2060.2022.00006>.
- [128] Jenkins MH, Croteau W, Mullins DW, Brinckerhoff CE. The BRAF(V600E) inhibitor, PLX4032, increases type I collagen synthesis in melanoma cells. *Matrix Biol* 2015;48:66–77. <https://doi.org/10.1016/J.MATBIO.2015.05.007>.
- [129] Wei SC, Fattet L, Tsai JH, Guo Y, Pai VH, Majeski HE, et al. Matrix stiffness drives Epithelial-Mesenchymal Transition and tumour metastasis through a

- TWIST1-G3BP2 mechanotransduction pathway HHS Public Access. *Nat Cell Biol* 2015;17:678–88. <https://doi.org/10.1038/ncb3157>.
- [130] Gao Y, Zhou J, Li J. Discoidin domain receptors orchestrate cancer progression: A focus on cancer therapies 2021;112. <https://doi.org/10.1111/CAS.14789>.
- [131] Mehta V, Chander H, Munshi A. Complex roles of discoidin domain receptor tyrosine kinases in cancer. *Clin Transl Oncol* 2021;23:1497–510. <https://doi.org/10.1007/S12094-021-02552-6>.
- [132] Sun TY, Haberman AM, Greco V. Preclinical Advances with Multiphoton Microscopy in Live Imaging of Skin Cancers. *J Invest Dermatol* 2017;137:282–7. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.08.033>.
- [133] Zhu X, Zhuo S, Zheng L, Jiang X, Chen J, Lin B. Quantification of scar margin in keloid different from atrophic scar by multiphoton microscopic imaging. *Scanning* 2011;33:195–200. <https://doi.org/10.1002/SCA.20230>.
- [134] Bredfeldt JS, Liu Y, Conklin MW, Keely PJ, Mackie TR, Eliceiri KW. Automated quantification of aligned collagen for human breast carcinoma prognosis. *J Pathol Inform* 2014;5:28. <https://doi.org/10.4103/2153-3539.139707>.
- [135] Conklin MW, Eickhoff JC, Riching KM, Pehlke CA, Eliceiri KW, Provenzano PP, et al. Aligned collagen is a prognostic signature for survival in human breast carcinoma. *Am J Pathol* 2011;178:1221–32. <https://doi.org/10.1016/J.AJPATH.2010.11.076>.
- [136] Conklin MW, Gangnon RE, Sprague BL, Van Gemert L, Hampton JM, Eliceiri KW, et al. Collagen Alignment as a Predictor of Recurrence after Ductal Carcinoma in situ. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2018;27:138–45. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-17-0720>.
- [137] Drifka CR, Loeffler AG, Mathewson K, Keikhosravi A, Eickhoff JC, Liu Y, Weber SM, Kao WJ, Eliceiri KW. Highly aligned stromal collagen is a negative prognostic factor following pancreatic ductal adenocarcinoma resection. *Oncotarget* 2016;7(46):76197-76213. doi: 10.18632/oncotarget.12772.
- [138] Wen BL, Brewer MA, Nadiarnykh O, Hocker J, Singh V, Mackie TR, et al. Texture analysis applied to second harmonic generation image data for ovarian cancer classification. *J Biomed Opt* 2014;19:096007. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.19.9.096007>.
- [139] Zeitoun AA, Luna JSJ, Salas KS, Erbes L, Cesar CL, Andrade LALA, et al. Epithelial Ovarian Cancer Diagnosis of Second-Harmonic Generation Images: A

- Semiautomatic Collagen Fibers Quantification Protocol. *Cancer Inform* 2017;16. <https://doi.org/10.1177/1176935117690162>.
- [140] Liu N, Chen J, Xu R, Jiang S, Xu J, Chen R. Label-free imaging characteristics of colonic mucinous adenocarcinoma using multiphoton microscopy. *Scanning* 2013;35:277–82. <https://doi.org/10.1002/SCA.21063>.
- [141] Lin S-J, Jee S-H, Kuo C-J, Wu R-J, Lin W-C, Chen J-S, et al. Discrimination of basal cell carcinoma from normal dermal stroma by quantitative multiphoton imaging. *Opt Lett* 2006;31:2756. <https://doi.org/10.1364/ol.31.002756>.
- [142] Marcos-Garcés V, Harvat M, Molina Aguilar P, Ferrández Izquierdo A, Ruiz-Saurí A. Comparative measurement of collagen bundle orientation by Fourier analysis and semiquantitative evaluation: reliability and agreement in Masson's trichrome, Picrosirius red and confocal microscopy techniques. *J Microsc* 2017;267:130–42. <https://doi.org/10.1111/jmi.12553>.
- [143] Cicchi R, Baria E, Matthäus C, Lange M, Lattermann A, Brehm BR, et al. Non-linear imaging and characterization of atherosclerotic arterial tissue using combined SHG and FLIM microscopy. *J Biophotonics* 2015;8:347–56. <https://doi.org/10.1002/JBIO.201400142>.
- [144] Ghazaryan A, Tsai HF, Hayrapetyan G, Chen W-L, Chen Y-F, Jeong MY, et al. Analysis of collagen fiber domain organization by Fourier second harmonic generation microscopy. *J Biomed Opt* 2012;18:031105. <https://doi.org/10.1117/1.jbo.18.3.031105>.
- [145] Rao RAR, Mehta MR, Leithem S, Toussaint, Jr. KC. Quantitative analysis of forward and backward second-harmonic images of collagen fibers using Fourier transform second-harmonic-generation microscopy. *Opt Lett* 2009;34:3779. <https://doi.org/10.1364/ol.34.003779>.
- [146] Sivaguru M, Durgam S, Ambekar R, Luedtke D, Fried G, Stewart A, et al. Quantitative analysis of collagen fiber organization in injured tendons using Fourier transform-second harmonic generation imaging. *Opt Express* 2010;18:24983. <https://doi.org/10.1364/oe.18.024983>.
- [147] Lau TY, Ambekar R, Toussaint KC. Quantification of collagen fiber organization using three-dimensional Fourier transform-second-harmonic generation imaging. *Opt Express* 2012;20:21821. <https://doi.org/10.1364/OE.20.021821>.
- [148] Durgam S, Singh B, Cole SL, Brokken MT, Stewart M. Quantitative Assessment of Tendon Hierarchical Structure by Combined Second Harmonic Generation and

- Immunofluorescence Microscopy. *Tissue Eng Part C Methods* 2020;26:253–62. <https://doi.org/10.1089/TEN.TEC.2020.0032>.
- [149] Tsafas V, Gavgiotaki E, Tzardi M, Tsafa E, Fotakis C, Athanassakis I, et al. Polarization-dependent second-harmonic generation for collagen-based differentiation of breast cancer samples. *J Biophotonics* 2020;13. <https://doi.org/10.1002/JBIO.202000180>.
- [150] Van Zuijlen PPM, Ruurda JJB, Van Veen HA, Van Marle J, Van Trier AJM, Groenevelt F, et al. Collagen morphology in human skin and scar tissue: no adaptations in response to mechanical loading at joints. *Burns* 2003;29:423–31. [https://doi.org/10.1016/S0305-4179\(03\)00052-4](https://doi.org/10.1016/S0305-4179(03)00052-4).
- [151] Falzon G, Pearson S, Murison R. Analysis of collagen fibre shape changes in breast cancer. *Phys Med Biol* 2008;53:6641–52. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/53/23/001>.
- [152] Ambekar R, Lau T-Y, Walsh M, Bhargava R, Kimani C, Toussaint J. Quantifying collagen structure in breast biopsies using second-harmonic generation imaging. *Biomed Opt Express* 2012;3:2021. <https://doi.org/10.1364/BOE.3.002021>.
- [153] Tilbury K, Campagnola PJ. Applications of second-harmonic generation imaging microscopy in ovarian and breast cancer. *Perspect Medicin Chem* 2015;7:21–32. <https://doi.org/10.4137/PMC.S13214>.
- [154] Kakkad SM, Solaiyappan M, Argani P, Sukumar S, Jacobs LK, Leibfritz D, et al. Collagen I fiber density increases in lymph node positive breast cancers: pilot study. *J Biomed Opt* 2012;17:116017. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.17.11.116017>.
- [155] Adur J, Pelegati VB, de Thomaz AA, Baratti MO, Almeida DB, Andrade LALA, et al. Optical biomarkers of serous and mucinous human ovarian tumor assessed with nonlinear optics microscopies. *PLoS One* 2012;7. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0047007>.
- [156] Adur J, Pelegati VB, de Thomaz AA, Baratti MO, Andrade LALA, Carvalho HF, et al. Second harmonic generation microscopy as a powerful diagnostic imaging modality for human ovarian cancer. *J Biophotonics* 2014;7:37–48. <https://doi.org/10.1002/JBIO.201200108>.
- [157] Adur J, Pelegati VB, Costa LFL, Pietro L, de Thomaz AA, Almeida DB, et al. Recognition of serous ovarian tumors in human samples by multimodal nonlinear optical microscopy. *J Biomed Opt* 2011;16:096017.

- <https://doi.org/10.1117/1.3626575>.
- [158] Rittié L, Fisher GJ. Natural and sun-induced aging of human skin. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015;5. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A015370>.
- [159] Bodelon C, Mullooly M, Pfeiffer RM, Fan S, Abubakar M, Lenz P, et al. Mammary collagen architecture and its association with mammographic density and lesion severity among women undergoing image-guided breast biopsy. *Breast Cancer Res* 2021;23. <https://doi.org/10.1186/S13058-021-01482-Z>.
- [160] Pizzato M, Carioli G, Rosso S, Zanetti R, La Vecchia C. Mammographic breast density and survival in women with invasive breast cancer. *Cancer Causes Control* 2022. <https://doi.org/10.1007/S10552-022-01590-X>.
- [161] Drifka CR, Tod J, Loeffler AG, Liu Y, Thomas GJ, Eliceiri KW, et al. Periductal stromal collagen topology of pancreatic ductal adenocarcinoma differs from that of normal and chronic pancreatitis. *Mod Pathol* 2015;28:1470–80. <https://doi.org/10.1038/MODPATHOL.2015.97>.
- [162] Lee YC, Kurtova A V., Xiao J, Nikolos F, Hayashi K, Tramel Z, et al. Collagen-rich airway smooth muscle cells are a metastatic niche for tumor colonization in the lung. *Nat Commun* 2019;10. <https://doi.org/10.1038/S41467-019-09878-4>.
- [163] Koorman T, Jansen KA, Khalil A, Haughton PD, Visser D, Rätze MAK, et al. Spatial collagen stiffening promotes collective breast cancer cell invasion by reinforcing extracellular matrix alignment. *Oncogene* 2022;41:2458–69. <https://doi.org/10.1038/S41388-022-02258-1>.
- [164] Lupu M, Popa IM, Voiculescu VM, Boda D, Caruntu C, Zurac S, et al. A Retrospective Study of the Diagnostic Accuracy of In Vivo Reflectance Confocal Microscopy for Basal Cell Carcinoma Diagnosis and Subtyping. *J Clin Med* 2019;8. <https://doi.org/10.3390/JCM8040449>.
- [165] Sauermann K, Gambichler T, Wilmert M, Rotterdam S, Stücker M, Altmeyer P, et al. Investigation of basal cell carcinoma [correction of carcionoma] by confocal laser scanning microscopy in vivo. *Skin Res Technol* 2002;8:141–7. <https://doi.org/10.1034/J.1600-0846.2002.20345.X>.
- [166] Balu M, Zachary CB, Harris RM, Krasieva TB, König K, Tromberg BJ, et al. In vivo multiphoton microscopy of basal cell carcinoma. *JAMA Dermatology* 2015;151:1068–74. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2015.0453>.
- [167] Lin S-J, Wu R-J, Tan H-Y, Lo W, Lin W-C, Young T-H, et al. Evaluating cutaneous photoaging by use of multiphoton fluorescence and second-harmonic

- generation microscopy. *Opt Lett* 2005;30:2275. <https://doi.org/10.1364/OL.30.002275>.
- [168] Koehler MJ, König K, Elsner P, Bückle R, Kaatz M. In vivo assessment of human skin aging by multiphoton laser scanning tomography. *Opt Lett* 2006;31:2879. <https://doi.org/10.1364/OL.31.002879>.
- [169] Sugata K, Osanai O, Sano T, Takema Y. Evaluation of photoaging in facial skin by multiphoton laser scanning microscopy. *Skin Res Technol* 2011;17:1–3. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0846.2010.00475.X>.
- [170] Cicchi R, Vogler N, Kapsokalyvas D, Dietzek B, Popp J, Pavone FS. From molecular structure to tissue architecture: Collagen organization probed by SHG microscopy. *J Biophotonics* 2013;6:129–42. <https://doi.org/10.1002/jbio.201200092>.
- [171] Wu S, Huang Y, Tang Q, Li Z, Horng H, Li J, et al. Quantitative evaluation of redox ratio and collagen characteristics during breast cancer chemotherapy using two-photon intrinsic imaging. *Biomed Opt Express* 2018;9:1375. <https://doi.org/10.1364/BOE.9.001375>.
- [172] Lukina MM, Dudenkova V V., Shimolina LE, Snopova LB, Zagaynova E V., Shirmanova M V. In vivo metabolic and SHG imaging for monitoring of tumor response to chemotherapy. *Cytometry A* 2019;95:47–55. <https://doi.org/10.1002/CYTO.A.23607>.
- [173] Cicchi R, Crisci A, Cosci A, Nesi G, Kapsokalyvas D, Giancane S, et al. Time- and Spectral-resolved two-photon imaging of healthy bladder mucosa and carcinoma *in situ*. *Opt Express* 2010;18:3840. <https://doi.org/10.1364/OE.18.003840>.
- [174] Nijssen A, Bakker Schut TC, Heule F, Caspers PJ, Hayes DP, Neumann MHA, et al. Discriminating basal cell carcinoma from its surrounding tissue by Raman spectroscopy. *J Invest Dermatol* 2002;119:64–9. <https://doi.org/10.1046/J.1523-1747.2002.01807.X>.
- [175] Mu EW, Lewin JM, Stevenson ML, Meehan SA, Carucci JA, Gareau DS. Use of digitally stained multimodal confocal mosaic images to screen for nonmelanoma skin cancer. *JAMA Dermatology* 2016;152:1335–41. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2016.2997>.
- [176] Borile G, Sandrin D, Filippi A, Anderson KI, Romanato F. Label-Free Multiphoton Microscopy: Much More Than Fancy Images. *Int J Mol Sci*

- 2021;22:1–20. <https://doi.org/10.3390/IJMS22052657>.
- [177] Giacomelli MG, Faulkner-Jones BE, Cahill LC, Yoshitake T, Do D, Fujimoto JG. Comparison of nonlinear microscopy and frozen section histology for imaging of Mohs surgical margins. *Biomed Opt Express* 2019;10:4249. <https://doi.org/10.1364/BOE.10.004249>.
- [178] Byvaltsev VA, Bardonova LA, Onaka NR, Polkin RA, Ochkal S V., Shepelev V V., et al. Acridine Orange: A Review of Novel Applications for Surgical Cancer Imaging and Therapy. *Front Oncol* 2019;9. <https://doi.org/10.3389/FONC.2019.00925>.
- [179] Wang T, Jang WH, Lee S, Yoon CJ, Lee JH, Kim B, et al. Moxifloxacin: Clinically compatible contrast agent for multiphoton imaging. *Sci Rep* 2016;6:27142. doi: 10.1038/srep27142.
- [180] Sahu A, Cordero J, Wu X, Kossatz S, Harris U, Demetrio Desouza Franca P, et al. Combined PARP1-targeted nuclear contrast and reflectance contrast enhances confocal microscopic detection of basal cell carcinoma. *J Nucl Med* 2021;jnumed.121.262600. <https://doi.org/10.2967/JNUMED.121.262600>.
- [181] Demétrio de Souza França P, Kossatz S, Brand C, Karassawa Zanoni D, Roberts S, Guru N, et al. A phase I study of a PARP1-targeted topical fluorophore for the detection of oral cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2021;48:3618–30. <https://doi.org/10.1007/S00259-021-05372-6>.
- [182] Fast A, Lal A, Durkin AF, Lentsch G, Harris RM, Zachary CB, et al. Fast, large area multiphoton exoscope (FLAME) for macroscopic imaging with microscopic resolution of human skin. *Sci Rep* 2020;10. <https://doi.org/10.1038/S41598-020-75172-9>.
- [183] Wang H, Lee AMD, Frehlick Z, Lui H, Mclean DI, Tang S, et al. Perfectly registered multiphoton and reflectance confocal video rate imaging of in vivo human skin. *J Biophotonics* 2013;6:305–9. <https://doi.org/10.1002/JBIO.201200067>.
- [184] Sendín-Martín M, Lara-Caro M, Harris U, Moronta M, Rossi A, Lee E, et al. Classification of Basal Cell Carcinoma in *Ex vivo* Confocal Microscopy Images from Freshly Excised Tissues Using a Deep Learning Algorithm. *J Invest Dermatol* 2022;142:1291-1299.e2. <https://doi.org/10.1016/J.JID.2021.09.029>.
- [185] Campanella G, Navarrete-Dechent C, Liopyris K, Monnier J, Aleissa S, Minhas B, et al. Deep Learning for Basal Cell Carcinoma Detection for Reflectance Confocal

Microscopy. J Invest Dermatol 2022;142:97–103.
<https://doi.org/10.1016/J.JID.2021.06.015>.

- [186] Judd N, Smith J, Jain M, Mukherjee S, Icaza M, Gallagher R, Szeligowski R, Wu B. A pilot study for distinguishing chromophobe renal cell carcinoma and oncocytoma using second harmonic generation imaging and convolutional neural network analysis of collagen fibrillar structure. Proc. SPIE 10489, Optical Biopsy XVI: Toward Real-Time Spectroscopic Imaging and Diagnosis, 1048919 (21 February 2018); <https://doi.org/10.1117/12.2288088>.
- [187] Liu IT, Yen CS, Wang WL, Tsai HW, Chu CY, Chang MY, et al. Predict Early Recurrence of Resectable Hepatocellular Carcinoma Using Multi-Dimensional Artificial Intelligence Analysis of Liver Fibrosis. Cancers (Basel) 2021;13. <https://doi.org/10.3390/CANCERS13215323>.

CAPÍTULO 8. ANEXOS

8. ANEXOS

ANEXO I: ABREVIATURAS

- AF: autofluorescencia
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- ARN: ácido ribonucleico
- CAFs: *cancer-associated fibroblasts*
- CB: carcinoma basocelular
- CCNM: cáncer cutáneo no melanoma
- CMM: cirugía micrográfica de Mohs
- CT-FIRE: *Curvelet transformation (CT) – fiber extraction algorithm (FIRE)*.
- DDR: *Discoidin domain receptor*
- DHH: Desert Hedgehog
- DOI: densidad óptica integrada
- EHC: índice de empaquetamiento de los haces de colágeno
- EMA: *European Medicines Agency*
- ESMS: *European Society of Micrographic Surgery*
- EE.UU.: Estados Unidos
- FDA: *Food and Drug Administration*
- FFT: transformada de Fourier, del inglés *Fast Fourier Transform*
- FLAME: *Fast Large Area Multiphoton Exoscope*
- GSA: generación de segundo armónico
- H&E: hematoxilina-eosina
- IC: intervalo de confianza
- ICD: *International Classification of Diseases*
- IHH: Indian Hedgehog
- IOC: índice de orientación del colágeno
- Hh: vía de señalización Hedgehog
- MCR: microscopía confocal de reflectancia
- MEDF: microscopía de excitación de dos fotones

- MEC: matriz extracelular
- MMF: microscopía multifotón
- MSKCC: Memorial Sloan Kettering Cancer Center
- NADH: nicotinamida adenina dinucleótida
- RIC: rango intercuartil
- α -SMA: *alpha-smooth muscle actin*
- SAAID: *second harmonic to autofluorescence aging index of dermis*
- SHG: *second-harmonic generation*
- SHH: Sonic Hedgehog
- SMO: receptor transmembrana Smoothened
- TACS: *tumor associated collagen signature*
- TOC: tomografía óptica de coherencia
- UV: ultravioleta
- VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

ANEXO II: MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla suplementaria 1. Resultados del análisis comparativo entre las fibras de colágeno que rodean a las estructuras normales de la piel: epidermis *versus* glándulas sebáceas y folículos pilosos

Colágeno circundante a la epidermis (n= 133) vs. a glándulas sebáceas (n=43) y folículos pilosos (n=49)			
Índice	Grupos	Mediana (RIC)	p
IOC	Epidermis	0,34 (0,16-0,47)	1,000
	vs. glándula sebácea	0,25 (0,17-0,41)	
	vs. folículo piloso	0,39 (0,25-0,54)	
EHC	Epidermis	32 (23,81-39,84)	1,000
	vs. glándula sebácea	30,11 (27,67-40,96)	
	vs. folículo piloso	32 (24,97-43,59)	
Orientación	Epidermis	70,35 (52,37-80,55)	0,004
	vs. glándula sebácea	79,3 (66,62-84,7)	
	vs. folículo piloso	66,4 (50-78,7)	
Alineamiento	Epidermis	0,61 (0,4-0,78)	1,000
	vs. glándula sebácea	0,59 (0,46-0,8)	
	vs. folículo piloso	0,49 (0,33-0,67)	
Longitud	Epidermis	51,35 (47,4-56,65)	0,183
	vs. glándula sebácea	53,4 (50,3-55,60)	
	vs. folículo piloso	50,3 (45,65-52,95)	
Rectitud	Epidermis	0,9 (0,9-0,91)	1,000
	vs. glándula sebácea	0,9 (0,9-0,91)	
	vs. folículo piloso	0,9 (0,89-0,91)	
Anchura	Epidermis	3,7 (3,22-4,2)	0,015
	vs. glándula sebácea	4 (3,8-4,3)	
	vs. folículo piloso	3,5 (3,25-3,8)	
Ángulo	Epidermis	70,9 (57,9-79,1)	0,009
	vs. glándula sebácea	78,45 (73,62-83,92)	
	vs. folículo piloso	73,5 (63,2-83,1)	
DOI	Epidermis	839659,65 (461200,23-2033545,63)	0,044
	vs. glándula sebácea	1523861,67 (763009,62-2726225,7)	
	vs. folículo piloso	512826,88 (374045,72-1545245,29)	

Resultados de la prueba H de Kruskal-Wallis con análisis *post hoc* mediante U de Mann-Whitney y corrección de Bonferroni. n = número de imágenes de GSA analizadas. Los valores de orientación y ángulo se expresan en grados, los de anchura y longitud en

píxeles. Los valores de p estadísticamente significativos ($<0,05$) se muestran en negrita. Abreviaturas: CB, carcinoma basocelular; EHC, índice de empaquetamiento del colágeno; DOI, densidad óptica integrada; IOC, índice de orientación del colágeno; RIC, rango intercuartil.

Tabla suplementaria 2. Resultados del análisis comparativo entre las fibras de colágeno que rodean a las estructuras normales de la piel: glándulas sebáceas *versus* folículos pilosos

Colágeno circundante a las glándulas sebáceas (n=43) vs. folículos pilosos (n=49)			
Índice	Grupos	Mediana (RIC)	p
IOC	Glándula sebácea vs. folículo piloso	0,25 (0,17-0,41) 0,39 (0,25-0,54)	0,159
EHC	Glándula sebácea vs. folículo piloso	30,11 (27,67-40,96) 32 (24,97-43,59)	1,000
Orientación	Glándula sebácea vs. folículo piloso	79,3 (66,62-84,7) 66,4 (50-78,7)	0,298
Alineamiento	Glándula sebácea vs. folículo piloso	0,59 (0,46-0,8) 0,49 (0,33-0,67)	0,504
Longitud	Glándula sebácea vs. folículo piloso	53,4 (50,3-55,60) 50,3 (45,65-52,95)	0,183
Rectitud	Glándula sebácea vs. folículo piloso	0,9 (0,9-0,91) 0,9 (0,89-0,91)	1,000
Anchura	Glándula sebácea vs. folículo piloso	4 (3,8-4,3) 3,5 (3,25-3,8)	0,001
Ángulo	Glándula sebácea vs. folículo piloso	78,45 (73,62-83,92) 73,5 (63,2-83,1)	1,000
DOI	Glándula sebácea vs. folículo piloso	1523861,67 (763009,62-2726225,7) 512826,88 (374045,72-1545245,29)	0,001

Resultados de la prueba H de Kruskal-Wallis con análisis *post hoc* mediante U de Mann-Whitney y corrección de Bonferroni. n = número de imágenes de GSA analizadas. Los valores de orientación y ángulo se expresan en grados, los de anchura y longitud en píxeles. Los valores de p estadísticamente significativos ($<0,05$) se muestran en negrita. Abreviaturas: CB, carcinoma basocelular; EHC, índice de empaquetamiento del colágeno; DOI, densidad óptica integrada; IOC, índice de orientación del colágeno; RIC, rango intercuartil.

ANEXO III: PRODUCCIÓN CIENTÍFICA PARTE DE LA TESIS DOCTORAL

1. Publicaciones científicas:

Sendín-Martín M, Posner J, Harris U, Rajadhyaksha M, Kose K, Jain M. Quantitative collagen analysis for the detection of basal cell carcinoma with *ex vivo* multiphoton microscopy. Proc. SPIE 11618, Photonics in Dermatology and Plastic Surgery 2021, 116180W (5 March 2021); <https://doi.org/10.1117/12.2578776>.

2. Congresos:

Comunicación oral a congreso internacional:

Sendín-Martín, Posner J, Harris U, Rajadhyaksha M, Kose K, Jain J. Quantitative collagen analysis for the detection of basal cell carcinoma with *ex vivo* multiphoton microscopy. En: 2021 SPIE Photonics West Digital Forum; 5-11 March 2021.

3. Premios:

Premio de la Fundación Pública Andaluza para la Gestión de la Investigación en Salud en Sevilla (FISEVI) para una estancia becada de dos meses en el hospital Memorial Sloan Kettering Cancer Center (Nueva York, EEUU), para profundizar en el conocimiento en nuevas técnicas de imagen (microscopía confocal y multifotón) para el diagnóstico de carcinoma basocelular, octubre – diciembre 2019.

ANEXO IV: PRODUCCIÓN CIENTÍFICA PARTE DE LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

1. Publicaciones científicas:

Libro:

Jain M, Rossi A, Nehal K, Sendín-Martín M. Cutaneous Atlas of Ex vivo Confocal Microscopy. 1st ed. Cham: Springer; 2022. ISBN 978-3-030-89315-6.

Capítulos de libro (investigación original):

Sendín-Martín M, Jain M. Role of ex vivo confocal microscopy. In: Jain M, Rossi A, Nehal K, Sendín-Martín M, editors. Cutaneous Atlas of Ex vivo Confocal Microscopy. 1st ed. Cham: Springer; 2022. ISBN 978-3-030-89315-6.

Sendín-Martín M, Harris H, Farabi B, Moronta M, Rossi A, Lee E et al. Normal skin structures on ex vivo confocal imaging and histopathologic correlation. In: Jain M, Rossi A, Nehal K, Sendín-Martín M, editors. Cutaneous Atlas of Ex vivo Confocal Microscopy. 1st ed. Cham: Springer; 2022. ISBN 978-3-030-89315-6.

Sendín-Martín M, Harris H, Moronta M, Pulitzer M, Lee E, Rossi A et al. Features of Basal cell carcinoma on ex vivo confocal imaging and histopathologic correlation. In: Jain M, Rossi A, Nehal K, Sendín-Martín M, editors. Cutaneous Atlas of Ex vivo Confocal Microscopy. 1st ed. Cham: Springer; 2022. ISBN 978-3-030-89315-6.

Moronta M, Harris U, Sendín-Martín M, Bang A, Rossi A, Lee E et al. Epidermal reconstruction during ex vivo confocal microscopy for detection of superficial basal cell carcinoma with 3D-mosaicking and intensity projection. In: Jain M, Rossi A, Nehal K, Sendín-Martín M, editors. Cutaneous Atlas of Ex vivo Confocal Microscopy. 1st ed. Cham: Springer; 2022. ISBN 978-3-030-89315-6.

Artículos científicos:

Sendín-Martín M, Lara-Caro M, Harris U, Moronta M, Rossi A, Lee E, Chen CJ, Nehal K, Conejo-Mir Sánchez J, Pereyra-Rodríguez JJ, Jain M. Classification of Basal Cell Carcinoma in Ex vivo Confocal Microscopy Images from Freshly Excised Tissues Using a Deep Learning Algorithm. *J Invest Dermatol*. 2022 May;142(5):1291-1299.e2. doi: 10.1016/j.jid.2021.09.029. Epub 2021 Oct 23. PMID: 34695413.

Sendín-Martín M, Domínguez-Cruz JJ, Levitsky KL, Conejo-Mir Sánchez J. Ex vivo Fluorescence Confocal Microscopy on a 3-Color Scale: A New Imaging Technique. *Actas Dermosifiliogr (Engl Ed)*. 2020 Oct;111(8):702-704. English, Spanish. doi: 10.1016/j.ad.2019.04.010. Epub 2020 Jun 20. PMID: 32574721.

Sendín-Martín M, Kose K, Harris U, Rossi A, Lee E, Nehal K, Rajadhyaksha M, Jain M. Complete visualization of epidermal margin during ex vivo confocal microscopy of excised tissue with 3-dimensional mosaicking and intensity projection. *J Am Acad Dermatol*. 2022 Jan;86(1):e13-e14. doi: 10.1016/j.jaad.2020.05.044. Epub 2020 May 16. PMID: 32428611.

Sendín-Martín M, Bennassar A, Levitsky KL, Domínguez-Cruz JJ. Ex vivo confocal microscopy of basal cell carcinoma on a 3-color scale. *J Am Acad Dermatol*. 2019 Apr;80(4):e91-e92. doi: 10.1016/j.jaad.2018.12.022. Epub 2018 Dec 19. PMID: 30578817.

2. Congresos:

Comunicación a congresos internacionales:

Sendín Martín M, Domínguez Cruz J, Benassar A, Levitsky K, Martín Carrasco P, Monserrat García MT et al. Ex vivo confocal microscopy of basal cell carcinoma on a 3-color scale. In: 2019 Annual Meeting American Academy of Dermatology; 2019 March 1-5; Washington DC, EE.UU.

Comunicación a congresos nacionales:

Sendín Martín M, Domínguez Cruz J, Levitsky K, Benassar A, Pereyra Rodríguez JJ, Conejo-Mir Sánchez J. Microscopía confocal de fluorescencia del carcinoma espinocelular. En: 47 Congreso Nacional de Dermatología y Venereología. Academia Española de Dermatología y Venereología; junio 2019; Barcelona, España.

Sendín Martín M, Domínguez Cruz J, Levitsky K, Benassar A, Conejo-Mir Sánchez J. Papel de los fluoróforos en microscopía confocal a color del carcinoma basocelular: naranja de acridina y bromuro de etidio. En: 31 Reunión del Grupo Español de Dermato-Oncología y Cirugía de la Academia Española de Dermatología y Venereología; 1 diciembre 2018; Málaga, España.

Sendín Martín M, Domínguez Cruz J, Levitsky K, Monserrat García MT, Pereyra Rodríguez JJ, Corbi Llopis R et al. Microscopía confocal de fluorescencia *ex vivo* del carcinoma basocelular. En: 46 Congreso Nacional Dermatología y Venereología. Academia Española de Dermatología y Venereología; 9-12 mayo 2018; Palma de Mallorca, España.

Comunicación a congreso regional o local:

Sendín Martín M, Domínguez Cruz J, Levitsky K, Zulueta Dorado T, Conejo Mir Sánchez J. Eficacia de la microscopía convoca de fluorescencia a color en el diagnóstico del carcinoma basocelular. En: 2019 Reunión Andaluza de Dermatología. Sección Andaluza Academia Española de Dermatología y Venereología; 22-24 marzo 2019; Cádiz, España.

Sendín Martín M, Domínguez Cruz J, Benassar A, Levitsky K, Martín Carrasco P, Pereyra Rodríguez JJ, Conejo-Mir Sánchez J. Microscopía confocal de fluorescencia *ex vivo* en color del carcinoma basocelular. En: 15 Foro de Investigadores IBIS; 29-30 noviembre 2018; Sevilla, España.

3. Premios:

Mejor Estudio de Investigación Congreso anual de la Sección Andaluza la Academia Española de Dermatología 2019 (accésit) por el trabajo “Eficacia de la microscopía confocal de fluorescencia a color en el diagnóstico del carcinoma basocelular”, Cádiz, 22-24 marzo 2019.

Comunicación premiada por Grupo Español de Dermatología e Imagen (GEDEI) en el 46 Congreso Nacional de Dermatología de la Academia Española de Dermatología por el trabajo “Microscopía confocal de fluorescencia *ex vivo* del carcinoma basocelular”, Palma de Mallorca 9-12 mayo 2018.

