

# Bioarrayanes

Centro de Estudios Médicos Enfermedades Gastroenterológicas



## Proyecto de implementación en todos los hospitales terciarios de Chile de la técnica denominada Endosonografía Diagnóstica y terapéutica del tubo digestivo.

**Ventajas de costos, morbilidad y mortalidad, plan de implementación basado en la creación de un curso de postgrado en la ciudad de Concepción-Chile, Unidad de Gastroenterología Hospital del Trabajador de Concepción-Universidad de Concepción.**

### **Autores:**

**Gastroenterólogos:** Dr Md, PhD F Kawaguchi, Dr.F Riquelme, Dra CG Yañez, Dr Rodrigo Loaiza, Dr C Briceño.

**Patólogos.:** Dr Jaime Madariaga, Dra Carolina Delgado, Dr R Gutierrez.

### **Biólogos Celulares y Moleculares.**

Prof. Luis Aguayo.

Prof Carlos Gonzáles. Dra Apolinaria Garcia, Prof. Natalia Traval

Dr. O Venegas Dr. G Venegas, Tec MED. Mag CS JL Castillo.

### **Equipo de apoyo Biotecnológico**

A. Sepúlveda, R. Caamaño, A. Heisser, M. J. Avendaño, Y. Gidi

Luego de haber sido el primer centro de endosonografía endoscópica en Chile, gracias a la donación de las autoridades japonesas de un aparato EUM-3 en el año 1994, en la unidad de gastroenterología del hospital clínico regional de Concepción, Chile, proyecto que se vio abruptamente postergado debido a que la falta de capacitación de la empresa encargada en ese momento de este aparato no contaba con la técnica de reparación adecuada.

Luego de 2 años (1997), gracias a un proyecto regional también pionero en Chile, cual fue la unión de la universidad de concepción en conjunto con el hospital del trabajador de concepción en un desafío biotecnológico, al cual se sumaba la introducción del análisis biocelular (introducción en conjunto del citómetro de flujo).

Fue este, el primer proyecto en conjunto entre la empresa privada y una institución superior, basado todo en la experiencia del primer doctorado en Japón, gifu university hospital y aichi cancer center, de aceptar la proyección del Dr Fernando kawaguchi, médico Chileno, sobre quien recayó la responsabilidad de asumir la dirección del proyecto gastroenterológico, endosonográfico y de citometría de flujo.

El hospital del trabajador de Concepción a través de sus autoridades aceptó este desafío con el compromiso por parte del equipo de gastroenterólogos, inmunólogos, patólogos y citometristas de flujo de formar un grupo comprometido con la investigación de postgrado, lo cual resultaba ya difícil para una facultad de medicina regional cuyos metas estaban limitadas a la formación de pregrado.

Luego de transcurridos 10 años y múltiples publicaciones, presentaciones en congresos nacionales e internacionales, además de la falta de reconocimiento por parte de sus pares, acostumbrados a priorizar la formación de pregrado, alejándose de la investigación y del postgrado, llegando incluso a confundir postgrado con postítulo.

# Bioarrayanes

Centro de Estudios Médicos Enfermedades Gastroenterológicas



Esto, más el avance exponencial de la biotecnología en la observación de la cavidad digestiva y biliopancreática por dentro, permitió aceptar la alternativa de la cirugía endoscópica basada en los criterios endosonográficos de profundidad de invasión y de etapificación, para la resección acotada de aquellos tumores más pequeños.

Durante esta presentación veremos como un buen diagnóstico endosonográfico permitió a muchos pacientes no sacarse el páncreas con una morbimortalidad superior al 30% y un costo que era 10 veces el costo de la resección o apertura de una lesión sólida o mixta sólida-quística mediante la endoscopia.

Luego, de observar el incremento impresionante de las patologías neoplásicas biliopancreáticas y gástricas tempranas en nuestro medio, la idea de preparar un conjunto de profesionales en esta área que reúne la macroscopía endoscópica, anatomopatológica, oncológica e imageneológica más los criterios propios del internista y cirujano biliopancreático, consideramos que este proyecto se valida aún más al optimizar no sólo la cirugía endoscópica sino que también la preparación del:

1. MEDICO INTERNISTA GASTROENTERÓLOGO
2. EL IMAGENEOLÓGO TERAPEUTICO INTERVENCIONISTA.
3. EL ANATOMOPATÓLOGO, MEJORANDO SU INTEGRACIÓN CON EL CLÍNICO.
4. DARLE LA OPORTUNIDAD AL CIRUJANO A TENER UNA INTERRELACIÓN MÁS CERCANA CON EL MEDICO INTERNISTA GASTROENTERÓLOGO

Todas estas ventajas mencionadas, hacen de este proyecto la mejor alternativa para que la empresa privada se involucre en la investigación aplicada en el la patología oncológica temprana, lo cual sin lugar a dudas, mejorará el pronóstico y calidad de vida, sino que también disminuirá los riesgos de morbimortalidad propios de la cirugía abierta en lesiones neoplásicas tempranas, como también optimizará los costos y entregará un profesional capaz de constituir equipos multidisciplinarios de postgrado con un nivel de investigación de primer nivel.

A continuación presentaré la real utilidad de la endosonografía terapéutica con aguja para la etapificación y extracción de tumores sólidos y/o sólido quísticos, en reemplazo de la cirugía abierta o como complemento para optimizar la resección quirúrgica y oncoterápico



## **GENERALIDADES:**

### **1. CARACTERÍSTICAS DE EUS TERAPEUTICA**

#### **1.1 Ultrasonografía endoscópica**

- 1.1.1 Generalidades
- 1.1.2 Técnica
- 1.1.3 Limitaciones
- 1.1.4 Complicaciones

#### **1.2 Punción guiada por ultrasonografía endoscópica**

- 1.2.1 Técnica
- 1.2.2 Rentabilidad
- 1.2.3 Limitaciones
- 1.2.4 Complicaciones

### **2. UTILIDAD DE LA EUS TERAPEUTICA GUIADA CON AGUJA FINA**

#### **2.1 Linitis plástica y diagnóstico diferencial con otras enfermedades que causan pliegues gástricos engrosados**

- 2.1.1 Linitis plástica
- 2.1.2 Linfoma MALT
- 2.1.3 Patología benigna

#### **2.2 Neoplasia de páncreas**

- 2.2.1 Adenocarcinoma de páncreas
- 2.2.2 Tumores neuroendocrinos
- 2.2.3 Lesiones quísticas

- 2.3 Cáncer de esófago
- 2.4 Cáncer de estómago
- 2.5 Cáncer de recto
- 2.6 Cáncer de pulmón de célula no pequeña



### **3. UTILIDAD DE LOS AC MONOCLONALES COMO MARCADORES DEL CÁNCER**

- 3.1 Concepto y generalidades
- 3.2 Marcadores moleculares en el cáncer de páncreas
- 3.3 Micrometástasis ganglionares en neoplasmas digestivas
- 3.4 Metilación aberrante como marcador molecular de micrometástasis ganglionares
- 3.5 Contribución de la USE-PAAF en el diagnóstico molecular de las neoplasias y en la detección de micrometástasis ganglionares

### **4. JUSTIFICACIÓN DEL PRESENTE PROYECTO**

- Justificación al estudio 1
- Justificación al estudio 2
- Justificación al estudio 3
- Justificación al estudio 4

### **5. OBJETIVOS**

### **6.DISCUSIÓN**

### **7.CONCLUSIONES**

### **8.BIBLIOGRAFÍA**

### **9.COMUNICACIONES A CONGRESOS PUBLICACIONES ORIGINALES**



## 1. CARACTERÍSTICAS DE LA EUS GUIADA POR AGUJA FINA

### 1.1 Ultrasonografía Endoscópica

La ultrasonografía endoscópica (USE) combina la endoscopia con la ecografía para conseguir imágenes ecográficas de 360° desde el interior del tubo digestivo. Ello permite una muy buena visualización de las diferentes capas de la pared y de las estructuras de vecindad. Por esta razón la USE constituye una técnica idónea para estudiar el engrosamiento de los pliegues gástricos, explorar tanto las lesiones focales como la patología difusa del páncreas, y realizar la estadificación locoregional de los tumores digestivos.

#### 1.1.1 Generalidades

Con las frecuencias de que disponen los ecoendoscopios convencionales (5, 7,5 y 12 MHz) se identifican 5 capas en la pared del tubo digestivo. Desde la luz hacia el exterior estas capas son: la primera -hiperecogénica- mucosa superficial más la interfase con el extremo del aparato, la segunda -hipoecogénica- mucosa profunda más su interfase con la submucosa, la tercera -hiperecogénica- submucosa más su interfase con la muscular, la cuarta -hipoecogénica- muscular propia más su interfase con la serosa o adventicia, y la quinta -hiperecogénica- la serosa o adventicia propiamente dicha (figura 1). Las minisondas (que son 26 catéteres de ecografía que se introducen por el canal operativo de un endoscopio convencional) y los ecoendoscopios que disponen de frecuencias altas (20 MHz) permiten visualizar hasta 9 capas pudiendo así diferenciar correctamente la muscularis mucosa y las dos capas (longitudinal y circular) de la muscular propia.

La diferenciación de las capas permite estudiar la afectación en profundidad de las neoplasias pudiendo así determinar el estadio;

T: tumores superficiales o, T1 que afectan exclusivamente la mucosa o Mucosa y submucosa, por lo que en la EUS se identifican como un engrosamiento de la primera capa, con o sin alteración de la segunda capa;

T2 que afectan hasta la muscular por lo que en la EUS se identifican como un engrosamiento de la primera, segunda y tercera capa;

T3 que afectan hasta la serosa, adventicia o grasa y que en la EUS se identifican como un engrosamiento de toda la pared sobrepasando la tercera capa en forma de irregularidad o digitaciones del perímetro externo;

T4 que invaden órganos de vecindad o ampliamente la grasa circundante. Esta diferenciación también permite estudiar el engrosamiento de los pliegues gástricos y las características y origen de los tumores submucosos.

Además, el EUS permite visualizar un área peridigestiva de unos 6 cm alrededor del órgano explorado. Esto permite explorar correctamente la relación de las neoplasias



con los órganos de vecindad e identificar las adenopatías regionales, pudiendo así determinar el estadio N.

Asimismo, es posible estudiar el páncreas de forma que el proceso uncinado, la cabeza y el área papilar se exploran desde el duodeno, mientras que el cuerpo y la cola desde el estómago.

Aunque en la mayoría de los casos no es la exploración de elección para la detección de metástasis a distancia, en algunas ocasiones la EUS también puede proporcionar información sobre el estadio M como en el caso de las neoplasias de esófago distal con adenopatías celíacas o si se detecta carcinomatosis peritoneal.

### 1.1.2 Técnica

El EUS estándar es un endoscopio flexible de visión oblicua que tiene acoplado un transductor ecográfico en su extremo distal. Es posible obtener la visión endoscópica y la ecoendoscópica en el mismo momento.

Para la obtención de imágenes ecográficas de buena calidad es imprescindible obtener una buena ventana acústica. El aire es el elemento más distorsionador por lo que es importante insuflar lo mínimo posible. Además en el estómago, duodeno y recto se suele instilar agua para mejorar la transmisión de las ondas de ultrasonido. Por otro lado, en la punta del ecoendoscopio se coloca un pequeño balón que se puede rellenar de agua lo que permite mejorar la ventana acústica.

El procedimiento de EUS suele durar unos 30 minutos de promedio por lo que es necesario administrar anestesia o sedación.

### 1.1.3 Limitaciones

Las limitaciones del EUS son pocas. En primer lugar, existen lesiones estenosantes que impiden el paso del ecoendoscopio convencional. Esta limitación en el caso de las estenosis esofágicas se puede superar utilizando sondas EUS de menor calibre, sin canal de aspiración ni visión endoscópica y que presentan un extremo en forma de dilatador.

Por otro lado, así como la EUS es una técnica ideal para la identificación y tipificación de lesiones pequeñas, es una mala técnica para el estudio de las lesiones de gran tamaño, ya que éstas se escapan de su campo de visión. Por otro lado, el hecho de que se trate de un endoscopio de visión oblicua y con una punta dura (transductor ecográfico), hace desaconsejable su utilización en el colon ya que el riesgo de perforación es mayor.



## 1.1.4 Complicaciones

Hasta la fecha se han descrito pocas complicaciones graves con la USE. Como en todos los procedimientos endoscópicos, existe un riesgo mínimo de perforación, hemorragia, bacteriemia y, sobretodo, desaturación relacionada con la sedación (este es el motivo por el cual la sedación la hacemos con propofol para las EUS terapéuticas o sólo con sedación con dimecaína en la EUS diagnóstica).

## 1.2 PUNCIÓN GUIADA POR ULTRASONOGRAFÍA ENDOSCÓPICA

En la última década, se ha desarrollado el ecoendoscopio sectorial que permite introducir una aguja por el canal operativo que emerge por el extremo distal del aparato en el campo de visión de las ondas ultrasónicas. Esto permite realizar la punción con aguja fina guiada por el EUS en tiempo real desde el interior del tubo digestivo y obtener material citológico para el diagnóstico de adenopatías, masas pancreáticas, tumores submucosos y lesiones extraluminales.

### 1.2.1 Técnica

La EUS intervencionista debe realizarse con el ecoendoscopio lineal o sectorial ya que permite visualizar la aguja en todo su trayecto durante la punción.

Estos ecoendoscopios van acoplados a una consola de ecografía que dispone de señal doppler y doppler color, lo que permite identificar la presencia de vasos en el territorio al que se va a acceder durante la punción. Existen varios tipos de agujas pero las más empleadas son desechables, de 18-22 Gauge de grosor y hasta 8 cm de longitud.

Para realizar la exploración es conveniente la presencia de un anestesista que realice una sedación profunda y se responsabilice de la monitorización del paciente. La mayoría de los ecoendoscopistas prefieren, en primer lugar, realizar la exploración con el ecoendoscopio radial para localizar y caracterizar la lesión con mayor precisión.

En un segundo tiempo se introduce el ecoendoscopio para realizar la punción bajo control ecográfico en tiempo real, es decir visualizando la aguja en todo su trayecto y durante todo el procedimiento.

En la parte central de la aguja va colocado un estilete que evita la contaminación de la aguja con células del trayecto de punción. Una vez que la aguja se encuentra dentro de la lesión a estudio, se retira el estilete y se conecta la jeringa al extremo proximal de la aguja. Se ejerce presión negativa aspirando unos 3-4 cc en la jeringa y se realizan unos 10 movimientos de vaivén de la aguja dentro de la lesión que provocan el paso de células al interior de ésta.



Tras retirar la aguja, se inyecta aire por su extremo proximal para dar salida al material con el que se realizan tantos intentos como sea necesario para la obtención de material adecuado para el diagnóstico citológico.

### 1.2.2 Rentabilidad

Aunque existen múltiples estudios en la literatura que demuestran el alto rendimiento para la obtención de material citológico adecuado de la Punción con Aguja Fina (PAF). Se ha estipulado que cuando el citopatólogo se encuentra en la sala de exploraciones durante el procedimiento y dictamina in situ la idoneidad del material obtenido, el índice de diagnósticos definitivos mejora en un 10-15% y se reduce el tiempo de la exploración así como el riesgo de complicaciones derivadas del procedimiento al disminuir de forma global el número de intentos (nuestro equipo aún no trabaja con el citopatólogo dentro del pabellón, pero si lo hace con el citometrista de flujo).

### 1.2.3 Limitaciones

Para realizar una EUS-PAF, el paciente debe presentar parámetros de coagulación dentro de la normalidad. La lesión a estudio debe medir como mínimo 5 mm y situarse en un área de unos 6-8 cm alrededor del órgano explorado.

Una de las limitaciones importantes de la EUS-PAF es la contaminación de la muestra por células de la pared del tubo digestivo que se aspiran de forma accidental durante la punción.

Esto no constituye una limitación real si un citopatólogo con suficiente experiencia evalúa las muestras. Sin embargo, cuando la contaminación es por células del propio tumor se podrían obtener resultados falsamente positivos.

Por ello es muy importante no atravesar el tumor para acceder a las adenopatías que se pretenden evaluar.

Este hecho es limitante sobre todo en las neoplasias de esófago y recto en las que, a menudo, las adenopatías son de localización peritumoral.



## 1.2.4 Complicaciones

Como se ha comentado, la EUS-PAF es una técnica muy segura. Sin embargo, se han descrito algunas complicaciones, como hemorragia, infección y pancreatitis agudas que en ningún caso han comportado riesgo vital. Estas complicaciones están claramente relacionadas con el tipo de lesión y la localización de la misma, de forma que las lesiones sólidas son las que presentan menos complicaciones (0,5%) y en cambio las lesiones quísticas presentan un índice mayor (14%) en especial hemorragias intraquísticas autolimitadas o infectadas (Este es otra razón de que nuestro grupo de acuerdo a lo demostrado en los Congresos nacionales, el de Cancún, Noviembre 2006 y el de Montevideo, Diciembre 2006), habitualmente intenta la penetración y drenaje completo de la colección si esta es por ejemplo pancreática, lo cual además de ser útil para el paciente, nos permite acceder a posibles neoplasias intraquísticas, o si es un tumor sólido, intentamos la resección inmediata de la lesión sólida si esta es temprana y sin invasión de órganos vasculares, como podría ser el caso de un tumor de papila, o un tumor del estómago. Cabe hacer notar que en el caso de una lesión epitelial con compromiso hasta sm1, realizamos una resección endoscópica, pues hemos encontrado que la mayor agresividad y riesgo de metástasis se encuentra en aquellas lesiones sm3 (Uruguay diciembre 2006, Lynch O, Schultz H et als).

Para evitar esta última complicación se propone realizar profilaxis antibiótica en los pacientes con lesiones quísticas o masas pararectales, así como drenar totalmente los quistes puncionados. No obstante, en la actualidad no existe ningún estudio prospectivo que haya demostrado la utilidad de los antibióticos ni la pauta a seguir.

La diseminación de células tumorales en el trayecto de la punción es un riesgo teórico pero no se ha demostrado en estudios randomizados.

## 2. UTILIDAD DE LA EUS-PAF

Se ha corroborado que la EUS es una técnica muy útil para el diagnóstico de extensión de las neoplasias digestivas ya que permite determinar el estadio TNM.

Sin embargo, esta técnica en un endosonografista con una experiencia menor a 5 años (Escuela Japonesa) es incapaz de diferenciar el tejido tumoral del tejido inflamatorio. Por ello, la confirmación histológica se tiene que hacer necesariamente mediante la obtención de biopsias. Estas biopsias se pueden obtener con pinza de biopsias durante la endoscopia convencional o mediante punción aspirativa guiada por ecoendoscopia.

En esta introducción se presentarán los aspectos fundamentales de las neoplasias que son el principal objetivo de reconocer ante la sospecha endoscópica pero con biopsias recurrentemente negativas, objetivo básico para difundir este Proyecto a nivel Nacional.



## 2.1 LINITIS PLÁSTICA Y DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL CON OTRAS ENFERMEDADES QUE CAUSAN PLIEGUES GÁSTRICOS ENGROSADOS

Se define como pliegues gástricos engrosados aquellos que en la endoscopia aparecen con calibre superior al habitual y que no desaparecen con la insuflación de aire.

El manejo de los pacientes con pliegues gástricos engrosados es un reto en la práctica clínica habitual ya que el diagnóstico diferencial está constituido por un amplio abanico de patología que incluye procesos malignos (adenocarcinoma y linfoma) y benignos (gastritis hipertrófica, enfermedad de Ménétrier, hiperplasia linfoide y síndrome de Zollinger-Ellison).

A pesar de que cada una de estas enfermedades presenta unas características clínicas determinadas, el aspecto endoscópico, a menudo, no permite discriminar entre los procesos benignos y malignos con precisión. Las biopsias que habitualmente son diagnósticas, en este caso pueden no ser representativas por lo que se requiere la toma de macrobiopsias o biopsias múltiples.

En este contexto, la EUS, ha demostrado ser definitivamente concluyente sobre todo en aquellos pacientes en quienes la sospecha de cáncer gástrico por parte del endoscopista esta claro, pero, las biopsias, no importando el número de las mismas, siguen saliendo negativas, y los tiempos planteados por el GES(PLAN AUGE), exige que los tiempos sean respetados para que se confirme o descarte la presencia de tumor demostrado ser de gran utilidad ya que, al ser capaz de discriminar las capas de la pared gástrica, permite sugerir el tipo de patología y su exacta localización y si es única o sincrónica con otra lesión aún no descubierta por el examen Endoscópico. Aquí es donde la tinción con indigo carmin o azul de metileno previa digestión enzimática con una sustancia que digiere la capa de mucina protectora, permite acercarnos a la localización de la lesión tumoral. No reemplaza en todo caso la evaluación EUS, sino que resulta complementaria.

### 2.1.1 Linitis plástica

La linitis plástica es una forma de cáncer gástrico primario o metastático que se caracteriza por una infiltración de la submucosa y muscular propia con indemnidad de la mucosa y, por tanto es, de difícil diagnóstico mediante endoscopia y biopsias convencionales. Dado que las biopsias pueden ser negativas se requiere macrobiopsia que a su vez, en ocasiones, puede no ser demostrativa.

La EUS, en cambio, aporta una información muy importante puesto que el aspecto endosonográfico de la linitis es tan característico que permite apoyar el diagnóstico con una alta fiabilidad a pesar de no disponer de confirmación histológica. La linitis aparece como un engrosamiento importante de la pared (>4 mm), con conservación de la estructura en capas y importante rigidez y dificultad a la distensión con agua. Aunque este aspecto es muy evocador, no es patognomónico de tumor primario ya que las metástasis gástricas de algunos cánceres y especialmente del cáncer de mama pueden dar la misma imagen. Además, la EUS



permite realizar diagnóstico de extensión locorregional al descartar infiltración a órganos vecinos, adenopatías y, en este caso, típicamente ascitis que sugiere carcinomatosis peritoneal (URUGUAY DICIEMBRE 2006)

### 2.1.2 Linfoma MALT

El diagnóstico diferencial de la linitis plástica se debe hacer, en primer lugar, con el linfoma MALT. Este linfoma, relacionado directamente con la infección por *Helicobacter Pylori*, puede adoptar cualquier forma pero suele afectar siempre la capa mucosa por lo que el diagnóstico se hace mediante biopsias. La EUS es sin embargo, muy útil para su estudio de extensión y para evaluar la respuesta al tratamiento (CANCUN NOVIEMBRE 2006).

### 2.1.3 Patología benigna

Entre las patologías benignas que pueden dar una imagen de pliegues gástricos engrosados en la gastroscopia está la enfermedad de Ménétrier que es una patología poco frecuente caracterizada por un engrosamiento exagerado de la pared gástrica a expensas de la segunda capa (mucosa > 3 mm) y la presencia de imágenes quísticas en su interior, el Síndrome de Zollinger Ellison que se caracteriza por un engrosamiento de la capa mucosa que es más manifiesto en el fundus y, por último, las gastritis y gastropatías que característicamente afectan solamente a la capa mucosa.



## 2.2 NEOPLASIA DE PÁNCREAS (VER en CANCUN NOVIEMBRE 2006):

El páncreas es una glándula de difícil acceso ya que presenta una localización retroperitoneal y es, además, muy delicada siendo fácil el desencadenamiento de pancreatitis o hemorragias con su manipulación. Por añadidura, las lesiones focales de páncreas son a menudo de pequeño tamaño o se acompañan de un importante componente fibrótico que hace difícil la obtención de material citológico de buena calidad. Una vez más, por sus características, la EUS permite un fácil acceso al páncreas por lo que es la técnica de elección para el estudio de estas lesiones.

### 2.2.1 Adenocarcinoma de páncreas:

La incidencia del carcinoma de páncreas ha experimentado un notable aumento en los últimos 50 años, situándose entre 5 y 10 casos por 100.000 habitantes y año, sin observarse una mejora franca en su pronóstico. Así, las tasas de mortalidad se superponen a las de incidencia, siendo la probabilidad de supervivencia a los tres y cinco años inferior al 10% y 3%, respectivamente. Los motivos que justifican este mal pronóstico son la ausencia de poblaciones de riesgo a las que dirigir programas de screening y la elevada capacidad de progresión tumoral y diseminación metastásica que posee esta neoplasia, lo que dificulta o impide su diagnóstico precoz.

El primer reto en el diagnóstico del cáncer de páncreas es la visualización del tumor, especialmente en el caso de las pequeñas neoplasias obstructivas de la cabeza del páncreas. Múltiples estudios publicados han demostrado que la sensibilidad y especificidad de la EUS es mayor que la de la tomografía computerizada (TC), hecho que es más evidente cuando los tumores son menores de 3 cm. La precisión diagnóstica de la EUS en comparación con la ultrasonografía convencional. El TAC Helicoidal, la ERCP y arteriografía en la detección de la neoplasia de páncreas ha sido objeto de múltiples estudios y se sitúa alrededor del 97%, 73%, 76%, 92% y 88% respectivamente.

Como en cualquier neoplasia, el diagnóstico del cáncer de páncreas requiere su confirmación cito-histológica. Para ello es necesario obtener una muestra de tejido tumoral, lo que puede efectuarse mediante punción aspirativa con aguja fina (PAF), por vía percutánea o endoscópica, o biopsia quirúrgica.

Los diferentes estudios publicados hasta la fecha demuestran que la EUS-PAF es la técnica más rentable y con menor morbilidad. Williams et al<sup>30</sup> en un estudio llevado a cabo con 144 pacientes con sospecha de neoplasia de páncreas, demostraron unos índices de sensibilidad, especificidad, precisión diagnóstica para la USE-PAAF de 82%, 100%, 85%, respectivamente. A pesar de estos excelentes resultados y de la baja morbilidad, las indicaciones universalmente aceptadas de la EUS-PAF en los tumores de páncreas son la confirmación citológica de lesiones no resecables y el estudio histológico de lesiones que no presenten las características típicas de una neoplasia de páncreas o que acontecen en pacientes con antecedentes especiales.



Estas lesiones pueden corresponder a linfoma, metástasis, tuberculosis o tumores neuroendocrinos pancreáticos<sup>31</sup>. La indicación de la EUS-PAF en los tumores resecables es más controvertida ya que la mayoría de los autores sostienen que la obtención de uno o varios resultados citológicos negativos no modifica la actitud terapéutica cuando el aspecto de la tumoración es muy sugestivo de lesión neoproliferativa.

En la evaluación de la extensión locorregional del cáncer de páncreas, la EUS-PAF tiene también un papel relevante. En un estudio reciente<sup>3</sup> se comparó el costo – beneficio de la PAF guiada por TC, la cirugía y la EUS-PAF para el diagnóstico de adenopatías metastásicas no peritumorales en pacientes con tumores de cabeza de páncreas resecables por TC helicoidal.

La EUS-PAF demostró ser la técnica más coste-efectiva y con mayor sensibilidad. Con ello se destaca la importancia de, una vez descartada la existencia de metástasis o enfermedad no resecable por TC helicoidal, realizar una EUS-PAF en la etapificación del cáncer de páncreas.

### **2.2.2 Tumores neuroendocrinos:**

La EUS también tiene un papel muy importante en el diagnóstico de los tumores neuroendocrinos siendo la técnica con mayor sensibilidad puesto que es capaz de identificar lesiones de hasta 5 mm de diámetro. Además, la EUS-PAF permite establecer el diagnóstico de certeza imprescindible ya que permite obtener material citológico no sólo para el estudio convencional sino también para la caracterización inmunohistoquímica. El aspecto ecográfico similar a una adenopatía, la multiplicidad de las lesiones y la posibilidad de realizar cirugía conservadora (enucleación), refuerzan la necesidad de practicar EUS-PAF en muchos de estos pacientes antes de adoptar una actitud terapéutica determinada.

### **2.2.3 Lesiones quísticas:**

Las lesiones quísticas del páncreas pueden ser benignas (pseudociste, cistoadenoma seroso), malignas (cistoadenocarcinoma) o premalignas (cistoadenoma mucinoso, tumor mucinoso papilar intracanalicular). Ante el hallazgo de una lesión quística del páncreas, la conducta terapéutica oscila entre la abstención y la cirugía electiva en función del grado de malignidad de la lesión. Por ello, es imprescindible obtener el máximo de información antes de tomar una decisión terapéutica.

Las características endosonográficas de las lesiones quísticas permiten distinguir las neoplasias malignas del resto de lesiones con una alta especificidad pero, en cambio, difícilmente diferencian un quiste seroso macrolobular de un mucinoso por lo que la confirmación citológica juega un papel primordial. Sin embargo, la rentabilidad de la PAF en estos casos, en cuanto a la obtención de material con suficiente celularidad para el diagnóstico de malignidad, es más baja que en las tumoraciones sólidas ya que no siempre se obtienen células del interior del quiste (77% de los casos<sup>2</sup>). Además, aunque las células no sean atípicas no puede descartarse que exista displasia en alguna otra zona del quiste. No obstante, la



rentabilidad de la EUS-PAF es aceptable en caso de que la lesión presente tabiques engrosados o masas sólidas de las que se pueda obtener material citológico, o que se obtenga abundante mucina ya que su presencia permite distinguir las lesiones con potencial de malignización (cistoadenoma mucinoso y tumor mucinoso papilar intracanalicular)<sup>36,37</sup>. Por otro lado, un estudio multicéntrico reciente en el que se ha evaluado la utilidad de determinar ciertos marcadores tumorales (CA-125, CA 15-3, CA 19-9, CA 72-4 y CEA) en el líquido obtenido mediante EUS-PAF, demuestra que niveles de CEA elevados (superiores de 192ng/ml) constituyen un marcador de malignidad más preciso que las características endosonográficas (79% vs 51%) o que la citología (79% vs 59%) para distinguir quistes mucinosos de no mucinosos.

## 2.3 CÁNCER DE ESÓFAGO:

El carcinoma esofágico presenta una incidencia muy variable y, a pesar de ser relativamente poco frecuente en nuestro medio, supone una de las neoplasias más frecuentes en la población mundial. La incidencia europea es de 5-8 casos/105 habitantes/año, con una relación hombre:mujer de 5:1, y ocupa el tercer lugar entre los tumores malignos del tracto gastrointestinal, precedido por los cánceres colorrectal y gástrico. En los últimos años se ha apreciado un notable aumento en la incidencia de adenocarcinoma del esófago distal, lo que hace que esta variante represente ya entre el 25% y el 50% de las neoplasias de esófago atendidas en diversas áreas geográficas.

El pronóstico del carcinoma de esófago viene determinado por el estadio de extensión en el momento del diagnóstico más que por el tipo histológico o la localización del tumor. De esta forma, estadios iniciales (I-IIA) tienen supervivencia a los 5 años del 30-50% y en cambio estadios más avanzados (IIB) tienen tan sólo el 5-15% de supervivencia a los 5 años. Se trata, por tanto, de una neoplasia con una elevada capacidad de diseminación, incluso en estadios macroscópicamente poco avanzados, lo que hace necesario contemplar, en los casos en los que sea posible, un abordaje terapéutico multidisciplinario, combinando la cirugía con la radioterapia y la quimioterapia. A pesar de algunas importantes limitaciones metodológicas, diversos estudios han demostrado que la radioquimioterapia neoadyuvante permite mejorar la resecabilidad y la supervivencia en pacientes con neoplasia de esófago localmente avanzada.

Por todo ello, las estrategias diagnósticas aplicadas en la actualidad a este tipo de pacientes consisten en procesos secuenciales encaminados a clasificar a los pacientes en función del estadio evolutivo de su enfermedad, y cuya intensidad depende de las posibilidades terapéuticas<sup>48</sup>. Estas evidencias hacen que sea de capital importancia la correcta estadificación de la neoplasia antes de la toma de decisiones terapéuticas, para lo que la USE junto la TC torácica han demostrado ser las técnicas de elección.

La EUS ha demostrado ser el método más preciso en el diagnóstico de extensión locoregional del carcinoma de esófago. Específicamente, la precisión diagnóstica de la EUS para el estadio T es del 86% frente el 72% de la TC. En el caso de la valoración de los ganglios linfáticos, la EUS también ha demostrado presentar una



mayor precisión diagnóstica que la TC (81% versus 61%, respectivamente). En este sentido, si bien existen unos criterios ecoendoscópicos de malignidad para las adenopatías (tamaño mayor a 1 cm de diámetro, forma redondeada, límites precisos y baja ecogenicidad), éstos no son definitivos. Así, cuando la adenopatía reúne estas cuatro características, presenta un 80-100% de probabilidades de ser metastásica aunque sólo un 25% de los ganglios infiltrados presentan los cuatro criterios simultáneamente. Esta limitación es compartida, por otro lado, con las demás técnicas diagnósticas. Dicho problema se ha superado con la introducción de la EUS-PAF que permite obtener material para estudio citológico y confirmar así la naturaleza de la adenopatía con una alta rentabilidad (sensibilidad, especificidad y rentabilidad diagnóstica del 88%, 100% y 100%, respectivamente) y un índice de complicaciones despreciable<sup>2</sup>, 58.

Según un estudio publicado por Vázquez-Sequeiros et al<sup>55</sup> en que se comparó de forma prospectiva el rendimiento e impacto de la TC helicoidal, la EUS, EUS-PAF, en el estudio de extensión locoregional en las neoplasias del esófago. La EUS-PAF fue la técnica más precisa (87% vs 51% en relación con la TC, y 87% vs 74% en relación con la USE) para el diagnóstico de las adenopatías metastásicas. Lo que es más importante, la información aportada por la EUS-PAF, comportó un cambio en la estrategia terapéutica en un tercio de los pacientes. Por otro lado, la ventaja de esta técnica respecto a las demás se pone especialmente de manifiesto en el caso

de la detección de adenopatías en la región del tronco celíaco. En el cáncer de esófago, las adenopatías en la región celíaca se consideran metastásicas y se relacionan con un peor pronóstico. Por ello es muy importante su correcta identificación en el estudio de extensión locoregional. En este sentido, la EUS y, sobretudo, la EUS-PAF, juegan un papel importante, puesto que su precisión en el diagnóstico de las adenopatías celíacas es del 93% y 97%, respectivamente<sup>55</sup>, siendo la EUS-PAF una técnica costo/efectiva al evitar que estos pacientes sean intervenidos innecesariamente,

## 2.4 CÁNCER DE ESTÓMAGO:

Aunque la incidencia de cáncer gástrico ha disminuído en el mundo desarrollado, sigue siendo alto en el mundo subdesarrollado y particularmente en nuestra región. Se trata de neoplasias que suelen diagnosticarse en una fase avanzada, con compromiso metastásico locoregional o a distancia, lo que condiciona el pronóstico. Así, los pacientes con lesiones localizadas presentan supervivencias mayores del 50% a los 5 años, mientras que en los pacientes con enfermedad metastásica locoregional o a distancia estos valores descienden al 20-40% y a menos del 5%, respectivamente.

Como ocurre en el cáncer de esófago, el objetivo del tratamiento quirúrgico del cáncer gástrico debería ser la obtención de una resección radical, con márgenes de seguridad de entre 3 y 5 cm. ya que, de lo contrario, la cirugía no comporta ningún beneficio en cuanto a la supervivencia<sup>61</sup>. Por todo ello, en los pacientes posiblemente candidatos a cirugía con intencionalidad curativa, es obligatorio efectuar un estudio de extensión preoperatorio preciso que, en ocasiones, puede



requerir la realización de una laparoscopia para descartar diseminación peritoneal o hepática.

El papel de la EUS en el dgco. de extensión del cáncer gástrico es más relevante en nuestro país a aquellos países anglosajones, con una persistencia del tipo intestinal dependiente de factores ambientales, rodeado de mucosa dañada con metaplasia intestinal habitualmente incompleta y alteración de la mucina habitual, con tendencia a localización astral en paciente hombre de 60 años o más y de mejor pronóstico que el de localización alta y que se inserta en mucosa sana sin relación al helicobacter pylori ni a los factores sanitarios.

Así, la utilidad de la EUS es muy relevante en países del tercer mundo, que requieren confirmar los casos de neoplasias en estadio IA (afectación únicamente mucosa), en las que la resección local puede ser suficiente, y en la diferenciación entre estadios II y III, ya que mientras que en los primeros es posible obtener resecciones completas (R0), en el segundo caso este objetivo difícilmente se consigue mediante la cirugía aislada.

En cambio, a diferencia de lo observado en otras neoplasias digestivas como el cáncer de esófago o de recto, el efecto de la quimioterapia adyuvante sobre la supervivencia es discutible y, probablemente marginal, por lo que únicamente se aconseja, fuera del contexto de estudios clínicos, en pacientes en los que se demuestra compromiso del margen de resección en el estudio de la pieza operatoria. Por lo tanto, la aproximación terapéutica no requiere tanta precisión en el diagnóstico de extensión puesto que en caso de neoplasia irresecable se realiza cirugía paliativa y en caso de que ésta sea resecable, cirugía curativa con vaciado ganglionar sea cual sea la afectación en profundidad de la neoplasia.

Aún así, la EUS ha demostrado su superioridad frente a la TC en el diagnóstico locorregional del cáncer gástrico, con una precisión diagnóstica del 85% para el estadio T y del 80% para el estadio N, y ciertos autores la consideran una herramienta de ayuda al cirujano en la aproximación a la cirugía 64-66. En un estudio realizado recientemente en nuestra Unidad<sup>67</sup> en el que se analizó el significado de pequeñas cantidades de ascitis no detectada por TC en 577 pacientes portadores de una neoplasia abdominal, se demostró que el 45% de ellos tenían carcinomatosis peritoneal que se confirmó posteriormente durante el acto quirúrgico. El 75% de estos pacientes eran portadores de una neoplasia gástrica. De este estudio se deduce un valor adicional de la EUS en la evaluación de los pacientes con neoplasia gástrica que es su utilidad en aquellos con alta probabilidad de tener una carcinomatosis peritoneal y que, por tanto, deberían ser sometidos a una laparoscopia exploradora previa a la cirugía.



## 2.5 CÁNCER DE RECTO

El cáncer colorrectal representa una de las neoplasias más frecuentes en los países occidentales. A pesar del avance alcanzado en su diagnóstico, tratamiento y prevención, continúa siendo la segunda causa de muerte por cáncer<sup>68</sup>. Los tumores de recto suponen un 20-25% del total y presentan características clínicas y pronósticas propias que los distinguen de aquellos originados en el colon. Estas diferencias se deben fundamentalmente a peculiaridades anatómicas que facilitan la progresión del tumor hacia estructuras vecinas, lo cual condiciona las estrategias diagnósticas y terapéuticas.

El diagnóstico del cáncer de recto se basa fundamentalmente en la exploración endoscópica. Esto permite no tan sólo visualizar el tumor, sino también obtener muestras de tejido para el diagnóstico histológico. Sin embargo, estas técnicas son insuficientes para la estadificación de la lesión. Este aspecto es especialmente importante en el cáncer de recto ya que existen diversas evidencias que sugieren un efecto beneficioso de la radioterapia preoperatoria en el pronóstico de estos pacientes.

Efectivamente, se ha demostrado que los pacientes con cáncer rectal en estadios avanzados (T3 -T4 N0, o Tx N1-2) se benefician de tratamiento neoadyuvante con quimioradioterapia. Es, por tanto, primordial realizar un estudio de extensión preterapéutico exhaustivo.

Existen numerosos estudios que ponen de manifiesto la alta fiabilidad de la EUS en el diagnóstico de extensión de esta neoplasia siendo la precisión diagnóstica para el estadio T de alrededor del 85-90%<sup>74-76</sup> y, por tanto, superiores a los de la TC. El principal problema de la EUS deriva de que a menudo estas neoplasias presentan un importante componente inflamatorio que la EUS es incapaz de diferenciar del tejido tumoral y conlleva a sobrestadificación de tumores T2. De la misma forma, también se puede realizar infraestadificación de la lesión al ser incapaz de identificar focos microscópicos de invasión tumoral. La experiencia del endoscopista y la localización del tumor (cuanto más distales más difícil) son otros dos factores que juegan un papel a la hora de alcanzar un diagnóstico correcto. Por último, hasta un 17% de las lesiones son estenosantes y no se pueden estudiar. Por lo que respecta a la evaluación del estadio N, ninguna prueba de imagen es muy precisa. Los estudios disponibles demuestran que la EUS es capaz de identificar correctamente las adenopatías tumorales perirectales con una precisión del 70-75% comparado con el 55-65% de la TC y 60-65% de la RM. En este sentido, como ya se ha comentado previamente, si bien existen unos criterios ecoendoscópicos de malignidad para las adenopatías, éstos no son definitivos. Esta limitación es compartida, por otro lado, con las demás técnicas diagnósticas. La introducción de la EUS-PAF debería superar este problema ya que permite obtener material para estudio citológico y confirmar así la naturaleza de la adenopatía con una alta rentabilidad. Sin embargo, en un estudio reciente, la EUS-PAF no demuestra aportar mayor precisión al rendimiento de la EUS en el cáncer de recto. Una explicación aportada por los autores es que la mayoría de adenopatías perirectales



con algún criterio de malignidad por EUS son malignas, por lo que la PAF no aporta demasiada información con relación a la EUS sola.

Por otro lado, en el cáncer de recto, las adenopatías no metastastásicas no suelen visualizarse por EUS ya que son muy pequeñas e isoeco técnicas. De hecho, 50-70% de los ganglios mayores de 0,5 cm localizados en el mesorrecto son metastásicos y, en cambio, sólo un 20% de los menores de 4 mm lo son. Por ello, se estipula que el mero hecho de visualizarlos por EUS ya presenta un valor predictivo positivo tan elevado que no es necesaria la punción.

En cambio, en los tumores en estadios más precoces sí que es importante realizar la confirmación mediante punción porque en este caso la presencia de una adenopatía positiva cambia el pronóstico y el tratamiento de estos pacientes. Por otro lado, un estudio reciente demuestra que la realización de la EUS-PAF en el estudio de extensión de las neoplasias rectales presenta un impacto sobre la supervivencia libre de enfermedad de estos pacientes y que la combinación de EUS y TC es la estrategia más eficaz desde el punto de vista del costo (costo/eficacia).



## 3. UTILIDAD DE LOS MARCADORES MOLECULARES EN EL DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER

### 3.1 CONCEPTO Y GENERALIDADES

Los avances en los conocimientos fisiopatogénicos del cáncer han permitido identificar alteraciones genéticas que pueden ser útiles para detectar las células neoplásicas. Estos marcadores moleculares son más sensibles que las técnicas convencionales basadas en métodos morfológicos (citología convencional, inmunocitoquímica). Así, la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el posterior análisis mutacional del producto obtenido permite identificar la presencia de alteraciones génicas específicas de un determinado tumor en material procedente de la propia neoplasia o en líquidos u órganos distintos del tejido de origen, situación esta última que indica la presencia de células neoplásicas en dicha localización. Cuando no existe una mutación específica de una determinada neoplasia, la identificación de las células malignas puede efectuarse a través de la determinación de la expresión de genes selectivamente expresados en el órgano en el cual se origina el tumor mediante transcripción reversa y posterior amplificación con PCR (RT-PCR), o detectando alteraciones epigenéticas propias de las células neoplásicas. Estas técnicas ultrasensibles permiten identificar hasta una célula tumoral entre 10<sup>7</sup> células no tumorales, por lo que pueden ser de enorme utilidad para el diagnóstico del cáncer y la detección de metástasis.

### 3.2 MARCADORES MOLECULARES EN EL CÁNCER DE PÁNCREAS

En los últimos años, se ha asistido a un importante avance en el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la patogenia de diversas neoplasias digestivas, entre las que destacan el carcinoma colorrectal y el carcinoma pancreático. En relación con el cáncer de páncreas, aunque la información disponible es menor, destaca el papel patogénico del oncogen KRAS cuya implicación se ha demostrado en el 70-80% de estos tumores. Este protooncogen codifica una proteína de membrana (p21) que cuando está fosforilada, favorece la activación de la cascada MAPquinasa que tiene como finalidad la síntesis de DNA.

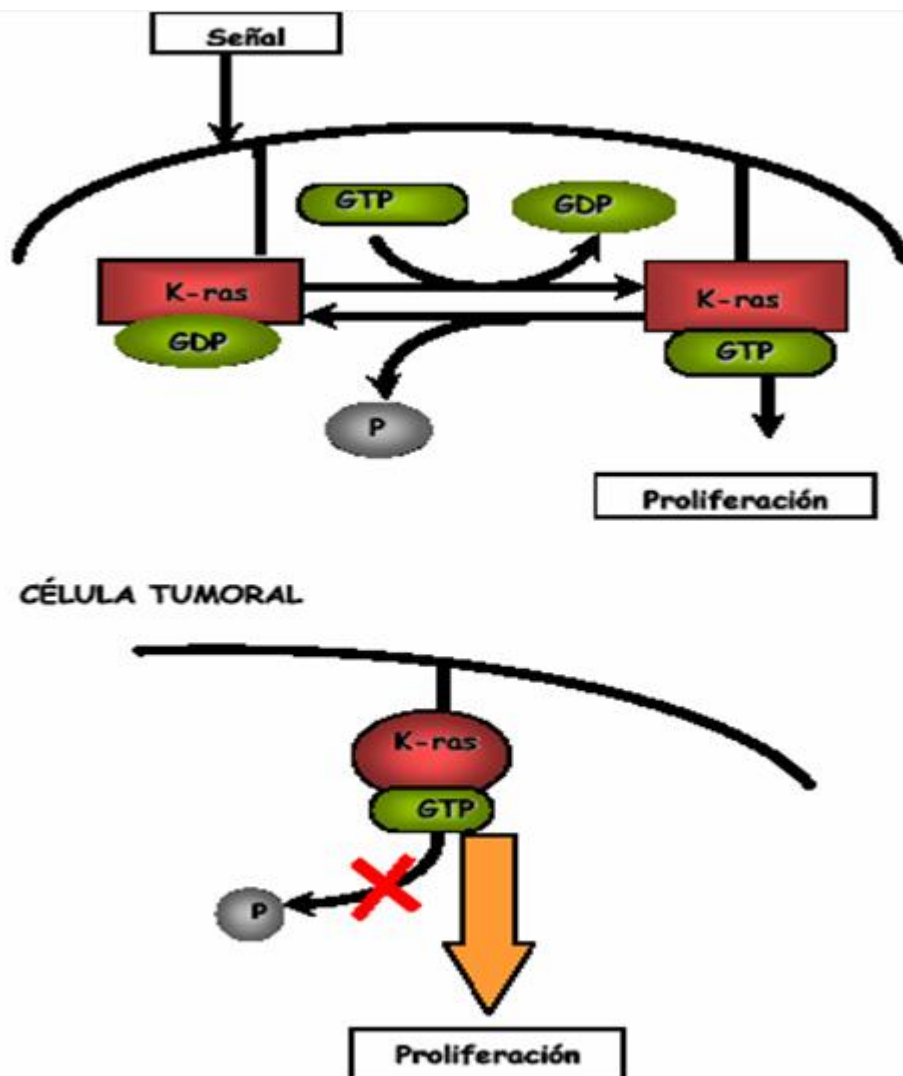
Cuando existen mutaciones en el gen KRAS, p21 se encuentra permanente fosforilada y activada por lo que se incrementa la transducción de señal que resultará en un aumento de la actividad proliferativa de la célula. La presencia universal y casi constante de mutaciones somáticas en el codón 12 del gen KRAS ha favorecido el desarrollo de técnicas moleculares dirigidas al diagnóstico de esta neoplasia.

En este sentido, mediante amplificación génica ha sido posible identificar la presencia de mutaciones en el gen KRAS en ADN extraído del jugo pancreático y otros especímenes cito-histológicos, lo que permite incrementar la precisión diagnóstica de la CPRE y de la PAF por vía percutánea, respectivamente. Además, un estudio realizado por nuestro grupo ha demostrado, no sólo que es factible detectar estas mutaciones en ADN extraído del plasma de pacientes con cáncer de páncreas, sino que ello facilita el diagnóstico diferencial de las masas pancreáticas y posee valor pronóstico con relación a la supervivencia. Sin embargo, la utilidad



diagnóstica del análisis mutacional del KRAS está limitada por la existencia de resultados falso-positivos y falso-negativos. Así, se han detectado mutaciones en el gen KRAS en células ductales hiperplásicas de páncreas sin alteraciones macroscópicas y en lesiones premalignas como el tumor mucinoso papilar intracanalicular o la pancreatitis crónica. Por otro lado, hasta un 20-30% de los tumores no presentan mutaciones en el gen KRAS y, además, existe una distribución intratumoral heterogénea de las mutaciones lo que puede dar lugar a resultados falsos negativos.

Mecanismo de acción del gen KRAS en células normales y neoplásicas.





### 3.3 MICROMETÁSTASIS GANGLIONARES EN NEOPLASIAS DIGESTIVAS:

Como se ha comentado, la precisión de la EUS para el diagnóstico de la extensión ganglionar de las neoplasias digestivas y pulmonares, se sitúa alrededor del 75%, con algunas variaciones según la localización del tumor primario. En este sentido, es importante señalar que, aunque si una adenopatía presenta todas las características endosonográficas de malignidad tiene una posibilidad del 80-100% de ser metastásica, sólo un 25% de las adenopatías malignas reúnen todos estos criterios. Esta dificultad puede solventarse con la utilización de la EUS-PAF que permite obtener material citológico para confirmar la infiltración metastásica de las adenopatías con un rendimiento cercano al 90%. Sin embargo, se ha demostrado que en las adenopatías pueden existir focos de micrometástasis no detectables por métodos de citología convencional. Estas células neoplásicas aisladas que han invadido los ganglios pueden desarrollarse de una forma similar a las infiltraciones metastásicas masivas detectadas por las técnicas de histología convencional. De hecho, se ha demostrado que la presencia de estos nidos de células malignas empeora el pronóstico de estos pacientes.

En los últimos años, se ha investigado la posibilidad de detectar la existencia de micrometástasis en diversos órganos diana, así como la presencia de células neoplásicas circulantes. Las técnicas que se emplearon inicialmente, basadas en métodos morfológicos (citología convencional, inmunocitoquímica), se hallaban limitadas por su baja sensibilidad. Sin embargo, el desarrollo de procedimientos para el estudio de los ácidos nucleicos ha permitido disponer de técnicas más sensibles y con una elevada especificidad para la detección de células ocultas en determinados tejidos o fluidos. Con estas técnicas ha sido posible detectar micrometástasis a nivel de los ganglios linfáticos o en la médula ósea en pacientes con cáncer de esófago, gástrico, recto, y pulmón. La relevancia clínica de este hallazgo es difícil de establecer ya que se requiere un seguimiento a largo plazo y, además, es difícil obtener un patrón oro con el que ser comparado. Sin embargo, hasta la fecha se ha demostrado que pueden encontrarse focos de micrometástasis por métodos inmunohistoquímicos o de biología molecular en hasta un 50% de las adenopatías no metastásicas por histología convencional, en el cáncer de pulmón.

Más importante aún es la observación de que, tanto en esta neoplasia como en el cáncer de esófago y gástrico, la presencia de estas células presenta un impacto desfavorable en los pacientes. Por ello, algunos grupos consideran que se debería incluir la detección de micrometástasis en la evaluación previa al tratamiento de estos pacientes.

En este sentido, la EUS-PAF podría ser la técnica idónea para la obtención del material ganglionar necesario para aplicar estas técnicas moleculares, en el estudio de extensión de las neoplasias digestivas y metastasis.



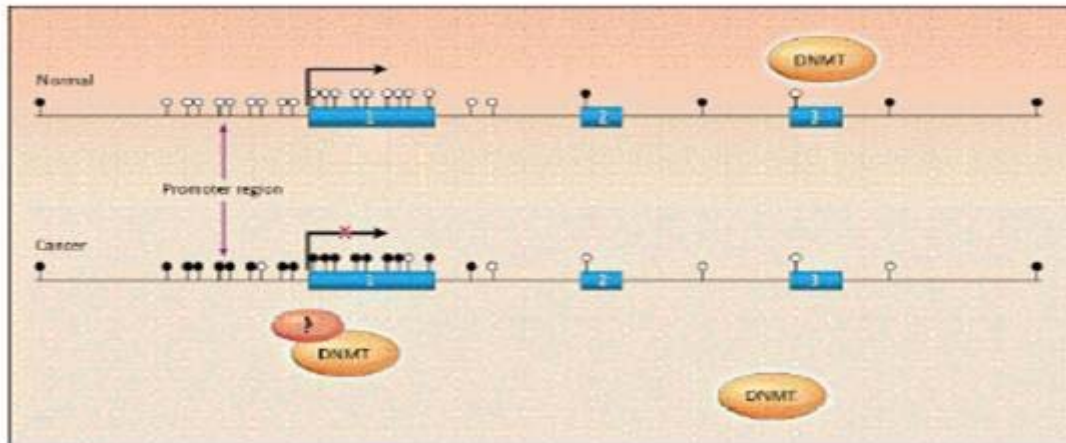
### 3.4 METILACIÓN ABERRANTE COMO MARCADOR MOLECULAR DE MICROMETÁSTASIS GANGLIONARES

Como se ha señalado anteriormente, existen diferentes estrategias que permiten distinguir una célula tumoral de una normal a nivel molecular. Las dos estrategias más empleadas hasta la fecha han sido la identificación de mutaciones en oncogenes y la detección de alteraciones en la expresión de determinados genes. Aunque la primera estrategia es más atractiva, se ve limitada por el hecho de que es infrecuente que un tumor presente mutaciones en un oncogen específico de forma muy prevalente. La segunda estrategia es mucho más factible pero presenta el inconveniente de ser poco específica ya que las células normales en otras situaciones no neoplásicas en determinadas situaciones (inflamación, isquemia...) también pueden presentar alteraciones en la expresión génica. Recientemente se ha propuesto una estrategia mucho más novedosa que consiste en la determinación de cambios epigenéticos específicos de las células tumorales. La herencia de la información basada en niveles de expresión génica no determinada por la estricta secuencia genética recibe el nombre de epigenética.

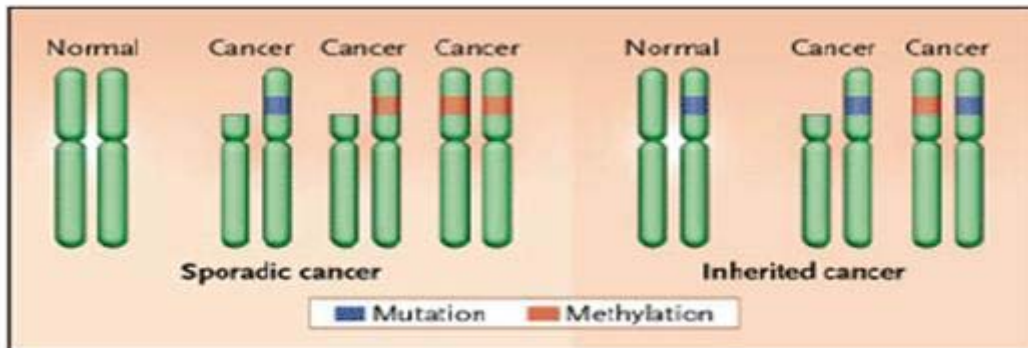
Esta debe diferenciarse de la genética, la cual hace referencia a la información transmitida teniendo como base la secuencia genética. La principal modificación epigenética en humanos es la metilación de la citosina que se localiza en el dinucleótido CpG y constituye entre el 0,75-1% de todas las bases. Así, el genoma humano contiene cerca de un 6% de 5-metilcitosina (5-mC), que es indispensable para la vida. Los dinucleótidos CpG no están distribuidos al azar sino que existen zonas especialmente ricas denominadas islas CPPS. Estas islas se localizan en la región inicial del gen (promotor y primer exón) y en células no neoplásicas suelen estar no metiladas por lo que permiten la correcta transcripción genética. La metilación de las islas CpG de los promotores de determinados genes, entre los que se incluyen algunos genes supresores, conlleva una incapacidad para la transcripción de éstos y, por tanto, para la síntesis de la proteína correspondiente. La metilación del ADN constituye un paso precoz y fundamental en la transformación del tejido normal hacia tumoral.



Distribución de los dinucleótidos CPG en el Genoma Humano y diferencias con los patrones de metilación entre las células normales y tumorales



Cambios Genéticos y Epigenéticos que inactivan los Genes Supresores Tumorales. De acuerdo a la Hipótesis de "Los Dos Golpes" de Knudson



Recientemente se ha descrito un perfil de hipermetilación concreto para cada neoplasia humana de forma que, combinando 3-4 marcadores, se puede lograr tipificar prácticamente cada tumor. Algunos de estos genes son compartidos y otros son tumor-específicos. Así, los tumores gastrointestinales comparten un grupo determinado de genes hipermetilados que incluyen p16INK4a, p14ARF, MGMT, APC y hMLH1, mientras que el CPCNP presenta un patrón distinto que afecta a los genes DAPK, MGMT y p16INK4a.



La nueva tecnología que ha permitido estudiar la metilación está basada en la modificación del ADN con bisulfito y posterior amplificación mediante PCR con cebadores específicos (methylation specific polymerase chain reaction MSP).

El tratamiento con bisulfito cambia la C no metilada a T pero no modifica la C metilada. Esta técnica también puede asociarse a PCR cuantitativa, análisis de restricción o secuenciación.

Para que un método sea utilizado como diagnóstico, debe ser rápido, fácil, sensible y no radioactivo.

La MSP cumple con estos cuatro requerimientos. Por ello, la hipermetilación de islas CpG ha sido usada como herramienta para detectar células neoplásicas en lavados broncoalveolares, nódulos linfáticos, esputo, orina, saliva, lavado ductal y en suero de pacientes con cáncer con excelentes resultados. Sin embargo, hasta la fecha, ningún grupo ha utilizado el material obtenido por EUS-PAF para el estudio micrometástasis mediante determinación de los patrones de metilación.



### **3.5 CONTRIBUCIÓN DE LA PUNCIÓN CON AGUJA FINA GUIADA POR EUS EN EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LAS NEOPLASIAS Y EN LA DETECCIÓN DE MICROMETÁSTASIS GANGLIONARES.**

La EUS-PAF por su alto rendimiento y baja morbilidad, puede constituir la técnica idónea para la obtención del material con el que realizar los estudios moleculares dirigidos a la identificación de células neoplásicas. La aplicación de estos conocimientos de biología molecular al diagnóstico del cáncer de páncreas a través de material obtenido por EUS-PAF tan sólo ha sido estudiada por ciertos grupos. Tada et al demuestran que es posible detectar mutaciones del KRAS en material obtenido por EUS-PAF y que esta aproximación presenta un rendimiento mayor al de la citología. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en esta serie corta de enfermos, los resultados de la citología convencional eran inferiores a los obtenidos habitualmente en otras series publicadas.

Por otro lado, hasta la fecha, tan sólo existe un estudio que emplea el material obtenido por EUS-PAF para la identificación de micrometástasis. En este estudio el grupo de Wallace, demuestra que es posible detectar células ocultas en las adenopatías mediastínicas de los pacientes con cáncer de pulmón determinando la actividad de la telomerasa por RT-PCR.

**ESTE ACTUAL PROYECTO MULTIDISCIPLINARIO BASADO EN LA EUS-PAF INTENTA ENTREGAR EVIDENCIAS PRÁCTICAS QUE VALIDEN LA REAL UTILIDAD EN NUESTRA REALIDAD REGIONAL Y NACIONAL PARA OPTIMIZAR EL DIAGNOSTICO, PRONÓSTICO y TRATAMIENTO DE LAS NEOPLASIAS DIGESTIVAS Y LAS MICROMETASTASIS BASADO EN LOS MARCADORES MOLECULARES OBTENIDOS MEDIANTE ESTA TÉCNICA**

### **JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS**

#### **JUSTIFICACIÓN GENERAL**

El pronóstico de los pacientes con neoplasias está claramente relacionado con el diagnóstico precoz y la posibilidad de efectuar tratamiento. Para que se administre la terapia más adecuada en cada caso es imprescindible, en primer lugar, disponer de las características histológicas del tumor y, en segundo lugar, lograr un estudio de extensión lo más preciso posible. La EUS-PAF presentan las prestaciones adecuadas que hacen de ellas técnicas de elección para el diagnóstico y estudio de extensión locoregional de las neoplasias digestivas y metástasis, así como para la obtención de material para el diagnóstico citológico.

Por otro lado, en los últimos años, se ha asistido a un importante avance en el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la patogenia de estas neoplasias. El desarrollo de procedimientos para el estudio de los ácidos nucleicos ha permitido disponer de técnicas extremadamente sensibles y con una elevada especificidad para la detección de células neoplásicas en determinados tejidos o fluidos.



A pesar de la conocida utilidad de la EUS en Oncología, existen patologías de difícil manejo clínico en los que el rendimiento de esta técnica no ha sido evaluado adecuadamente. Además, tampoco se han analizado cuáles son las circunstancias que permiten obtener un mayor rendimiento de la EUS-PAF. Por otro lado, la combinación de una técnica diagnóstica novedosa como es la EUS-PAF con los métodos de biología molecular, asociados a la nueva técnica de endoscopia confocal que traen incorporados un EUS y un láser, suponen definitivamente el tan esperado avance en dónde los biólogos celulares, moleculares, junto a los clínicos, imageneólogos y anatomopatólogos e inmunólogos provoquen el diagnóstico temprano, preciso, y simultáneamente la etapificación y si es posible la resección definitiva, optimizando la morbimortalidad, costos y pronóstico del cáncer digestivo.

## JUSTIFICACIÓN AL ESTUDIO

### PRIMERA JUSTIFICACION:

EUS con pliegues gástricos engrosados por endoscopia y biopsias recurrentemente negativas: Factores predictivos de malignidad e impacto clínico.

La linitis es una entidad que se caracteriza por una infiltración de la pared gástrica por células neoplásicas, con frecuencia de tipo en anillo de sello que se acompaña de una importante reacción estromal y fibrosa de la submucosa y extensión linfática y peritoneal precoz. A menudo, las biopsias convencionales obtenidas durante la gastroscopia son negativas, por lo que es difícil lograr un diagnóstico de confirmación. La EUS, al permitir explorar la pared, podría ser una técnica fundamental en este contexto.

### SEGUNDA JUSTIFICACION:

Factores predictivos de diagnóstico correcto e importancia de disponer de un patólogo en la sala de exploración en la punción con aguja fina guiada por EUS- AF: La utilidad de la EUS-PAF en el diagnóstico citopatológico de lesiones focales de páncreas y en el estudio de extensión de las neoplasias digestivas y pulmonares viene determinada por la posibilidad de obtener material citológico de buena calidad. Sin embargo, no se conocen con precisión cuáles son los factores que influyen en el rendimiento de la misma. La ayuda de un patólogo en la propia sala de exploración que realice un dictamen in situ durante el procedimiento podría ser determinante, por ello, es importante establecer los factores que influyen en el rendimiento de la punción con aguja fina guiada por ultrasonografía endoscópica, así como analizar la influencia que supone disponer de la presencia del patólogo.

### TERCERA JUSTIFICACION:

Utilidad clínica del análisis mutacional del gen KRAS en el diagnóstico del adenocarcinoma de páncreas mediante EUS-PAF: .



El diagnóstico de las lesiones focales de páncreas siempre ha sido dificultoso por la localización retroperitoneal de la glándula y por las características de las lesiones. La EUS-PAF ha demostrado ser la técnica de elección ya que presenta un elevado rendimiento y baja morbilidad asociada. Sin embargo, siguen existiendo subgrupos de pacientes en los que el diagnóstico es difícil.

La pancreatitis crónica pseudotumoral, los tumores bien diferenciados o las lesiones quísticas de páncreas, por ejemplo, continúan siendo un reto diagnóstico. En estos casos el material citológico obtenido es más escaso o difícil de interpretar. Por otro lado, el adenocarcinoma de páncreas presenta mutaciones en el oncogén KRAS en más del 80% de los pacientes. En este caso, además, las mutaciones se localizan de manera casi exclusiva en el codón 12, lo cual facilita su detección mediante procedimientos moleculares relativamente simples (PCR-RFLP y SSCP).

La combinación de esta técnica molecular con la citología convencional en material obtenido por EUS-PAF podría lograr un rendimiento en el diagnóstico del cáncer de páncreas que, en la actualidad, ninguna técnica posee.

Aliment Pharmacol Ther 2003; 17: 1299-1307.

#### **CUARTA JUSTIFICACION:**

Detección de micrometástasis ganglionar mediante determinación de perfiles de hipermetilación en material obtenido por punción aspirativa guiada por EUS-PAF:

Con respecto al diagnóstico de la extensión ganglionar de las neoplasias digestivas y pulmonares, la precisión diagnóstica de la EUS se sitúa alrededor del 75%, con algunas variaciones según la localización del tumor primario. La obtención de material citológico por EUS-PAF permite confirmar la infiltración metastásica de las adenopatías con un alto rendimiento. Sin embargo, se ha demostrado que existen focos de micrometástasis, no detectables por métodos de citología convencional. Aún más importante, se ha demostrado que la presencia de estos nidos de células malignas conlleva un deterioro en el pronóstico de estos pacientes.

En los últimos años se ha investigado la posibilidad de detectar la existencia de micrometástasis en diversos órganos diana utilizando técnicas de biología molecular. Uno de los posibles métodos para detectar células neoplásicas se basa en el hecho de que las células neoplásicas presentan hipermetilación de las regiones promotoras de algunos genes supresores.

Además cada tipo de neoplasia presenta un patrón de metilación específico por lo que su identificación equivale a la detección de las células neoplásicas con una alta sensibilidad y especificidad. Por ello, una aproximación interesante es la detección de micrometastasis ganglionar a partir de la identificación de patrones de metilación aberrante en el material obtenido por EUS-PAF. La combinación de la citología convencional junto con esta técnica molecular podría permitir detectar un mayor número de adenopatías metastásicas.



Clin Cancer Research 2004; 10: 4444-4449.

## OBJETIVOS

Los objetivos específicos del presente PROYECTO son:

1. Evaluar los parámetros endosonográficos predictivos de malignidad en pacientes con pliegues gástricos engrosados y biopsias negativas para malignidad así como analizar el potencial impacto clínico de la EUS en estos pacientes.
2. Evaluar los factores que condicionan el rendimiento de la EUS-PAF en el diagnóstico citológico de las lesiones digestivas y peridigestivas.
3. Evaluar la utilidad de la EUS-PAF en el diagnóstico de las neoplasias de páncreas mediante el estudio de mutaciones en el codón 12 del gen KRAS en el material aspirado, correlacionándolo con el estudio de mucinas y displasia ductal pancreática.
4. Evaluar la utilidad de la EUS-PAFF en el diagnóstico de extensión de las neoplasias digestivas (esófago, estómago, recto) mediante el estudio de los patrones de mutilación específicos obtenidos desde la EUS-PAF.

## DISCUSION

Los resultados del presente Proyecto intenta demostrar la real utilidad de la EUS.

La ultrasonografía endoscópica es una técnica altamente efectiva en el diagnóstico y en el estudio de extensión de las neoplasias digestivas y sus metástasis regionales y de órganos vecinos, permitiendo mediante EUS-FNA realizar análisis moleculares en el material aspirado, lo cual puede incluso incrementar su rendimiento diagnóstico.

El primer valor de este Proyecto es que en los pacientes con pliegues gástricos engrosados y biopsias reiteradamente negativas, la EUS permite ver el engrosamiento decapas profundas (submucosa y/o muscular 5mm), lo que permite identificar a los pacientes con real patología maligna situación que a veces se hace angustiante para el profesional, paciente y patólogo, con una gran precisión (especificidad del 97% y valor predictivo positivo y negativo del 95%).

Además, cuando se analiza el impacto que tiene la realización de la EUS sobre el manejo de estos pacientes se observa que la probabilidad de que presenten una linitis aumenta del 34% al 95% cuando la EUS sugiere malignidad. En cambio, si la EUS sugiere benignidad está probabilidad disminuye hasta el 4,7%. Por otro lado, mientras que la presencia de un engrosamiento de las capas profundas es el único factor independiente predictivo de malignidad, existen otros factores asociados a esta condición como son la desaparición de la estructura en capas, la dificultad a la



distensión con agua y la presencia de ascitis o de ganglios linfáticos con criterios de malignidad.

Este estudio aporta, por lo tanto, una información valiosa que puede facilitar el manejo de un subgrupo de pacientes que siempre ha supuesto un reto diagnóstico. Los tres estudios previos existentes en la literatura sobre la utilidad de la EUS en el diagnóstico de los pacientes con pliegues gástricos engrosados son descriptivos y no consideran el subgrupo de pacientes con biopsias reiteradamente negativas que es el que ofrece mayor dificultad diagnóstica y, por tanto, es donde la EUS puede tener mayor relevancia clínica. De manera similar a nuestros resultados, estos estudios muestran que el engrosamiento de las capas más profundas es muy sugestivo de malignidad. A la luz de estos hallazgos, la EUS, debería considerarse una técnica diagnóstica IMPRESCINDIBLE EN EL MANEJO DE LOS pacientes con pliegues gástricos engrosados en los que las biopsias endoscópicas no permiten alcanzar el diagnóstico. Este hecho constituye la única circunstancia en la que la imagen ecoendoscópica es lo suficientemente específica para justificar que un paciente sea sometido a tratamiento oncológico, incluso sin confirmación histológica previa.

La segunda conclusión es el poder identificar los factores relacionados con un diagnóstico correcto en pacientes evaluados mediante EUS-PAF, así como evaluar el costo real de disponer de un patólogo en la sala de exploración durante el procedimiento.

Cuando se analizó la serie global de pacientes sometidos a EUS-PAF se observó que el único factor determinante de mal rendimiento era el tipo de lesión siendo las lesiones intraparietales las asociadas a un peor rendimiento. El estudio del costo permitirá establecer que, en nuestro medio, la presencia del patólogo en la sala de exploración es una estrategia eficaz, al permitir disminuir el número de biopsias (-) necesarios para obtener un diagnóstico (+). Pero, no todos los centros hospitalarios pueden disponer de un patólogo en la sala de exploración por lo que se considerará fundamental ver el número de muestras necesarias para conseguir un rendimiento similar al obtenido con ayuda del patólogo. En este caso, es importante destacar que el número de pases necesarios para lograr material adecuado para el diagnóstico citológico se modifica en función del tipo de lesión, de forma que en las adenopatías con tan sólo 3 muestras obtiene un buen rendimiento, mientras que en las masas pancreáticas hacen falta 4 muestras para tener los mismos resultados.

La tercera conclusión de este Proyecto se centra en la neoplasia de páncreas que, por su localización retroperitoneal y sus características histológicas, es difícil de estudiar.

En la mayor parte de los casos se trata de lesiones malignas de tipo adenocarcinoma, pero hay que tener en cuenta que existen otras posibles etiologías que comportan actitudes terapéuticas y un pronóstico radicalmente diferentes: tumor neuroendocrino, linfoma, metástasis o incluso patología estrictamente inflamatoria.



Por ello, antes de indicar un tratamiento quimioterápico paliativo en pacientes con neoplasia irresecables, es imprescindible disponer del diagnóstico citopatológico. Páncreas, a menudo se acompañan de un importante componente inflamatorio o desmoplástico que hace que la obtención de material suficiente para el diagnóstico citológico sea dificultosa.

A este hecho se añade la difícil diferenciación entre las pancreatitis pseudotumorales y las neoplasias que asientan sobre un páncreas heterogéneo.

Estas consideraciones refuerzan la importancia del tercer estudio, en el cual se demuestra una vez más el alto rendimiento de la EUS-PAF para el diagnóstico de lesiones focales de páncreas pero, sobre todo, aporta una información relevante sobre la utilidad de una técnica molecular ultrasensible como es la detección de mutaciones en el gen KRAS. Así, el problema básico del diagnóstico citológico está en la capacidad de obtener material adecuado para que el citólogo sea capaz de dar un diagnóstico correcto.

En aquellos pacientes en los que las muestras de la PAF son adecuadas, el estudio citopatológico es superior al molecular, ofreciendo la combinación de ambos una mínima ventaja.

Sin embargo, cuando se tienen en cuenta la totalidad de pacientes, la adición del análisis mutacional a la citología convencional constituye la estrategia más eficaz ya que el estudio molecular se realiza en una cantidad de material mínima y es muy sensible.

Además, hay que tener en cuenta que en este estudio los resultados de la citología son similares a los de las mejores series de la literatura lo que puede estar en relación con la presencia de un patólogo en la sala de exploración. De manera similar a lo observado en el estudio anterior, este hecho permite disminuir el número de muestras necesarias para el diagnóstico. Lo que se traduce en una estrategia más costo/eficaz y menor morbilidad. En caso de no disponer de patólogo es posible que la adición del análisis cito molecular pudiera ser aún de igual o mayor utilidad. Lo ideal en todo caso es contar con ambos profesionales. Por último, aporta una información de gran importancia para el cirujano, oncólogo y que es la posibilidad de detectar micrometástasis mediante estudio de metilación en el material obtenido por EUS-PAF.

Este enfoque es original y logra transportar los conocimientos adquiridos en el campo de la investigación básica al terreno de la asistencia clínica diaria. Aunque su verdadera implicación clínica no está aún bien establecida, las evidencias existentes hasta la fecha sugieren que la presencia de micrometástasis ganglionares puede conllevar un deterioro en el pronóstico de los pacientes neoplásicos.

Por ello, a pesar de que los resultados muestran que la adición del análisis molecular disminuye la especificidad en relación con la citopatología convencional, este



estudio ha permitido establecer por primera vez un nuevo campo de indicaciones para la EUS-PAF.

Hay que tener en cuenta que la Oncología tiende cada vez más a diseñar tratamientos individualizados para cada paciente, en base a, no tan sólo el estudio de extensión minucioso, sino también las características fenotípicas y genotípicas del tumor.

De esta forma, la información obtenida del ADN o ARN permite determinar con mayor exactitud la capacidad metastásica de un tumor o su resistencia a una determinada terapia. Esta información, obtenida a partir de las células metastásicas, puede también ser de utilidad para plantear el tratamiento neoadyuvante más eficaz.

En este sentido, los resultados demuestran que la EUS-PAF es una técnica excelente para la obtención del material necesario para emprender los estudios moleculares decisivos previos al tratamiento en los pacientes con neoplasias digestivas y micrometástasis.

Por todo ello, en su conjunto los resultados del presente Proyecto demuestran que la EUS-PAF es de gran utilidad para el diagnóstico y para la etapificación de los pacientes con neoplasias digestivas. Además, la posibilidad de aplicar los conocimientos adquiridos en biología molecular a la cabecera del paciente a través de una técnica endoscópica abre las puertas a nuevas aplicaciones clínicas de la endoscopia en el terreno de la Oncología.

De hecho, estos hallazgos se suman a la tendencia actual en el mundo de la Endoscopia y de la Oncología que pretende desarrollar nuevas aproximaciones capaces de detectar, in vivo, los cambios celulares morfológicos o fisiopatológicos relacionados con el proceso oncogénico. A la vez que los nuevos conocimientos en biología molecular permiten entender mejor la oncogénesis y de esta forma poder adoptar actitudes que ayuden a prevenir el cáncer, realizar diagnósticos precoces o diseñar tratamientos individualizados y más selectivos, estas nuevas técnicas endoscópicas podrían ser la herramienta que permitiera aplicar o verificar directamente estos conocimientos.

De esta forma, es posible imaginar en un futuro próximo una endoscopia mucho más próxima al anatomopatólogo, al oncólogo, al imageneólogo y a la luz de nuestros hallazgos, también al biólogo molecular que en cualquier caso tendría que revertir en una mejoría en el pronóstico de pacientes con neoplasias digestivas.



## CONCLUSIONES:

Los resultados obtenidos en los diferentes estudios que componen este Proyecto, permiten extraer las siguientes conclusiones:

1. El engrosamiento de las capas profundas de la pared gástrica (submucosa y/o muscular) es el único criterio endosonográfico independiente predictivo de malignidad en pacientes con pliegues gástricos engrosados y biopsias negativas.
2. Utilizando este criterio, la EUS es una técnica muy precisa y con un importante impacto clínico en el manejo de este grupo de pacientes.
3. En los pacientes referidos para EUS-PAF, esta técnica aumenta significativamente el porcentaje de diagnósticos correctos en cuanto a benignidad y malignidad con respecto a la EUS, en especial en adenopatías y lesiones quísticas.
4. La localización subserosa de la lesión es el único factor asociado a una mayor probabilidad de obtener un diagnóstico incorrecto. Por tanto resulta útil la utilización de la CLASIFICACION JAPONESA DE PROFUNDIDAD
5. La presencia de un patólogo en la sala de exploración aumenta el rendimiento de la EUS-PAF al reducir el número de pases necesarios para obtener un diagnóstico correcto y es una estrategia costo/eficaz.
6. Es posible efectuar el análisis mutacional del gen KRAS en el material obtenido por EUS-PAF, con una elevada rentabilidad.
7. La citología convencional es la estrategia más precisa para el diagnóstico del cáncer de páncreas, pudiendo el análisis molecular incrementar su rendimiento en los pocos casos en los que la primera no es diagnóstica.
8. Es posible detectar la presencia de micrometástasis ganglionares mediante determinación de patrones de metilación aberrante en material obtenido por EUS-PAF.



## BIBLIOGRAFÍA:

1. Erickson A, Sayage-Rabie L, Beissner S. Factors predicting the number of EUS-guided fine-needle passes for diagnosis of pancreatic malignancies. *Gastrointestinal Endosc* 2000; 51(2):184-190.
2. Wiersema M.J., Vilman P., Giovannini M, Chang K.J., Wiersema L.M. Endosonography-guided fine-needle aspiration biopsy: diagnostic accuracy and complication assessment. *Gastroenterology* 1997; 112:1087-1095.
3. Paquin SC, Chua TS, Tessier G, Gariépy G, Raymond G, Bourdages R, Sahai A. A first report of tumor seeding by EUS-FNA. *Gastrointestinal Endoscopy* 2004; 59:AB235 (Abstract).
4. Micames C, Jowell PS, White R, Paulson E, Nelson R, Morse M, Hurwitz H, Pappas T, Tyler D, McGrath K. Lower frequency of peritoneal carcinomatosis in patients with pancreatic cancer diagnosed by EUS-guided FNA vs. percutaneous FNA. *Gastrointest Endosc.* 2003 Nov; 58(5):690-5.
5. Reeder MM, Olmstead WW, Cooper PH. Large gastric folds, local or widespread. *JAMA* 1974; 230:273-4.
6. R. E. Mendis, H. Gerdes, C. J. Lightdale, J. F. Botet. Large gastric folds: a diagnostic approach using endoscopic ultrasonography. *Gastrointestinal Endoscopy* 1994; 40:437-442.
7. Caletti G, Fusaroli P, Togliani T, Bocus P, Roda E. Endosonography in gastric lymphoma and large gastric folds. *Eur J Ultrasound.* 2000 Mar; 11(1):31-40.
8. Songur Y, Okai T, Watanabe H, Motoo Y, Sawabu N. Endosonographic evaluation of giant gastric folds. *Gastrointest Endosc.* 1995 May; 41(5):468-74.
9. Tio TL. Large gastric folds evaluated by endoscopic ultrasonography. *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 1995 Jul; 5(3):683-91.
10. Taal BG, Peterse H, Boot H. Clinical presentation, endoscopic features, and treatment of gastric metastases from breast carcinoma. *Cancer.* 2000 Dec; 89(11):2214-21.
11. Wotherspoon AC, Ortiz-Hidalgo C, Falzon MR, Isaacson PG. Helicobacter pylori-associated gastritis and primary B-cell lymphoma. *Lancet* 1991; 338:1175-1176.
12. Bayerdörffer E, Neubauer A, Rudolph B, et al. Regression of primary gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after cure of Helicobacter pylori infection. *Lancet* 1995; 345:1591-1594.
13. Morgner A, Bayerdörffer E, Neubauer A, Thiede C, Lehn N, Seifert E, Chalybaus CI, Frevel M, Sommer A, Schulz H, Merkt J, Stolte M. Remission of primary gastric low-grade MALT lymphoma after cure of Helicobacter pylori infection. *Gastroenterology* 1997; 112:A618.
14. Caletti GC, Ferrari A, Brocchi E, Barbara L. Accuracy of endoscopic ultrasonography in the diagnosis and staging of gastric cancer and lymphoma. *Surgery* 1993; 113:14-27.
15. Sans M, Feu F, Bosch F, Campo E, Ginès A, Montserrat E, Piqué JM, Terés J. Regresión del linfoma gástrico tipo MALT de bajo grado después de la erradicación de Helicobacter pylori. *Gastroenterol Hepatol* 1997; 20:93. Borrás J, Galcerán J, Anglada LI. El cáncer a Tarragona 1980-1985. Estudio epidemiológico descriptivo. Tarragona: Associació Espanyola contra el Càncer, 1988.
16. Hoey J. Cancer of the pancreas: epidemiology and risk factors. *Gastroenterol Clin Biol* 1985; 9:765-766.
17. Cello JP. Carcinoma of the pancreas. En: Sleisenger MH, Fordtran JS, eds. *Gastrointestinal disease: pathophysiology, diagnosis and management*, 5th edition. WB Saunders, Philadelphia, 1993: 1682-1694.
18. Lillemo KD. Current management of pancreatic carcinoma. *Ann Surg* 1995; 221:133-148.



19. Bender GN, Case B, Tsuchida A, Timmons JH, Williard W, Lyons MF, Makuch R. Using sectorial endoluminal ultrasound to identify the normal pancreas when axial computed tomography is falsely positive. *Investigative radiology* 1999; 34:71-74.
20. Keriven-Souquet O, Souquet JC, Ponchon T, et al. Endoscopic ultrasound for the diagnosis of pancreatic cancer: prospective study in 52 patients with non informative abdominal ultrasound. *Gastrointest Endosc* 1995; 41:A519.
21. Rosch and M. Classen. *Gastroenterologic Endosonography. Textbook and Atlas.* Thieme Medical Publishers, Inc. New York, 1992. pp124-127.
22. Legmann P, Vignaux O, Dousset B, Baraza AJ, Palazzo L, Dumontier I, Coste J, Louvel A, Rouseau G, Coutier D, Bonnin A. pancreatic tumors: comparison of dualphase helical CT and endoscopic sonography. *Am J Roentgenol* 1998; 170 (5): 1315-22.
23. Midwinter MJ, Beveridge CJ, Wilsdon JB, Bennett MK, Bavdovin CJ, Charnley RM. Correlation between spiral computed tomography, endoscopic ultrasonography and findings at operation in pancreatic and ampullary tumours. *Br J Surg* 1999; 86 (2): 189-93.
24. Tierney WM, Francis IR, Eckhauser F, Elta G, Nostrant TT, Scheiman JM. The accuracy of EUS and helical CT in the assessment of vascular invasion by peripapillary malignancy. *Gastrointest Endosc* 2001; 53 (2): 182-8.
25. Mertz HR, Sechopoulos P, Delbeke D, Leach SD. EUS, PET, and CT scanning for evaluation of pancreatic adenocarcinoma. *Gastrointest Endosc* 2000; 52:367-371.
26. Suits J, Frazee R, Erickson RS. Endoscopic ultrasound and fine needle aspiration for the evaluation of pancreatic masses. *Arch Surg* 1999; 134:639-643.
27. Chang KJ, Nguyen P, Erickson RA, Durbin TE, Katz KD. The clinical utility of endoscopic ultrasound with fine-needle aspiration in the diagnosis and staging of pancreatic carcinoma. *Gastrointest Endosc* 1997; 45 (5):387-93.
28. Bhutani MS, Hawes RH, Baron PL, Sanders-Cliette A, Van Velse A, Osborne JF, et al. Endoscopic ultrasound guided fine needle aspiration of malignant pancreatic lesions. *Endoscopy* 1997; 29(9):854-8.
29. Williams DB, Sahai AV, Aabaken L, et al. Endoscopic ultrasound guided fine-needle aspiration biopsy: a large single centre experience. *Gut* 1999; 44: 720-726.
30. Gines A, Vázquez-Sequeiros E, Soria MT, Clain JE, Wiersema MJ. Usefulness of EUS-guided fine needle aspiration (EUS-FNA) in the diagnosis of functioning neuroendocrine tumors. *Gastrointest Endosc* 2002 Aug; 56(2):291-6
31. Tillou A, Schwatz MR, Jordan PH Jr. Percutaneous needle biopsy of the pancreas: when should it be performed? *World J Surg* 1996; 20(3): 283-6.
32. Harewood GC, Wiersema MJ. A cost analysis of endoscopic ultrasound in the evaluation of pancreatic head adenocarcinoma. *Am J of Gastroenterol* 2001; 96(9):2651-2656.
33. Bansal R, Tierney W, Carpenter S, Thompson N, Scheiman M. Cost effectiveness of EUS for preoperative localization of pancreatic endocrine tumors. *Gastrointest Endosc* 1999; 49:19-25.
34. Rösch T, Lorez M, Braig C, et al. Endoscopic ultrasound in pancreatic tumor diagnosis. *Gastrointest Endosc* 1991; 37: 347-352. Hernandez LV, Mishra G, Forsmark C, Draganov PV, Petersen JM, Hochwald SN, et al. Role of endoscopic ultrasound (EUS) and EUS-guided fine needle aspiration in the diagnosis and treatment of cystic lesions of the pancreas. *Pancreas* 2002 Oct; 25(3):222-8.
35. Brugge WR. The role of EUS in the diagnosis of cystic lesions of the pancreas. *Gastrointest Endosc* 2000; 52(6S):S18-22.



36. Brugge WR, Lewandrowski K, Lee-Lewandrowski E, Centeno BA, Szydlo T, Regan S, del Castillo CF, Warsaw AL. Diagnosis of pancreatic cystic neoplasms: a report of the cooperative pancreatic cyst study. *Gastroenterology*. 2004 May; 126(5):1330-6.
37. Roth JA, Lichter AS, Putnam JB, Forastiere AA. Cancer of the esophagus. En: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. *Cancer: principles and practice of oncology*, 4th edition. JB Lippincott, Philadelphia, 1993:776-817.
38. Pera M. Epidemiology of esophageal cancer, especially adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction. *Recent Results Cancer Res* 2000; 155:1-14.
39. Siewert JR, Fink U, Beckurts KTE, Roder JD. Surgery of squamous cell carcinoma of the esophagus. *Ann. Oncol.* 1994; 5:1.
40. Roder JD, Busch R, Stein HJ, Siewert JR. Ratio of invaded to removed lymph nodes as a predictor of survival in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Br. J. Surg.* 1994; 81:410.
41. Fleming ID, Cooper JS, Henson DE, et al. In: *AJCC Cancer Staging Manual*. Lippincott-Raven (Eds), Philadelphia, 1997. P. Edwards JM, Hillier VF, Lawson RAM, et al. Squamous carcinoma of the esophagus: histological criteria and their prognostic significance. *Br. J. Cancer* 1989; 59:429.
42. O'Sullivan GC, Sheehan D, Clarke A, et al. Micrometastases in esophagogastric cancer: high detection rate in resected rib segments. *Gastroenterology* 1999; 116:543-8.
43. Walsh TN, Noonan N, Hollywood D, Kelly A, Keeling N, Hennessy TPJ. A comparison of multimodal therapy and surgery for esophageal adenocarcinoma. *N Engl J Med* 1996; 335:462-7. 179
44. Bosset JF, Gignoux M, Triboulet JP, et al. Chemoradiotherapy followed by surgery compared with surgery alone in squamous-cell cancer of the esophagus. *N Engl J Med* 1997; 337:161-7.
45. Ruol A and Panel of Experts. Multimodality treatment for non-metastatic cancer of the thoracic esophagus. Results of a Consensus Conference. *Dis Esophagus* 1995; 9:501-8.
46. Murata Y, Suzuki S, Hashimoto H. endoscopic ultrasonography of the upper gastrointestinal tract. *Surg Endosc.* 1988;2:180-183.
47. 50. Tio TL, Coene P.P.L.o, den Hartog Jager F.C.A, Tytgat G.N.J. Preoperative TNM classification of esophageal carcinoma by endosonography. *Hepatogastroenterol.* 1990; 37:376-381.
48. Vilgrain V, Mompion D, Palazzo L, Menu Y, Gayet B, Ollier P, Nahum H, Fakete F. Staging of esophageal carcinoma: comparison of results with endoscopic sonography and CT. *American Journal of Radiology.* 1991; 155:277-281. 52. Botet J F, Lightdale C.J.A, Zauber G, Gerdes H, Urmacher C, Brennan M.F. Preoperative staging of esophageal cancer: Comparison of endoscopic US and dynamic CT. *Radiology* 1991; 181:419-425.
49. Grimm H, Binmoeller KF, Hamper K, Koch J, Henne-Burns D, Soehendra N. Endosonography for preoperative locoregional staging of esophageal and gastric cancer. *Endoscopy* 1993; 25(2):224-30.
50. Kelly S, Harris K, Berry E, Hutton J, Roderick P, Cullingworth J, et al. A systematic review of the staging performance of endoscopic ultrasound in gastroesophageal carcinoma. *Gut* 2001;49:534-9.
51. Vazquez-Sequeiros E, Wiersema MJ, Clain JE, Norton ID, Levy MJ, Romero Y, Salomao D, Dierkhising R, Zinsmeister AR. Impact of lymph node staging on therapy of esophageal carcinoma. *Gastroenterology*. 2003 Dec; 125(6):1626-35.
52. Catalano MF, Sivak MV Jr, Rice T, et al. Endosonography features predictive of lymph node metastasis. *Gastrointest. Endosc.* 1994; 40:442.



53. Buthani MS, Hawes RH, Hoffman BJ. A comparison of the accuracy of echo features during endoscopic ultrasound (EUS) and EUS-guided fine needle aspiration for diagnosis of malignant lymph node invasion. *Gastrointest Endosc* 1997; 45:47 4-9. 180
54. Giovannini M., Seitz JF., Monges G, Perrier H, Rabbia I. fine-needle aspiration cytology guided by endoscopic ultrasonography: results in 141 patients. *Endoscopy* 1995;27: 171-177.
55. Vazquez-Sequeiros E, Norton ID, Clain JE, Wang KK, Affi A, Allen M, Deschamps C, Miller D, Salamao D, Wiersema MJ. Impact of endosonography guided fine needle aspiration biopsy (EUS-FNA) on lymph node staging in patients with esophageal carcinoma. *Gastrointest. Endosc.* 2001; 53(7):751-7.
56. Harewood GC, Wiersema J. A cost analysis of endoscopic ultrasound in the evaluation of esophageal cancer. *Am J of Gastroenterol* 2002; 97:452-458.
57. Siewert JR, Fink U, Sendler A, et al. Gastric cancer. *Curr Probl Surg* 1997; 34:835-942.
58. Pratt BL, Greene FL. Role of laparoscopy in the staging of malignant disease. *Surg Clin North Am* 2000; 80: 1111-26.
59. Fink U, Stein HJ, Schuhmacher C, et al. Neoadjuvant chemotherapy for gastric cancer: Update. *World J Surg* 1995; 19:509-516.
60. Botet JF, Lightdale CJ, Zaubler AG, Gerdes H, Winaver SJ, Urmacher C, Brennan MF. Preoperative staging of gastric cancer: comparison of endoscopic US and dynamic CT. *Radiology* 1991; 181: 426-32.
61. Grimm H, Hamper K, Maydeo A, Maas R, Noar M, Soehendra N. Accuracy of endoscopic ultrasound and computed tomography in determining local/regional spread in gastric cancer: results of a prospective controlled study. *Gastrointest Endosc* 1991; 37: 229.
62. Akahoshi K, Misawa T, Fujishima H, Chijiwa Y, Maruoka A, Ohkubo A, Nawata H. Preoperative evaluation of gastric cancer by endoscopic ultrasound. *Gut* 1991; 32: 479-82.
63. R.Fuenmayor, G.Fernández-Esparrach, A.Ginès, A.Seoane, MT.Soria, M.Pellisé, FJ.García, J.Llach, JM.Bordas, JM.Piqué. Significado clínico de la presencia de ascitis mínima detectada por ultrasonografía endoscópica (USE) y no visualizada por tomografía axial computarizada (TC) en la patología neoplásica abdominal. *Gastroenterol Hepatol* 2002; 25:124.
64. Castells A, Kroser J, Rustgi AK. Gastrointestinal neoplasms. En: Beers MH, Berkow R, eds. *The Merck Manual of Geriatrics*. 3rd ed. Merck & Co., West Point, 2000: 1134-1153. 181
65. Castells A, Piqué JM. Tumores intestinales. En: Farreras V, Rozman C, eds. *Medicina Interna*. 14ª ed. Harcourt, Madrid, 2000: 261-272.
66. Frykholm GJ, Grimelius B, Pahlman L. Preoperative or postoperative irradiation in adenocarcinoma of the rectum: final treatment results of a randomized trial and an evaluation of late secondary effects. *Dis Colon Rectum* 1993; 36: 564- 572.
67. Gerard A, Buyse M, Nordlinger B, et al. Preoperative radiotherapy as adjuvant treatment in rectal cancer: final results of a randomized study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Ann Surg* 1988; 208:606-14.
68. Horn A, Halvorsen JF, Dhal O. Preoperative radiotherapy in operable rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1990; 33:823-828. 73. Swedish Rectal Cancer Trial. Improved survival with preoperative radiotherapy in resectable rectal cancer. *N Engl J Med* 1997; 336:980-987.
69. Beynon J, McC.Mortensen NJ, Rigby HS. Rectal endosonography, a new technique for the preoperative staging of rectal carcinoma. *Eur J surg Oncol* 1988; 14:297-309.



70. Hildebrandt U, Feifel G. Preoperative staging of rectal cancer by intrarectal ultrasound. *Dis Colon Rectum* 1985; 28: 42-46.
71. Glaser F, Schlag P, Herfarth C. Endorectal ultrasonography for the assessment of the invasion of rectal tumors and lymph node involvement. *Br J Surg* 1990; 77: 883-87.
72. Goldman S, Arvidsson H, Norming U, Lagerstedt U, Magnuson I, Frisell J. Transrectal ultrasound and computed tomography in the preoperative staging of lower rectal adenocarcinoma *Gastrointest Radiol* 1991; 16: 259-63.
73. Rifkin MD, Ehrlich SM, Marks G. Staging of rectal carcinoma: prospective comparison of endorectal US and CT. *Radiology* 1989; 170: 319-22.
74. Hawes RH. New staging techniques. Endoscopic ultrasound. *Cancer*. 1993 Jun 15; 71(12 Suppl):4207-13.
75. Hulsmans FJ, Tio TL, Fockens P, Bosma A, Tytgat GN. Assessment of tumor infiltration depth in rectal cancer with transrectal sonography: caution is necessary. *Radiology*. 1994 Mar; 190(3): 715-20.
76. Herzog U, von Flue M, Tondelli P, Schuppisser JP. How accurate is endorectal ultrasound in the preoperative staging of rectal cancer? *Dis Colon Rectum*. 1993 Feb; 36(2): 127-34.
77. Beynon J, McC.Mortensen NJ, Foy DMA, Channer JL, Rigb H, Virjee J. Preoperative assessment of mesorectal lymph node involvement in rectal cancer. *Br J Surg* 1989; 76: 276-79.
78. Guinet C, Buy JN, Ghossain MA, Sezeur A, Mallet A, Bigot JM, Vadrot D, Ecoiffier J. Comparison of magnetic resonance imaging and computed tomography in the preoperative staging of rectal cancer. *Arch Surg*. 1990 Mar; 125(3):385-8.
79. Meyenberger C, Huch Boni RA, Bertschinger P, Zala GF, Klotz HP, Krestin GP. Endoscopic ultrasound and endorectal magnetic resonance imaging: a prospective, comparative study for preoperative staging and follow-up of rectal cancer. *Endoscopy*. 1995 Sep; 27(7):469-79.
80. Harewood GC, Wiersema MJ, Nelson H, Maccarty RL, Olson JE, Clain JE, Ahlquist DA, Jondal ML. A prospective, blinded assessment of the impact of preoperative staging on the management of rectal cancer. *Gastroenterology*. 2002 Jul; 123(1):24-32.
81. Harewood GC. Assessment of clinical impact of endoscopic ultrasound on rectal cancer. *Am J Gastroenterol*. 2004 Apr; 99(4):623-7.
82. Harewood GC, Wiersema MJ. Cost-effectiveness of endoscopic ultrasonography in the evaluation of proximal rectal cancer. *Am J Gastroenterol*. 2002 Apr; 97(4):874-82.
83. Hoffman PC, Mauer AM, Vokes EE. Lung cancer. *The Lancet* 2000; 355:479-485.
84. Mountain CF. Revisions in the International System for staging lung cancer. *Chest* 1997; 11: 1710-1717.
85. Disdier C, Varela G, Sanchez de Cos J, et al. Usefulness of transbronchial puncture and mediastinoscopy in mediastinal nodal staging of non-microcytic bronchogenic carcinoma. Preliminary study. *Arch. Broncopneumol* 1998; 34:237- 244.
86. Wang KP, Brower R, Haponik EF, et al. Flexible transbronchial needle aspiration for staging of bronchogenic carcinoma. *Chest* 1983; 84:571-576.
87. Reichenberger F, Weber J, Tamm M, et al. The value of transbronchial needle aspiration in the diagnosis of peripheral pulmonary lesions. *Chest* 1999; 116(3):704-708.



88. Gdeedo A, Van Schild P, Corthouts B, et al. Prospective evaluation of computed tomography and mediastinoscopy in mediastinal lymph node staging. *Eur Resp J* 1997;10: 1688-95.
89. Funatsu T, Matsubara Y, Hatakenaka R, et al. The role of mediastinoscopy biopsy in preoperative assessment of lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992; 104:1688-95.
90. Gress FG, Savides TJ, Sandler A, et al. Fine-needle aspiration biopsy guided by endoscopic ultrasonography and computed tomography in the preoperative staging of non-small-cell lung cancer. A comparison study. *Ann Int Med* 1997;8:604-612.
91. Fritscher-Ravens A, Soehendra N, Schirrow L, et al. Role of transesophageal endosonography-guided fine-needle aspiration in the diagnosis of lung cancer. *Chest* 2000;117: 339-345.
92. Kondo D, Imaizumi M, Abe T, et al. Endoscopic ultrasound examination for mediastinal lymph node metastases of lung cancer. *Chest* 1998;3:586-593.
93. Fritscher-Ravens A, Petrasch S, Reinacher-Schick A, et al. Diagnostic value of endoscopic ultrasonography-guided fine-needle aspiration cytology of mediastinal masses in patients with intrapulmonary lesions and nondiagnostic bronchoscopy. *Respiration* 1999;66:150-155.
94. Silvestri GA, Hoffman BJ, Bhutani MS, et al. Endoscopic ultrasound with fineneedle aspiration in the diagnosis and staging of lung cancer. *Ann Thorac Surg* 1996;61:1441-6.
95. Hünnerbein M, Ghadami BM, Haensch W, Schag PM. Transesophageal biopsy of mediastinal and pulmonary tumors by means of endoscopic ultrasound guidance. *The journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 1998; 116:554- 559.
96. Wallace MB, Silvestri GA, Sahai AV, Hawes RH, Hoffman BJ, Durkalski V, Hennesey WS, Reed CE. Endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration for staging patients with carcinoma of the lung. *Ann Thorac Surg*. 2001 Dec;72(6):1861-7.
97. Aabaken L, Silvestri GA, Hawes R, Reed CE, Marsi V, hoffman B. Costefficiency f endoscopic ultrasonography with fine-needle aspiration vs. Mediastinostomy in patients with lung cancer and suspected mediastinal adenopathy. *Endoscopy* 1999;31(9):707-711.
98. Fritscher-Ravens A. Endoscopic ultrasound evaluation in the diagnosis and staging of lung cancer. *Lung Cancer*. 2003 Sep;41(3):259-67. Review
99. Wallace MB, Ravenel J, Block MI, Fraig M, Silvestri G, Wildi S, Schmulewitz N, Varadarajulu S, Roberts S, Hoffman BJ, Hawes RH, Reed CE. Endoscopio ultrasound in lung cancer patients with a normal mediastinum on computed tomography. *Ann Thorac Surg*. 2004 May;77(5):1763-8.
100. Schmulewitz N, Wildi SM, Varadarajulu S, Roberts S, Hawes RH, Hoffman BJ, Durkalski V, Silvestri GA, Block MI, Reed C, Wallace MB. Accuracy of EUS criteria and primary tumor site for identification of mediastinal lymph node metastasis from non-small-cell lung cancer. *Gastrointest Endosc*. 2004 Feb; 59(2):205-12.
101. Pantel K, Izbicki J, Passlick B, Angstwurm M, Haussinger K, Thetter O, Riethmuller G. Frequency and prognostic significance of isolated tumor cells in bone marrow of patients with non-small-cell lung cancer without overt metastases. *Lancet* 1996; 347:649-653.
102. Tada M, Omata M, Ohto M. Clinical application of ras gene mutations for diagnosis of pancreatic adenocarcinoma. *Gastroenterology* 1991;100:233-8.
103. Berthelemy P, Buisson M, Escourrou J, Vaysse N, Rumeau JL, Pradayrol L. Identification of K-ras mutations in pancreatic juice in the early diagnosis of pancreatic cancer. *Ann Intern Med* 1995; 123:188-91.



104. Boadas J, Mora J, Urgell E, et al. Clinical usefulness of K-ras gene mutation detection and cytology in pancreatic juice in the diagnosis and screening of pancreatic cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 1153-9.
105. Shibata S, Almoguera C, Forrester K, et al. Detection of c-K-ras mutations in fine needle aspirates from human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 1990; 50: 1279-83.
106. Villanueva A, Reyes G, Cuatrecasas M, et al. Diagnostic utility of K-ras mutations in fine-needle aspirates of pancreatic masses. *Gastroenterology* 1996; 110: 1587-94.
107. Mora J, Puig P, Boadas J, et al. K-ras gene mutations in the diagnosis of fine needle aspirates of pancreatic masses: prospective study using two techniques with different detection limits. *Clin Chem* 1998; 44: 2243-8.
108. Z'graggen K, Rivera JA, Compton CC, et al. Prevalence of activating K-ras mutations in the evolutionary stages of neoplasia in intraductal papillary mucinous tumors of the pancreas. *Ann Surg* 1997; 226: 491-500.
109. Tada M, Ohashi M, Shiratori Y, et al. Analysis of K-ras gene mutation in hyperplastic duct cells of the pancreas without pancreatic diseases. *Gastroenterology* 1996; 110: 227-31.
110. Yanagisawa A, Ohtake K, Ohashi K, et al. Frequent Ki-ras oncogene activation in mucous cell hyperplasia of pancreas suffering from chronic inflammation. *Cancer Res* 1993; 53: 953-6.
111. Trumper L, Menges M, Daus H, et al. Low sensitivity of the ki-ras polymerase chain reaction for diagnosing pancreatic cancer from pancreatic juice and bile: a multicenter prospective trial. *J Clin Oncol* 2002; 21: 4331-7.
112. Bos JL. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1988; 49: 4682-9
113. Gusterson B, Ott R. Occult axillary lymph-node micrometastases in breast cancer. *Lancet* 1990; 336: 434-435.
114. Ghossein RA, Bhattacharya S, Rosai J. Molecular detection of micrometastases and circulating tumor cells in solid tumors. *Clin Cancer Res*. 1999 Aug; 5(8): 1950-60.
115. Braun S, Pantel K, Müller P, Janni W, Hepp F, Kantenich CRM, Gastroph S, Wischnik A, Dimpfl T, Kindermann G, Riethmüller G, Schlimok G. Cytokeratin positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med* 2000; 342: 525-533.
116. Matsuda J, Kitagawa Y, Fujii H, Mukai M, Dan K, Kubota T, Watanabe M, Ozawa S, Otani Y, Hasegawa H, Shimizu Y, Kumai K, Kubo A, Kitajima M. Significance of metastasis detected by molecular techniques in sentinel nodes of patients with gastrointestinal cancer. *Ann Surg Oncol*. 2004 Mar; 11(3 Suppl): 250S-4S.
117. Jiao X, Krasna MJ. Clinical significance of micrometastasis in lung and esophageal cancer: a new paradigm in thoracic oncology. *Ann Thorac Surg*. 2002 Jul; 74(1): 278-84. Review
118. Jauch KW, Heiss MM, Gruetzner U, Funke I, Pantel K, Babic R, Eissner HJ, Riethmueller G, Schildberg FW. Prognostic significance of bone marrow micrometastases in patients with gastric cancer. *J Clin Oncol* 1996; 14: 1810- 1817.
119. Ajisaka H, Miwa K. Micrometastases in sentinel nodes of gastric cancer. *Br J Cancer*. 2003 Aug 18; 89(4): 676-80
120. Sanchez-Cespedes, M., Esteller, M., Hibi, K., Cope, F. O., Westra, W. H.,
121. Piantadosi, S., Herman, J. G., Jen, J., and Sidransky, D. Molecular detection of neoplastic cells in lymph nodes of metastatic colorectal cancer patients predicts recurrence. *Clin Cancer Res*, 5: 2450-2454., 1999
122. Lindemann F, Schlimok G, Dirschedl P, Witte J, Riethmüller G. Prognostic significance of micrometastatic tumour cells in bone marrow of colorectal cancer patients. *Lancet* 1992; 340: 685-689.



123. Soeth E, Roder C, Juhl H, Kruger U, Kremer B, Kalthoff H. The detection of disseminated tumor cells in bone marrow from colorectal cancer patients by a cytokeratin-20-specific nested reverse transcriptase-polymerase-chain reaction is related to the stage of disease. *Int J Cancer* 1996; 69:278-282.
124. Liefers GJ, Cleton-Jansen AM, Van de Velde CJH, Hermans J, Van Krieken J, Cornelisse CJ, Tollerman R. Micrometastases and survival in stage II colorectal cancer. *N Engl J Med* 1998; 339:223-228.
125. Maruyama R, Sugio K, Mitsudomi T, Saitoh G, Ishida T, Sugimachi K. Relationship between early recurrence and micrometastases in the lymph nodes of patients with stage I non-small-cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 114: 535-543., 1997.
126. Ahrendt, S. A., Hu, Y., Buta, M., McDermott, M. P., Benoit, N., Yang, S. C., Wu, L., and Sidransky, D. p53 mutations and survival in stage I non-small-cell lung cancer: results of a prospective study. *J Natl Cancer Inst*, 95: 961-970., 2003.
127. Hashimoto, T., Kobayashi, Y., Ishikawa, Y., Tsuchiya, S., Okumura, S., Nakagawa, K., Tokuchi, Y., Hayashi, M., Nishida, K., Hayashi, S., Hayashi, J., and Tsuchiya, E. Prognostic value of genetically diagnosed lymph node micrometastasis in non-small cell lung carcinoma cases. *Cancer Res*, 60: 6472-6478., 2000.
128. Bessa, X., Elizalde, J. I., Boix, L., Pinol, V., Lacy, A. M., Salo, J., Pique, J. M., and Castells, A. Lack of prognostic influence of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with colorectal cancer. *Gastroenterology*, 120: 1084- 1092., 2001.
129. Bessa, X., Pinol, V., Castellvi-Bel, S., Piazuolo, E., Lacy, A. M., Elizalde, J. I., Pique, J. M., and Castells, A. Prognostic value of postoperative detection of blood circulating tumor cells in patients with colorectal cancer operated on for cure. *Ann Surg*, 237: 368-375., 2003.
130. Castells, A., Boix, L., Bessa, X., Gargallo, L., and Pique, J. M. Detection of colonic cells in peripheral blood of colorectal cancer patients by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Br J Cancer*, 78: 1368- 1372., 1998.
131. Castells, A., Puig, P., Mora, J., Boadas, J., Boix, L., Urgell, E., Sole, M., Capella, G., Lluís, F., Fernandez-Cruz, L., Navarro, S., and Farre, A. K-ras mutations in DNA extracted from the plasma of patients with pancreatic carcinoma: diagnostic utility and prognostic significance. *J Clin Oncol*, 17: 578- 584., 1999.
132. Ehrlich M. DNA hypomethylation and cancer. In: *DNA alterations in cancer: genetic and epigenetic changes*. Edited by Melanie Ehrlich, Eaton Publishing, Natick, Pages 273-291, 2000.
133. Esteller M, Fraga MF, Guo M, et al. DNA methylation patterns in hereditary human cancer mimics sporadic tumorigenesis. *Hum Mol Genet*, 2001;10,3001-7.
134. Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 1986; 321: 209-13.
135. Wajed, S. A., Laird, P. W., and DeMeester, T. R. DNA methylation: an alternative pathway to cancer. *Ann Surg*, 234: 10-20., 2001.
136. Esteller, M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene*, 21: 5427-5440., 2002.
137. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*. 2003; 349(21):2042-54.
138. Esteller, M., Corn, P.G., Baylin, S.B., et al. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res*, 2001; 61: 3225-3229.
139. Fraga MF, Esteller M. DNA Methylation: a profile of methods and applications. *Biotechniques* 2002; 33: 632-49, 2002.



140. Herman JG, Graff JR, Myohanen S., et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996; Sep 93:9821-6.
141. Ahrendt SA, Chow JT, Xu L, Yang SC, et al. Molecular detection of tumor cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with early stage lung cancer. J Nat Cancer Inst 1999; 91: 332-9.
142. Sanchez-Cespedes M, Esteller M, Hibi K, et al. Molecular detection of neoplastic cells in lymph nodes of metastatic colorectal cancer patients predicts recurrence. Clin Cancer Res 1999; 5: 2450-4.
143. Palmisano WA, Divine KK, Saccomanno G, et al. Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. Cancer Res. 2000; 60:5954-8.
144. Cairns P, Esteller M, Herman JG, et al. Molecular detection of prostate cancer in urine by GSTP1 hypermethylation. Clin Cancer Res, 2001; 7: 2727-30.
145. Evron E, Dooley WC, Umbricht CB, et al. Detection of breast cancer cells in ductal lavage fluid by methylation-specific PCR. Lancet 2001; 357:1335-6.
146. Rosas SL, Koch W, da Costa Carvalho MG, et al. Promoter hypermethylation patterns of p16, O6-methylguanine-DNA-methyltransferase, and death-associated protein kinase in tumors and saliva of head and neck cancer patients. Cancer Res. 2001; 61:939-42.
147. Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, et al. Detection of aberrant promoter methylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. Cancer Res. 1999; 59: 67-70.
148. Grady WM, Rajput A, Lutterbaugh JD, et al. Detection of aberrantly methylated hMLH1 promoter DNA in the serum of patients with microsatellite unstable colon cancer. Cancer Res. 2001; 61:900-2.
149. Tada M, Omata M, Ohto M. Clinical application of ras gene mutations for diagnosis of pancreatic adenocarcinoma. Gastroenterology 1991; 100:233-8.
150. Wallace, M. B., Block, M., Hoffman, B. J., Hawes, R. H., Silvestri, G., Reed, C. E., Mitas, M., Ravenel, J., Fraig, M., Miller, S., Jones, E. T., and Boylan, A. Detection of telomerase expression in mediastinal lymph nodes of patients with lung cancer. Am J Respir Crit Care Med, 167: 1670-1675. 2003.

## COMUNICACIONES A CONGRESOS:

[1. Correlación genotípica de MALT gástricos en correlación con la clínica y la profundidad de invasión bajo análisis EUS](#)

[2. Importancia de la EUS para el diagnóstico diferencial de pancreatitis crónica y cáncer pancreático.](#)