

Tesis Doctoral  
Facultat de Medicina



**UTILIDAD DE LA ULTRASONOGRAFÍA ENDOSCÓPICA Y DE LA  
PUNCIÓN GUIADA POR ULTRASONOGRAFÍA ENDOSCÓPICA EN  
EL DIAGNÓSTICO Y ESTADIFICACIÓN DE PACIENTES CON  
NEOPLASIAS DIGESTIVAS Y PULMONARES**

Tesis presentada por Maria Pellisé Urquiza para optar al grado de  
Doctor en Medicina

Directores:

Àngels Ginès i Gibert

Antoni Castells i Garangou

Barcelona, Marzo de 2005



## **AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS**

**DRA ÀNGELS GINÈS I GIBERT, MÉDICO CONSULTOR DEL SERVICIO DE  
GASTROENTEROLOGÍA DEL HOSPITAL CLÍNIC DE BARCELONA,**

### **CERTIFICA:**

**Que la memoria que lleva por título “Utilidad de la ultrasonografía endoscópica y de la punción guiada por ultrasonografía endoscópica en el diagnóstico y estadificación de pacientes con neoplasias digestivas y pulmonares”, presentada por Maria Pellisé Urquiza para optar al grado de Doctor en Medicina, ha sido realizada bajo mi dirección. Una vez finalizada, autorizo su presentación para ser juzgada por el tribunal correspondiente.**

**Y para que quede constancia a los efectos oportunos, firmo la presente en Barcelona a marzo 2005.**

**Dra. Àngels Ginès i Gibert**



## **AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS**

**D. ANTONI CASTELLS I GARANGOU, MÉDICO CONSULTOR DEL SERVICIO DE GASTROENTEROLOGÍA DEL HOSPITAL CLÍNIC DE BARCELONA,**

### **CERTIFICA:**

**Que la memoria que lleva por título “Utilidad de la ultrasonografía endoscópica y de la punción guiada por ultrasonografía endoscópica en el diagnóstico y estadificación de pacientes con neoplasias digestivas y pulmonares”, presentada por Maria Pellisé Urquiza para optar al grado de Doctor en Medicina, ha sido realizada bajo mi dirección. Una vez finalizada, autorizo su presentación para ser juzgada por el tribunal correspondiente.**

**Y para que quede constancia a los efectos oportunos, firmo la presente en Barcelona a marzo 2005.**

**Dr. Antoni Castells i Garangou**



Dedicada a mis padres y a mis hermanos, por lo bien que me lo han hecho pasar y lo mucho que he aprendido con ellos.





## ÍNDICE

---



<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>13</b>
<b>PRESENTACIÓN</b>	<b>17</b>
<b>AYUDAS AL GRUPO DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>19</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>21</b>
<b>ANTECEDENTES DEL TEMA</b>	<b>23</b>
<b>1. CARACTERÍSTICAS DE LA ULTRASONOGRAFÍA ENDOSCÓPICA Y PUNCIÓN GUIADA POR ULTRASONOGRAFÍA ENDOSCÓPICA</b>	<b>25</b>
<b>1.1 Ultrasonografía endoscópica</b>	<b>25</b>
1.1.1 <i>Generalidades</i>	25
1.1.2 <i>Técnica</i>	27
1.1.3 <i>Limitaciones</i>	28
1.1.4 <i>Complicaciones</i>	29
<b>1.2 Punción guiada por ultrasonografía endoscópica</b>	<b>29</b>
1.2.1 <i>Técnica</i>	30
1.2.2 <i>Rentabilidad</i>	32
1.2.3 <i>Limitaciones</i>	32
1.2.4 <i>Complicaciones</i>	33
<b>2. UTILIDAD DE LA ULTRASONOGRAFÍA ENDOSCÓPICA Y PUNCIÓN GUIADA POR ULTRASONOGRAFÍA ENDOSCÓPICA</b>	<b>34</b>
<b>2.1 Linitis plástica y diagnóstico diferencial con otras enfermedades que causan pliegues gástricos engrosados</b>	<b>35</b>
2.1.1 <i>Linitis plástica</i>	36
2.1.2 <i>Linfoma MALT</i>	36
2.1.3 <i>Patología benigna</i>	37
<b>2.2 Neoplasia de páncreas</b>	<b>38</b>
2.2.1 <i>Adenocarcinoma de páncreas</i>	38
2.2.2 <i>Tumores neuroendocrinos</i>	42
2.2.3 <i>Lesiones quísticas</i>	44
<b>2.3 Cáncer de esófago</b>	<b>45</b>
<b>2.4 Cáncer de estómago</b>	<b>48</b>
<b>2.5 Cáncer de recto</b>	<b>50</b>
<b>2.6 Cáncer de pulmón de célula no pequeña</b>	<b>53</b>
<b>3. UTILIDAD DE LOS MARCADORES MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER</b>	<b>56</b>
<b>3.1 Concepto y generalidades</b>	<b>56</b>
<b>3.2 Marcadores moleculares en el cáncer de páncreas</b>	<b>57</b>
<b>3.3 Micrometástasis ganglionares en neoplasmas digestivas y pulmonares</b>	<b>60</b>

<b>3.4 Metilación aberrante como marcador molecular de micrometástasis ganglionares</b>	<b>61</b>
<b>3.5 Contribución de la USE-PAAF en el diagnóstico molecular de las neoplasias y en la detección de micrometástasis ganglionares</b>	<b>65</b>
<b>JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS</b>	<b>67</b>
Justificación al estudio 1	70
Justificación al estudio 2	71
Justificación al estudio 3	72
Justificación al estudio 4	74
<b>OBJETIVOS</b>	<b>77</b>
<b>COMUNICACIONES A CONGRESOS</b>	<b>81</b>
<b>PUBLICACIONES ORIGINALES</b>	<b>85</b>
Artículo 1	89
Artículo 2	113
Artículo 3	141
Artículo 4	153
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>161</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>169</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>173</b>

## **AGRADECIMIENTOS**

---



A Àngels, por haberme transmitido su entusiasmo por la ecoendoscòpia y haberme enseñado a trabajar de forma meticulosa y rigurosa. Su apoyo y confianza han sido cruciales para mi formación como especialista.

A Toni, por ser la persona que ha hecho posible esta tesis doctoral. Su sentido práctico para afrontar los problemas, buen talante, inmensa capacidad de trabajo y como no, su "*optimismo patológico*", son para mi, un punto de referencia permanente.

A Josep María Piqué que con su criterio crítico y sobretodo su "*tarannà*" de innovación y progreso, es un estímulo permanente.

A Josep Maria Bordas por su calidad humana, integridad y honradez que son para mi un ejemplo a seguir.

Al resto de mis compañeros de endoscopia, Josep Llach, Glòria Fernández, Alfredo Mata y Fernando Mondelo con los que comparto mi día a día y mucho más. Es un verdadero placer haberlos conocido y poder trabajar con ellos.

A Manel Solé y sus colegas patólogos cuyo entusiasmo por el trabajo es contagioso y por su paciencia en mis primeros pinitos como ecoendoscopista.

A Salvador Navarro, que tan generosamente me ha acogido en su despacho. Sin su amistad, sus consejos y nuestras grandes conversaciones no sería lo mismo.

A mis compañeros del Servicio de Gastroenterología Ignasi Elizalde, mi mentor, Faust Feu, Julià Panés y Micky por su amistad y enseñanzas.

A mis compañeros de residencia y resistencia, y en especial a Dara de la Heras, Eva Martínez, Mireia Peñalva, Alex Blasco y Juan González-Abraldes con las que he tenido la suerte de poder compartir unos años maravillosos.

A mis compañeros de becaria Antonio Soriano, Virginia Piñol, Ana Adet y Francisco Rodríguez que me han soportado y escuchado en los buenos y malos momentos.

A los compañeros del laboratorio, Sergi Castellví, Meritxell Gironella, Ximo y Felix. Su hospitalidad y paciencia han sido imprescindibles para poder sacar adelante este trabajo.

A todo el personal del Institut de Malalties Digestives i Metabòliques pero en especial al equipo de enfermería de endoscopia, y a las secretarías de endoscopia y gastroenterología que ya forman parte de mi familia.

A mis padres. Ellos me han inculcado la curiosidad por aprender y me han dado las armas para poder hacerlo.

A mis hermanos que me han dado todo el amor y alegría para poder disfrutar de la vida.

A Jose que en estos momentos es mi mayor ilusión.

Y, como no, a los pacientes por quienes cualquier esfuerzo vale la pena.

A todos, muchas gracias.



## **PRESENTACIÓN**

La presente Tesis Doctoral está estructurada siguiendo las directrices de la normativa para la presentación de tesis doctorales como un compendio de publicaciones, aprobada por el Consell del Departament de Medicina de la Universitat de Barcelona el 17 de mayo de 1997.

Los estudios que conforman esta Tesis Doctoral pertenecen a una misma línea de investigación, dirigida a analizar la utilidad de la ultrasonografía endoscópica y punción con aguja fina guiada por ultrasonografía endoscópica para el diagnóstico y la estadificación de las neoplasias digestivas y pulmonares. Los resultados de estos estudios han aportado información relevante y novedosa en este campo y han sido recogidos en 4 artículos originales, dos de ellos publicados en revistas de amplia difusión internacional con un factor de impacto global de 10,04 puntos.



## AYUDAS PERSONALES Y AYUDAS AL GRUPO DE INVESTIGACIÓN

Los trabajos que constituyen la base de la presente Tesis Doctoral han sido efectuados con el soporte de las siguientes ayudas personales y al grupo de investigación:

- Beca del Hospital Clínic de Barcelona por el Proyecto de Investigación “Diagnóstico molecular de las neoplasias digestivas mediante citología obtenida por punción aspirativa guiada por ultrasonografía endoscópica “. Años 2001-2002.
- Beca de la Agència d’Avaluació de Tecnologia Mèdica (026/16/2000) por el proyecto titulado “Detección de micrometástasis en el diagnóstico de extensión de las neoplasias de origen digestivo”. Años 2001-2004.
- Red nacional de Investigación en Hepatología y Gastroenterología (C03/02) del Instituto de Salud Carlos III.
- Red temática de Investigación Cooperativa de Centros de Cáncer (C03/10066) del Instituto de Salud Carlos
- Beca del Instituto de Salud Carlos III sobre evaluación de tecnologías sanitarias (Ministerio de Sanidad y Consumo): “Impacto de la punción aspirativa con aguja fina guiada por ultrasonografía endoscópica (USE-PAAF) en el diagnóstico de extensión de la neoplasia de pulmón de células no pequeñas en pacientes candidatos a cirugía. Implicaciones económicas”. Año 2004.



## ABREVIATURAS

<b>USE</b>	ultrasonografía endoscópica o ecoendoscopia
<b>USE-PAAF</b>	punción con aguja fina guiada por ultrasonografía endoscópica
<b>MHz</b>	megaHerz
<b>Estadio T</b>	infiltración intraparietal local de la tumoración
<b>Estadio N</b>	metástasis ganglionares regionales
<b>Estadio M</b>	metástasis a distancia
<b>TC</b>	tomografía computerizada
<b>CPRE</b>	colangiografía retrógrada endoscópica
<b>CPCNP</b>	cáncer de pulmón de célula no pequeña
<b>ADN</b>	ácido desoxiribonucleico
<b>MSP</b>	reacción en cadena de la polimerasa específica para el análisis de metilación
<b>PCR</b>	reacción en cadena de la polimerasa
<b>RT-PCR</b>	transcripción reversa y amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa



## **ANTECEDENTES DEL TEMA**

---





## **INTRODUCCIÓN**

### **1. CARACTERÍSTICAS DE LA ULTRASONOGRAFÍA ENDOSCÓPICA Y PUNCIÓN GUIADA POR ULTRASONOGRAFÍA ENDOSCÓPICA**

#### **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

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 mucosae* y las dos capas (longitudinal y circular) de la muscular propia.

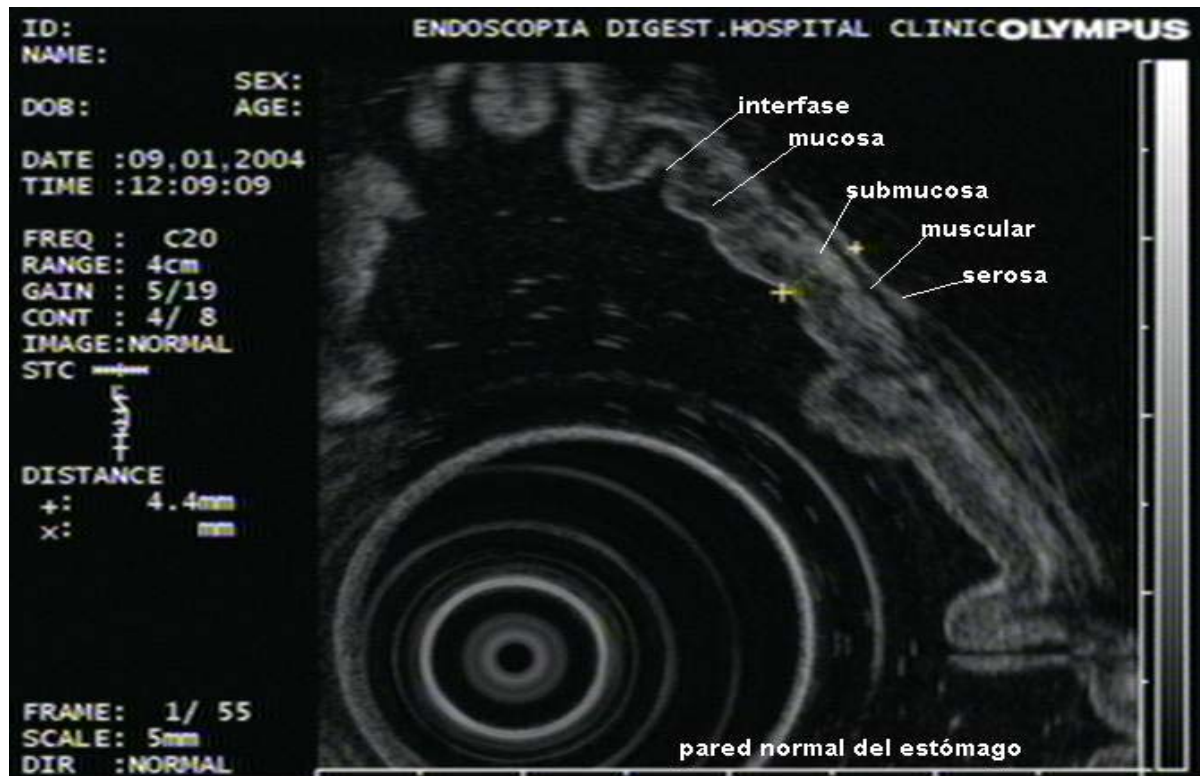
La diferenciación de las capas permite estudiar la afectación en profundidad de las neoplasias pudiendo así determinar el estadio T: tumores superficiales o T1 que afectan exclusivamente la mucosa o mucosa y submucosa, por lo que en la USE se identifican como un engrosamiento de la primera capa, con o sin alteración de la segunda capa; T2 que afectan hasta la muscular por lo que en la USE 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 USE 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.

Por otro lado, el ecoendoscopio 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 USE 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 o metástasis en el lóbulo hepático izquierdo.

**Figura 1:** Capas de la pared gástrica visualizadas por USE

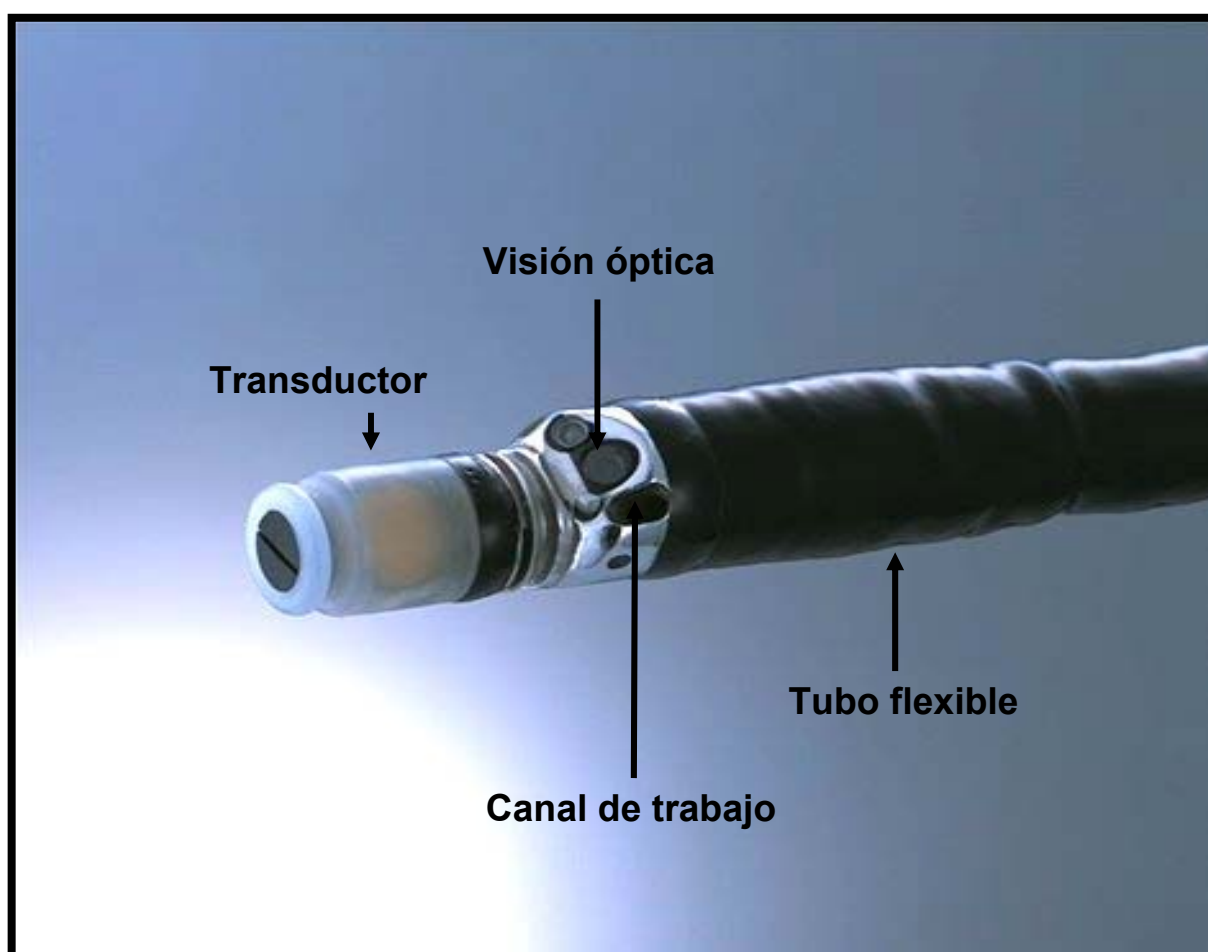


### 1.1.2 Técnica

El ecoendoscopio estándar es un endoscopio flexible de visión oblicua que tiene acoplado un transductor ecográfico en su extremo distal (figura 2). 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. Una exploración ecoendoscópica suele durar unos 30 minutos de promedio por lo que es necesario administrar anestesia o sedación.

**Figura 2:** Ecoendoscopio radial (*Olympus GF 160*)



### **1.1.3 Limitaciones**

Las limitaciones de la USE 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 el ecoendoscopio ciego que es de menor calibre, sin canal de aspiración ni visión endoscópica y que presenta un extremo en forma de dilatador. Por otro lado, así como la USE 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.

## **1.2 PUNCIÓN GUIADA POR ULTRASONOGRAFÍA ENDOSCÓPICA**

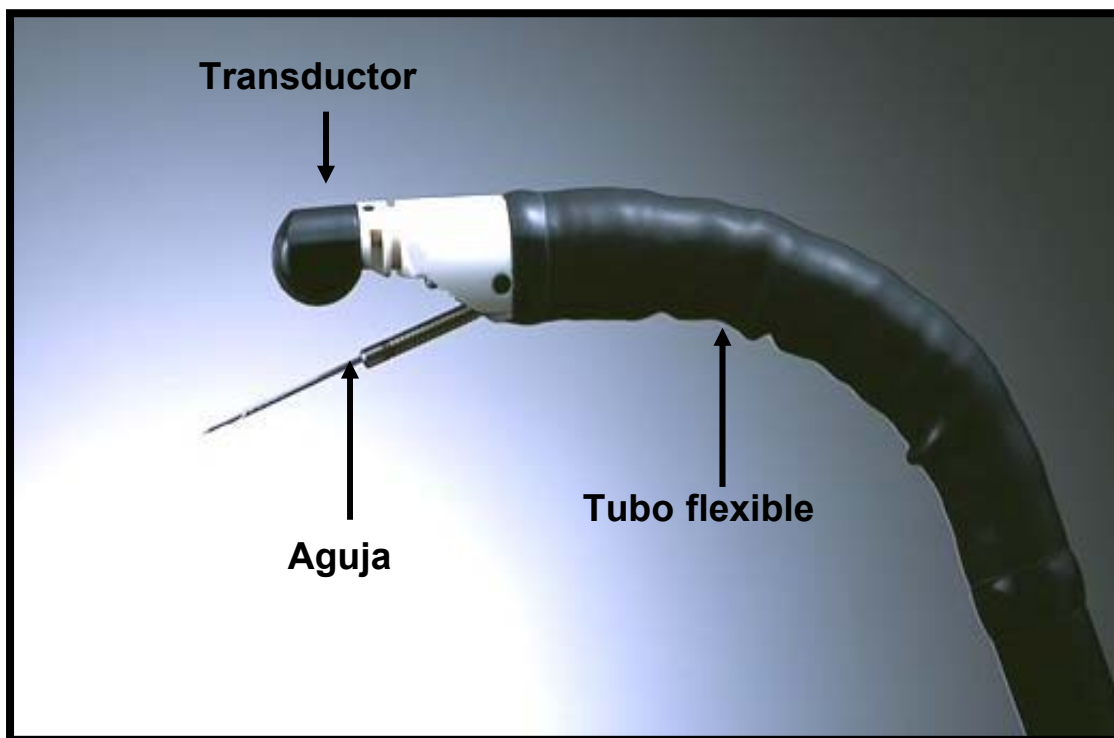
En la última década, se ha desarrollado el ecoendoscopio sectorial que permite introducir una aguja por el canal operativo que emerge por el extremo distal del aparato en el campo de visión de las ondas ultrasónicas (figura 3). Esto permite realizar la punción con aguja fina guiada por USE en tiempo 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**

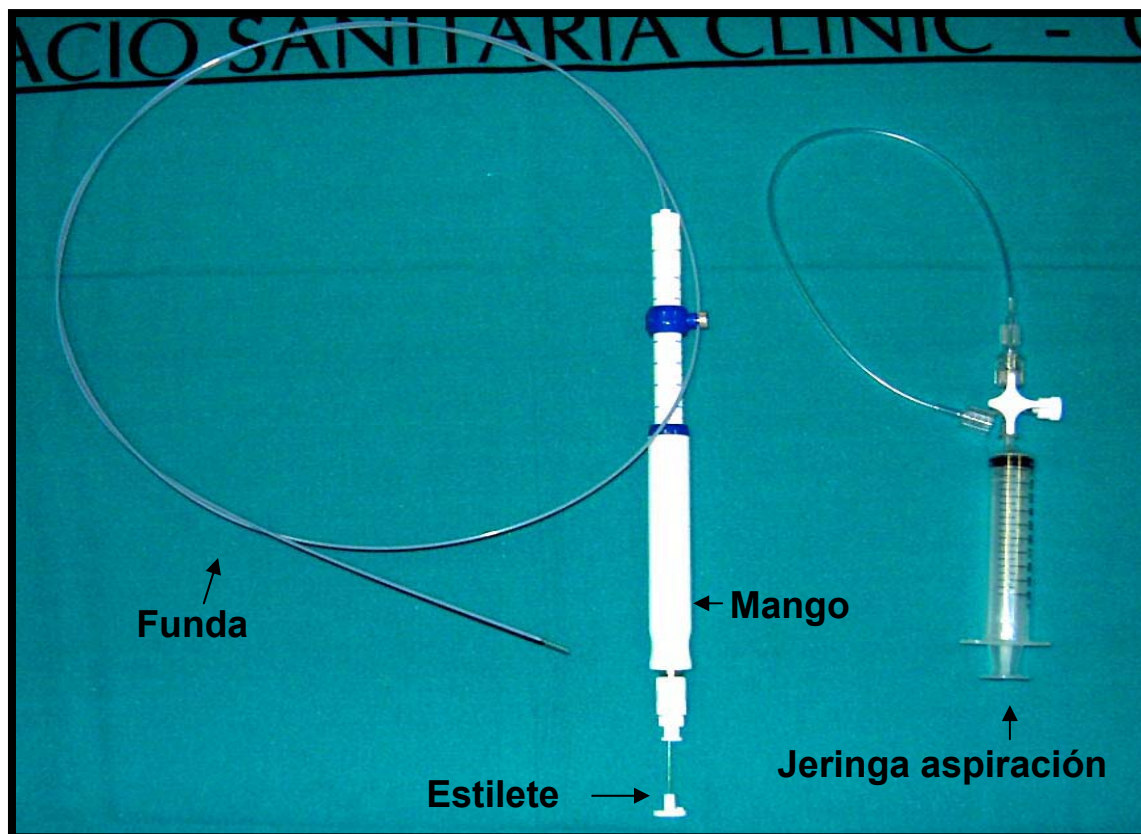
La USE intervencionista debe realizarse con el ecoendoscopio lineal o sectorial ya que permite visualizar la aguja en todo su trayecto durante la punción. Estos ecoendoscopios van acoplados a una consola de ecografía que dispone de señal doppler y doppler color, lo que permite identificar la presencia 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 sectorial 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 (figura 4). 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 realizarán las extensiones (figura 5). Se realizan tantos pases como sea necesario para la obtención de material adecuado para el diagnóstico citológico.

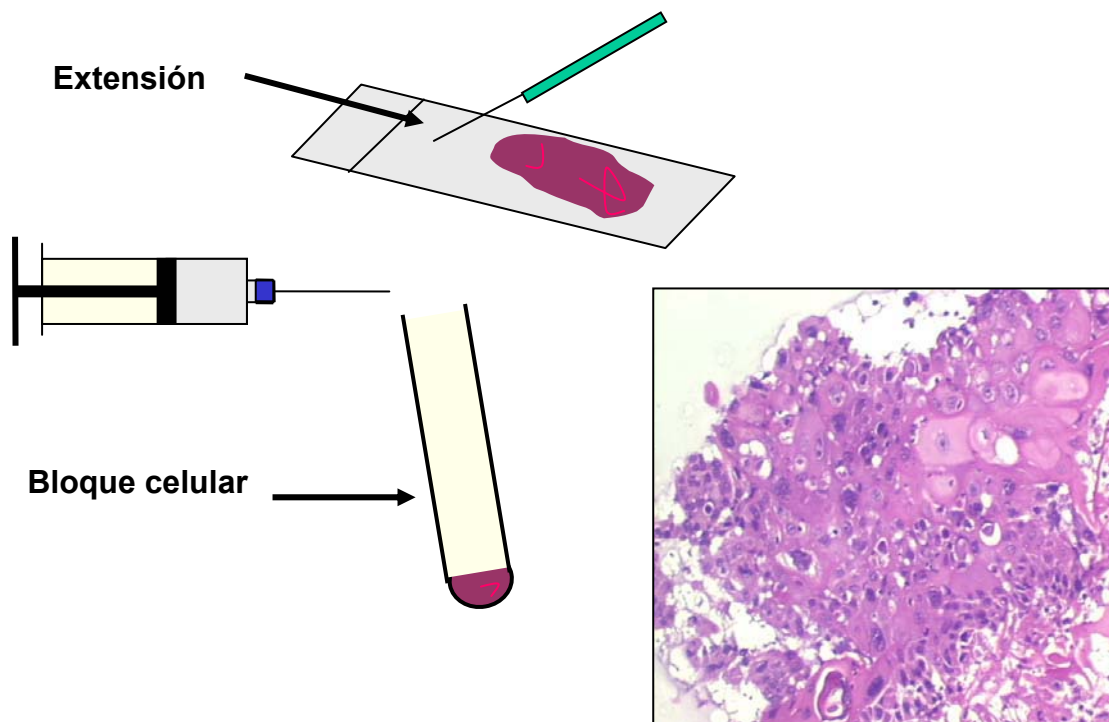
**Figura 3:** Ecoendoscopio sectorial (*Olympus*) con aguja en canal operativo.



**Figura 4:** Aguja de punción de 22G (*Wilson-Cook EUSN3*)



**Figura 5:** Preparación del material de USE-PAAF para el estudio 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 USE-PAAF, no se conocen realmente cuáles son los factores determinantes de un diagnóstico correcto. No obstante, 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 pases necesarios <sup>(1)</sup>. Por otro lado, también se ha visto que para la obtención de material



adecuado en las masas pancreáticas, la media de pases necesarios suele ser de 3-5, mientras que en las adenopatías es de 2-3 <sup>(1,2)</sup>. Además, es en los tumores submucosos y lesiones quísticas en los que la USE-PAAF presenta un menor rendimiento diagnóstico <sup>(2)</sup>.

### **1.2.3 Limitaciones**

Para realizar una USE-PAAF 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 USE-PAAF 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 citólogo 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. Por último, el ecoendoscopio sectorial no es capaz de sobrepasar las neoplasias estenosantes por lo que no se puede acceder a las adenopatías distales al tumor.

### **1.2.4 Complicaciones**

Como se ha comentado, la USE-PAAF 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 infección<sup>2</sup>. 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 que solo se ha descrito en un caso<sup>3</sup>. Se trataba de un paciente afecto de una neoplasia de cola de páncreas en que la punción guiada por USE se realizó a través del estómago. El paciente fue intervenido del tumor pancreático pero presentó posteriormente un implante a nivel de la pared gástrica, en el área de la punción. A pesar de este único caso, cabe destacar que, a diferencia de las técnicas de acceso percutáneo, el trayecto de punción por USE-PAAF suele estar incluido en la pieza de resección (esófago, recto, estómago, marco duodenal en cabeza de páncreas) y además no se atraviesa el peritoneo por lo que este riesgo se minimiza<sup>4</sup>.

## **2. UTILIDAD DE LA ULTRASONOGRAFÍA ENDOSCÓPICA Y PUNCIÓN CON AGUJA FINA GUIADA POR ULTRASONOGRAFÍA ENDOSCÓPICA**

Como se ha comentado la USE es una técnica muy útil para el diagnóstico de extensión de las neoplasias digestivas ya que permite determinar el estadio TN. Sin embargo, esta técnica 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 presentan a modo de revisión los aspectos fundamentales de las neoplasias que son objeto de los estudios que componen esta tesis doctoral.

## **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)<sup>5</sup>. 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 USE ha

demostrado ser de gran utilidad ya que, al ser capaz de discriminar las capas de la pared gástrica, permite sugerir el tipo de patología<sup>6-9</sup>.

### **2.1.1 Linitis plástica**

La linitis plástica es una forma de cáncer gástrico primario o metastásico 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 USE, 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<sup>6-9</sup>. Por USE, 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<sup>10</sup>. Además, la USE permite realizar el diagnóstico de extensión locorregional al descartar infiltración a órganos vecinos, adenopatías y, en este caso, típicamente ascitis que sugiere carcinomatosis peritoneal (figura 6).

### **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*<sup>11-13</sup>, puede adoptar cualquier forma pero suele afectar siempre

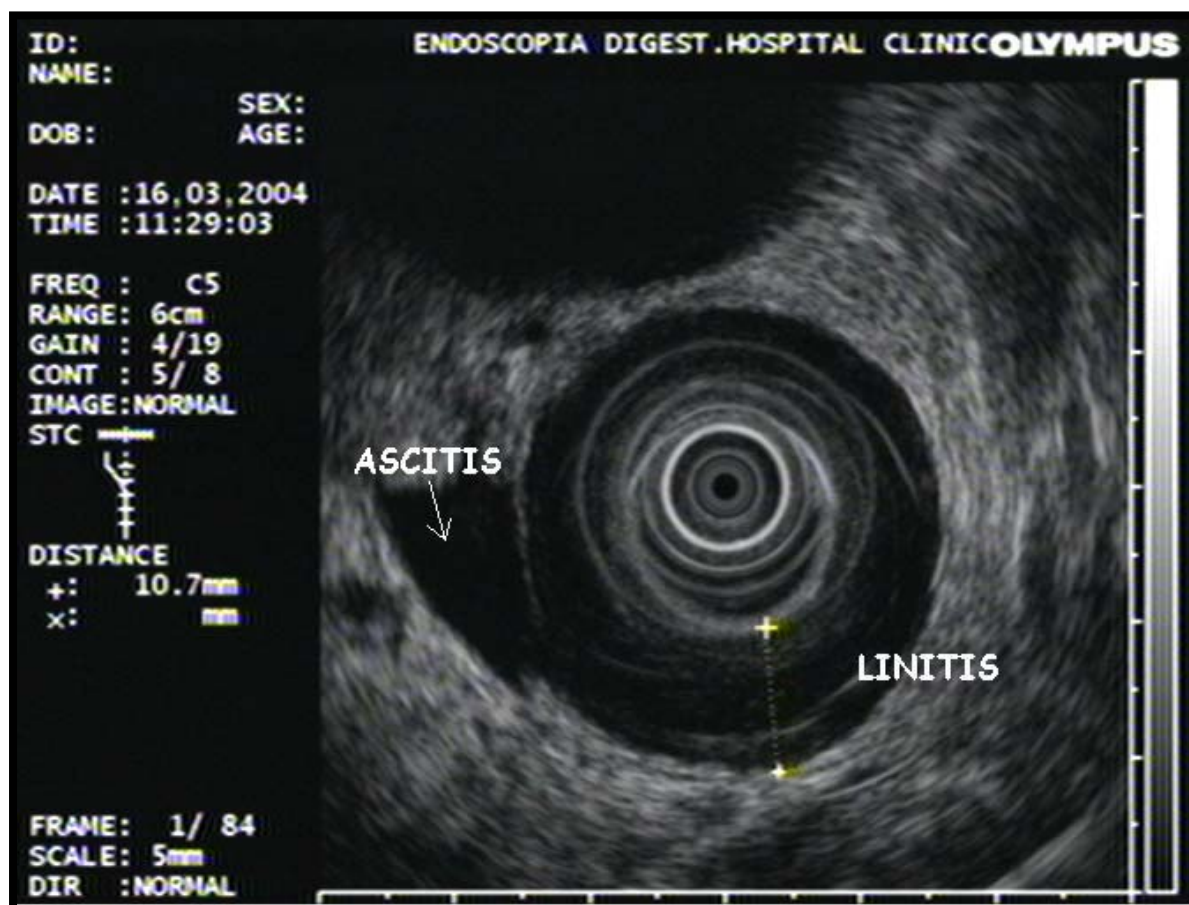
la capa mucosa por lo que el diagnóstico se hace mediante biopsias. La USE es, sin embargo, muy útil para su estudio de extensión y para evaluar la respuesta al tratamiento<sup>14, 15</sup>.

### **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 Ménetrier* 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.

El primero de los estudios de la presente Tesis Doctoral constituye un trabajo original de investigación sobre el papel de la USE en el diagnóstico de los pacientes con pliegues gástricos engrosados y biopsias negativas.

**Figura 6:** Imagen ecoendoscópica sugestiva de linitis: pared muy engrosada (11mm) con ascitis perilesional



## 2.2 NEOPLASIA DE PÁNCREAS

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 USE 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 <sup>16-18</sup>, 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 <sup>19</sup>. Los motivos que justifican este mal pronóstico son la ausencia de poblaciones de riesgo a las que dirigir programas de cribado 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 USE en la detección de estos tumores es mayor que la de la tomografía computerizada (TC), hecho que es más evidente cuando los tumores son menores de 3 cm<sup>20, 21</sup>. La precisión diagnóstica de la USE en comparación con la ultrasonografía convencional, TC no helicoidal, colangiopancreatografía retrograda endoscópica (CPRE) 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<sup>22</sup>. Desde la aparición de la TC helicoidal estos resultados claramente favorables a la USE son más controvertidos. Al analizar los estudios que comparan la TC helicoidal y la USE llama la atención la disparidad de resultados en función del ámbito de la publicación, de forma que los trabajos publicados en revistas gastroenterológicas

demuestran la superioridad de la USE y, en cambio, los resultados publicados en revistas de ámbito radiológico y quirúrgico, la de la TC<sup>22-26</sup>. Estas discrepancias son seguramente secundarias a problemas metodológicos y no hacen más que poner de manifiesto la excelente precisión diagnóstica de ambas técnicas que a nuestro entender son complementarias.

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 (PAAF) por vía percutánea o endoscópica, o biopsia quirúrgica. Los diferentes estudios publicados hasta la fecha demuestran que la USE-PAAF es la técnica más rentable y con menor morbilidad<sup>1, 2,27-30</sup>. 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 USE-PAAF 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 USE-PAAF 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<sup>32</sup> (figuras 7 y 8).

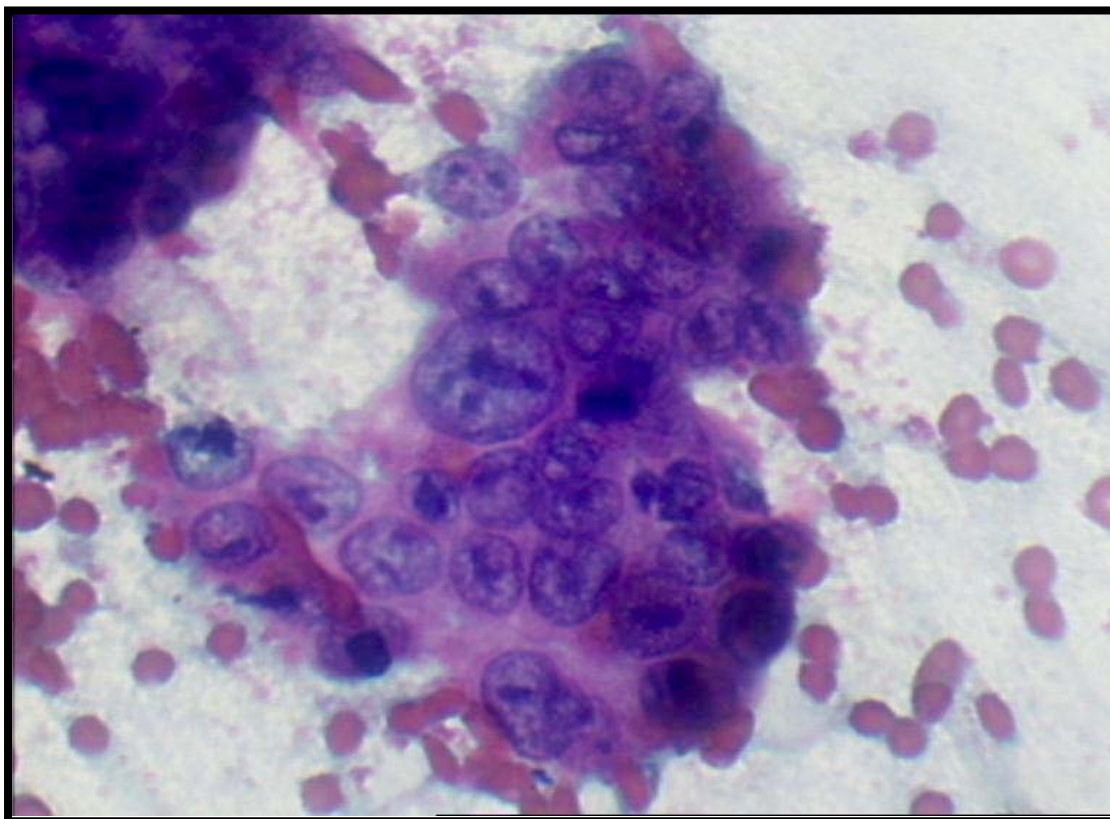


En la evaluación de la extensión locorregional del cáncer de páncreas, la USE-PAAF tiene también un papel relevante. En un estudio reciente<sup>33</sup> se comparó el coste –beneficio de la PAAF guiada por TC, la cirugía y la USE-PAAF para el diagnóstico de adenopatías metastásicas no peritumorales en pacientes con tumores de cabeza de páncreas resecables por TC helicoidal. La USE-PAAF 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 USE-PAAF en la estadificación del cáncer de páncreas.

**Figura 7:** Neoplasia de páncreas que infiltra a la vena mesentérica superior



**Figura 8:** Adenocarcinoma de páncreas. Tinción con papanicolau de muestra obtenida por USE-PAAF



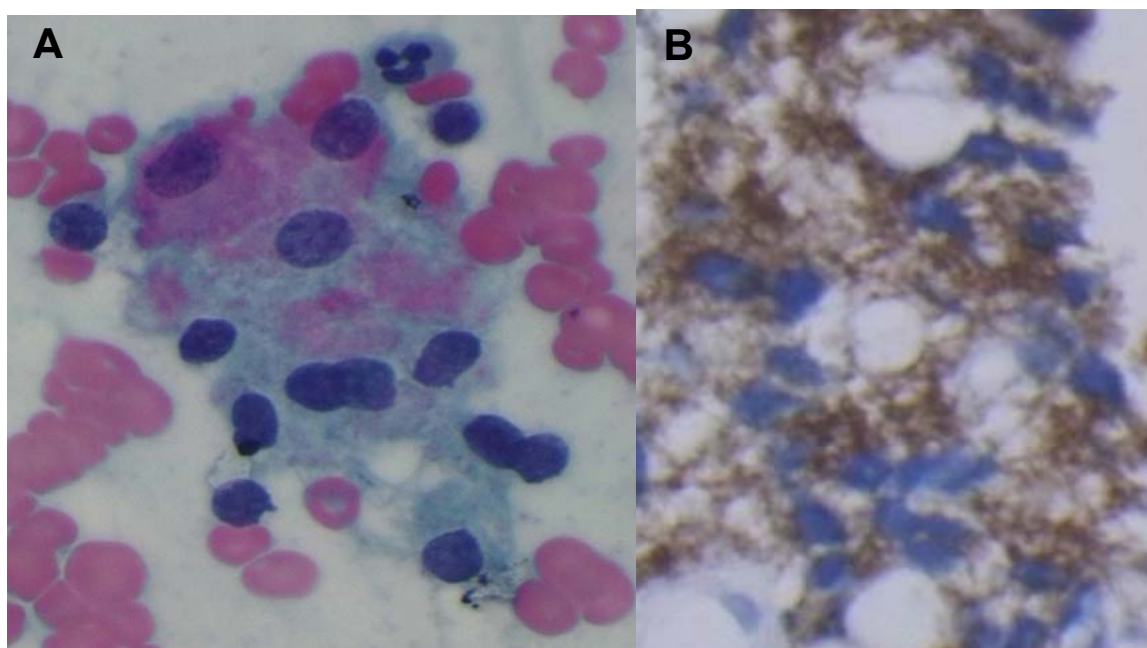
### **2.2.2 Tumores neuroendocrinos**

La USE 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 (figura 9). Además, la USE-PAAF 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<sup>31</sup> (figura 10). 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 USE-PAAF en muchos de estos pacientes antes de adoptar una actitud terapéutica determinada.

**Figura 9:** Tumor neuroendocrino del cuerpo de páncreas de 1,2cm de diámetro



**Figura 10:** **A:** Células características de tumor endocrino de páncreas (*papanicolau*). **B:** intensa positividad citoplasmática para cromogranina (Immunohistoquímica sobre bloque celular).



### **2.2.3 Lesiones quísticas**

Las lesiones quísticas del páncreas pueden ser benignas (pseudoquiste, 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 PAAF 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 USE-PAAF 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 USE-PAAF, 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<sup>38</sup>.

## **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. En España, la incidencia estimada es de 5-8 casos/10<sup>5</sup> 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<sup>16,39</sup>. 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<sup>40</sup>.

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<sup>41-44</sup>. Se trata, por tanto, de una neoplasia con una elevada capacidad de diseminación, incluso en estadios macroscópicamente poco avanzados<sup>45</sup>, 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

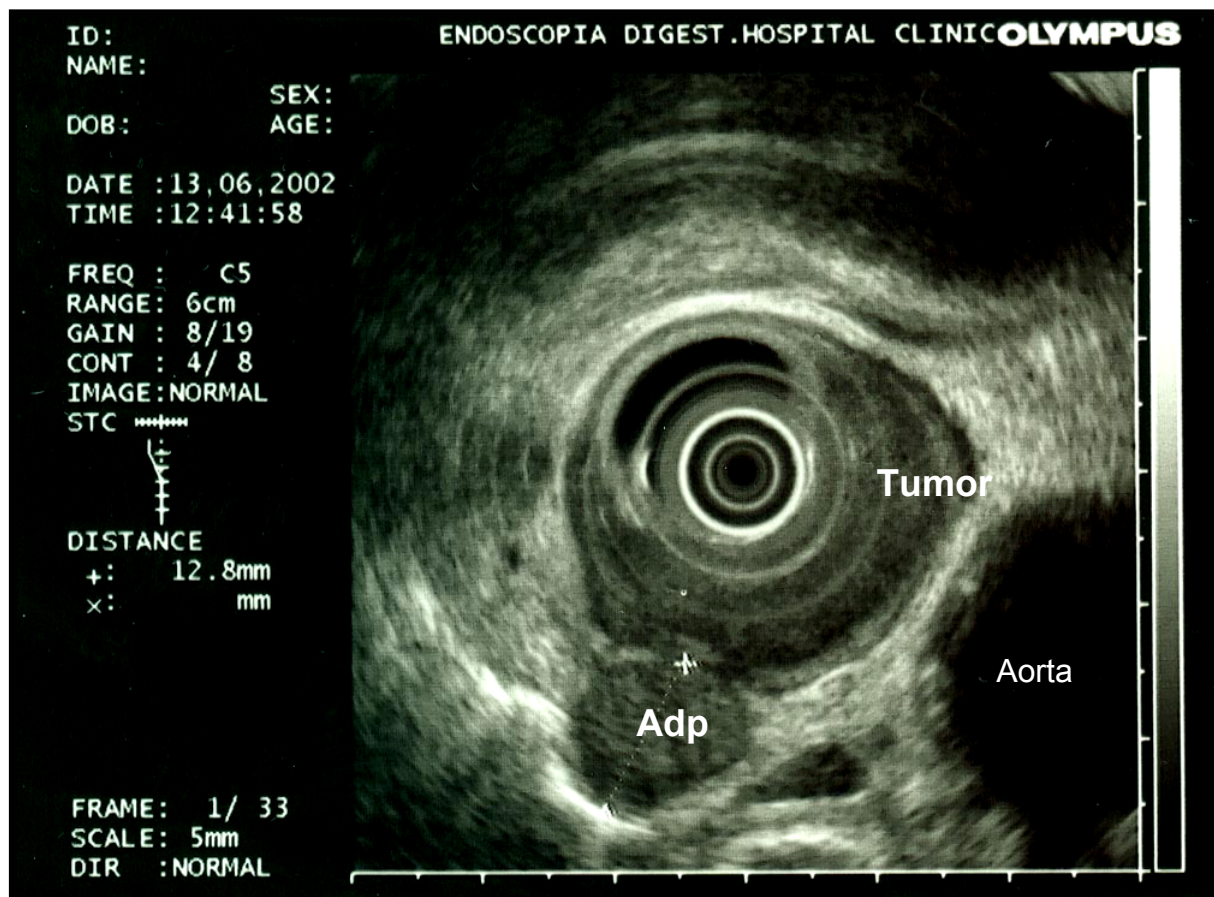
importantes limitaciones metodológicas, diversos estudios han demostrado que la radioquimioterapia neoadyuvante permite mejorar la resecabilidad y la supervivencia en pacientes con neoplasia de esófago localmente avanzada<sup>46, 47</sup>. Por todo ello, las estrategias diagnósticas aplicadas en la actualidad 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 USE ha demostrado ser el método más preciso en el diagnóstico de extensión locoregional del carcinoma de esófago (figura 11). Específicamente, la precisión diagnóstica de la USE para el estadio T es del 86% frente el 72% de la TC<sup>49-55</sup>. En el caso de la valoración de los ganglios linfáticos, la USE también ha demostrado presentar una mayor precisión diagnóstica que la TC (81% versus 61%, respectivamente)<sup>49-55</sup>. 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<sup>56, 57</sup>. Esta limitación es compartida, por otro lado, con las demás técnicas diagnósticas. Dicho problema se ha superado con la introducción de la USE-PAAF 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, 58</sup>. 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 USE y la USE-PAAF en el estudio de extensión locorregional de las neoplasias de esófago, la USE-PAAF 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 USE-PAAF 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 locorregional. En este sentido, la USE y, sobretodo, la USE-PAAF, juegan un papel importante puesto que su precisión en el diagnóstico de las adenopatías celíacas es del 93% y 97%, respectivamente<sup>55, 59</sup> siendo la USE-PAAF una técnica coste-efectiva al evitar que estos pacientes sean intervenidos innecesariamente<sup>55, 60</sup>.

**Figura 11:** N. esófago que afecta a la capa mucosa, submucosa y muscular sin sobrepasar la adventicia y se acompaña de adenopatía perilesional de aspecto metastásico (T2N1).



## 2.4 CÁNCER DE ESTÓMAGO

Aunque la incidencia de cáncer gástrico ha disminuído en las últimas décadas, todavía constituye la sexta localización en importancia en los hombres (6% del total de neoplasias) y la cuarta en las mujeres (5% del total)<sup>39</sup>. Se trata de neoplasias que suelen diagnosticarse en una fase avanzada, con afectación metastásica locorregional 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 locorregional 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<sup>62</sup>.

El papel de la USE en el diagnóstico de extensión del cáncer gástrico es menos relevante por la menor implicación que la información aportada por ésta supone en el manejo de estos tumores. Así, la utilidad de la USE es máxima para 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 afectación del margen de resección en el estudio de la pieza operatoria<sup>63</sup>. 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 USE 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<sup>64-66</sup>. 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 USE en la evaluación de los pacientes con neoplasia gástrica que es su utilidad en el cribado de 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<sup>68</sup>. 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<sup>69</sup>.

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<sup>70</sup>. 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<sup>70-73</sup>. Es, por tanto, primordial realizar un estudio de extensión preterapéutico exhaustivo.

Existen numerosos estudios que ponen de manifiesto la alta fiabilidad de la USE 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<sup>77, 78</sup>. El principal problema de la USE deriva de que a menudo estas neoplasias presentan un importante componente inflamatorio que la USE 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<sup>79,80</sup>. 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<sup>81</sup>. Por último, hasta un 17% de las lesiones son estenosantes y no se pueden estudiar<sup>79</sup>.

Por lo que respecta a la evaluación del estadio N, ninguna prueba de imagen es muy precisa. Los estudios disponibles demuestran que la USE es capaz de identificar correctamente las adenopatías tumorales perirectales con una precisión del 70-75%<sup>74-76,79-82</sup> comparado con el 55-65% de la TC<sup>77, 78,82y</sup> el 60-65% de la RM<sup>83,84</sup>. En este sentido, como ya se ha comentado previamente, si bien existen unos criterios ecoendoscópicos de malignidad para las adenopatías, éstos no son definitivos<sup>56,57</sup>. Esta limitación es compartida, por otro lado, con las demás técnicas diagnósticas. La introducción de la USE-PAAF 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 USE-PAAF no demuestra aportar mayor precisión al rendimiento de la USE en el cáncer de recto<sup>85</sup>. Una explicación aportada por los autores es que la mayoría de adenopatías perirrectales con algún criterio de malignidad por USE son malignas, por lo que la PAAF no aporta demasiada información con relación a la USE sola. Por otro lado, en el cáncer de recto, las adenopatías no metastastásicas no suelen visualizarse por USE ya que son muy pequeñas e isoecogénicas. 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<sup>82</sup>. Por ello, se estipula que el mero hecho de visualizarlos por USE 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 USE+/-PAAF en el estudio de extensión de las neoplasias rectales presenta un impacto sobre la supervivencia libre de

enfermedad de estos pacientes<sup>86</sup> y que la combinación de USE y TC es la estrategia más coste-eficaz<sup>87</sup>

## **2.6 CÁNCER DE PULMÓN DE CÉLULA NO PEQUEÑA**

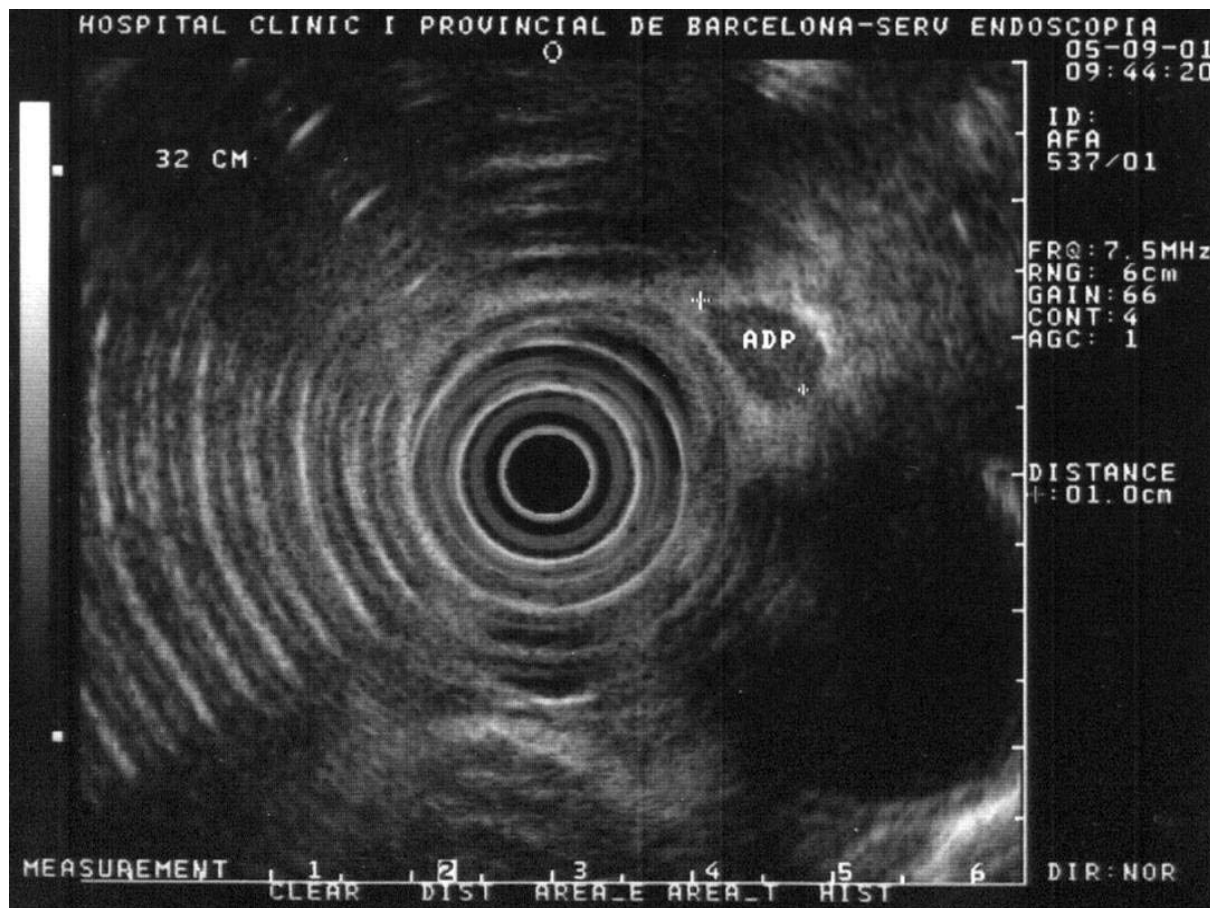
El cáncer de pulmón es la primera causa de muerte por cáncer en los países desarrollados. El 85% de estos tumores pertenecen al grupo de tumores de células no pequeñas (CPCNP) y presentan un pronóstico y tratamiento similar. Como en el caso de los demás tumores comentados, su pronóstico viene directamente relacionado con el estadio en el momento del diagnóstico, de forma que la supervivencia varía a los 5 años de un 40% a un 3% según se trate de estadios N1 o N3<sup>88,89</sup>. Por lo tanto, disponer de un diagnóstico de extensión preciso es fundamental para determinar la mejor opción terapéutica para cada paciente. Para ello, la primera técnica diagnóstica es la TC torácica. En caso de que existan adenopatías patológicas contralaterales (N3), el tumor pasa a considerarse irresecable, y en el caso de adenopatías mediastínicas homolaterales (N2) se aconseja realizar tratamiento neoadyuvante<sup>88</sup>. Por ello, dado el importante impacto que la presencia de adenopatías tiene sobre el pronóstico y tratamiento de esta enfermedad, es indispensable la confirmación citológica de malignidad de dichas adenopatías.

Actualmente las diferentes técnicas de abordaje de las adenopatías son la punción transbronquial a ciegas, que presenta una baja rentabilidad sobre todo si las adenopatías tienen un diámetro inferior a 2 cm<sup>90-92</sup>, la PAAF guiada por TC, que no permite acceder a ciertos territorios ganglionares ni a adenopatías menores de 1,5 cm y se asocia a una morbilidad del 25-35%, y la mediastinoscopia, que no

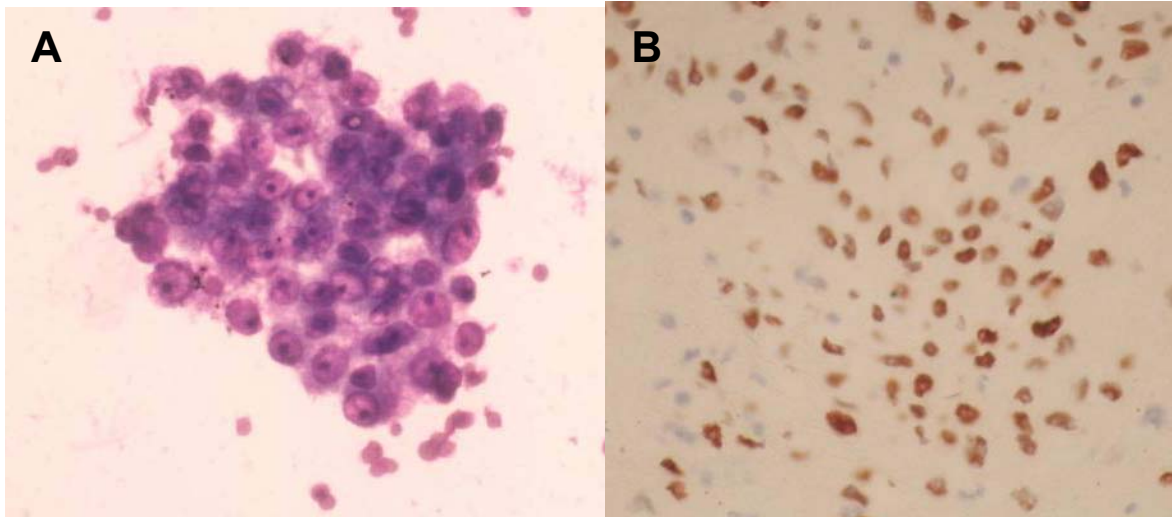
permite acceder a la región subcarinal, requiere ingreso hospitalario y anestesia general además de asociarse a una morbilidad no despreciable<sup>93,94</sup>. En este contexto, la USE-PAAF puede jugar un papel muy importante. Por un lado, tiene un fácil acceso a la mayoría de las estaciones ganglionares implicadas en el cáncer de pulmón y especialmente a aquellas en las que las demás técnicas tienen dificultades (ventana aortopulmonar, subcarinales, paraesofágicas), tiene también una alta sensibilidad y especificidad incluso para adenopatías menores de 1 cm (como se ha demostrado a nivel del tubo digestivo) y, además, ofrece la posibilidad de obtener material citológico con una rentabilidad muy superior a las demás técnicas con una morbilidad despreciable<sup>95-101</sup>.(figura 12 y 13). Gress et al<sup>95</sup> practicaron USE-PAAF a 24 pacientes con CPCNP y sólo un paciente con un foco de tumor de 2 mm en la adenopatía fue estadificado erróneamente por esta técnica, resultando una precisión del 96%. Fischer-Ravens et al<sup>96</sup> estudiaron 14 pacientes con CPCNP y una punción transbronquial previa negativa. La sensibilidad, especificidad y precisión de la USE-PAAF en la estadificación ganglionar fue del 96%, 100% y 97%, respectivamente. En un análisis de coste-beneficio en el que se compara la USE-PAAF, la mediastinoscopia y la toracotomía para el diagnóstico de extensión del CPCNP, la USE resultó la técnica más coste-efectiva<sup>102</sup>. En un estudio reciente<sup>103</sup> en el que se revisan las diferentes técnicas disponibles en la actualidad para la estadificación del CPCNP (TC, RM, PET, estadificación quirúrgica, mediastinoscopia, PAAF percutánea, PAAF transbronquial y USE-PAAF), se destaca la dificultad para discernir las adenopatías benignas de las malignas y el importante papel que presenta la USE-PAAF a tal efecto, sobre todo para las adenopatías subcarinales, paraesofágicas y de la ventana aortopulmonar. Aún más importante, en un estudio reciente de Wallace et al<sup>104</sup> se ha demostrado

que en 1/4 de las adenopatías catalogadas como normales por TC, la USE-PAAF es capaz de detectar focos de metástasis. Con estos resultados, los autores sugieren que se debería incluir la USE-PAAF en el algoritmo de estudio preoperatorio de todos los pacientes con CPCNP potencialmente quirúrgicos. Por otro lado, es probable que los criterios endosonográficos para la detección de adenopatías metastásicas no sean aplicables a las adenopatías mediastínicas. Efectivamente, adenopatías con criterios de benignidad como las subcarinales pueden presentar focos de metástasis, por lo que es imprescindible realizar una PAAF<sup>105</sup>. Por todos estos motivos, la USE-PAAF se está afianzando como una técnica cada vez más importante en la evaluación preterapéutica del CPCNP.

**Figura 12:** Adenopatía paraesofágica (región 8) en paciente con adenocarcinoma de pulmón



**Figura 13: A:** Imagen citológica característica de adenocarcinoma (*papanicolau*). **B:** Positividad nuclear para TTF-1, indicativa de origen pulmonar (immunohistoquímica sobre bloque celular)



### **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  $10^7$  células no tumorales<sup>106</sup>, por lo que pueden ser de enorme utilidad para el diagnóstico del cáncer y la detección de metástasis.

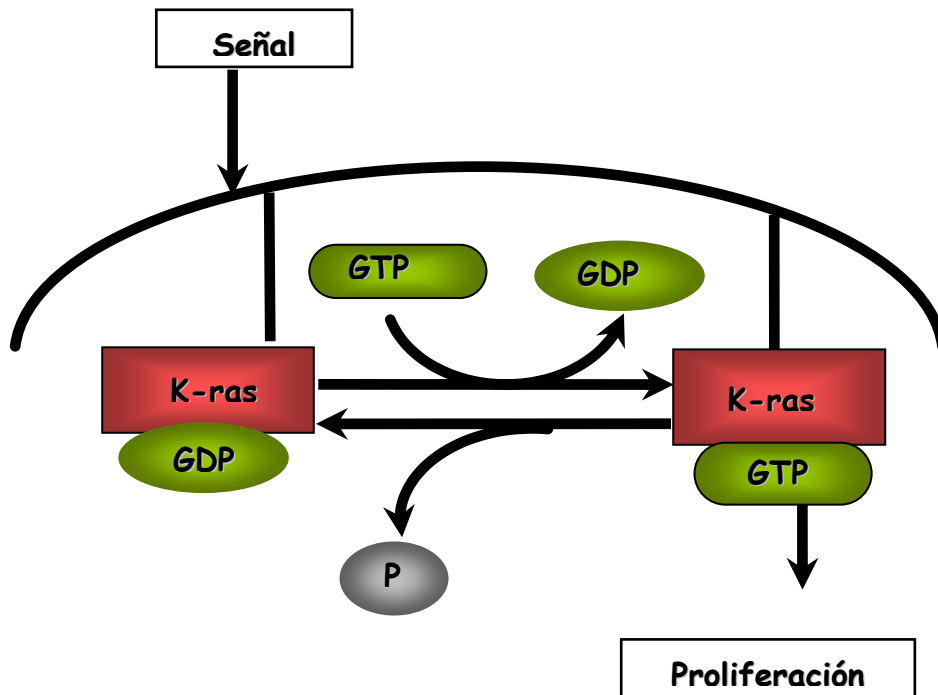
### **3.2 MARCADORES MOLECULARES EN EL CÁNCER DE PÁNCREAS**

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<sup>107</sup>. Este proto-oncogen 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 (figura 14). La presencia universal y casi constante de mutaciones somáticas en el codón

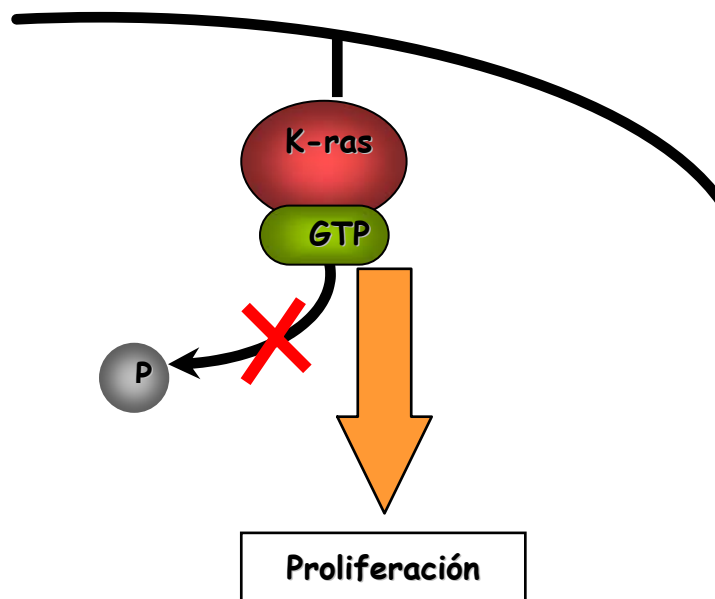
12 del gen *KRAS* ha favorecido el desarrollo de técnicas moleculares dirigidas al diagnóstico de esta neoplasia. En este sentido, mediante amplificación génica ha sido posible identificar la presencia de mutaciones en el gen *KRAS* en ADN extraído del jugo pancreático y otros especímenes cito-histológicos, lo que permite incrementar la precisión diagnóstica de la CPRE<sup>108,109</sup> y de la PAAF por vía percutánea<sup>110-112</sup>, 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<sup>113</sup>. 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<sup>114-116</sup>. 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<sup>111, 116,117</sup>.

Figura 14: Mecánismo de acción del gen KRAS en células normales y neoplásicas.

CÉLULA NORMAL



CÉLULA TUMORAL



### 3.3 MICROMETÁSTASIS GANGLIONARES EN NEOPLASIAS DIGESTIVAS Y PULMONARES

Como se ha comentado, la precisión de la USE 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<sup>49-54,64-66,74-76,79-82</sup>. 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<sup>56,57</sup>. Esta dificultad puede solventarse con la utilización de la USE-PAAF que permite obtener material citológico para confirmar la infiltración metastásica de las adenopatías con un rendimiento cercano al 90%<sup>55,85,95-100</sup>. Sin embargo, se ha demostrado que en las adenopatías pueden existir focos de micrometástasis no detectables por métodos de citología convencional<sup>118,119</sup>. 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<sup>106, 120-131</sup>.

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<sup>106,120-135</sup>. 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<sup>130, 131</sup>, gástrico<sup>123, 124</sup>, recto<sup>125-128</sup>, y pulmón<sup>106,129-131</sup>. 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<sup>106,129-131</sup>. 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 USE-PAAF 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 pulmonares.

### **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

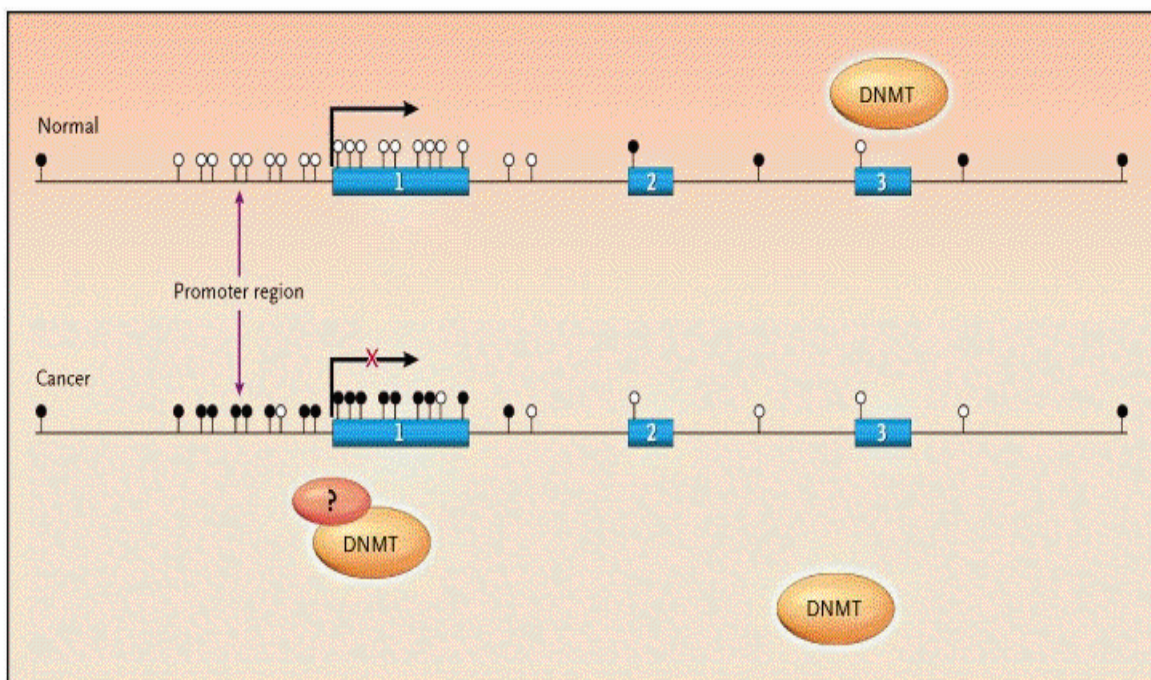
genes. Aunque la primera estrategia es más atractiva, se ve limitada por el hecho de que es infrecuente que un tumor presente mutaciones en un oncogen específico de forma muy prevalente. La segunda estrategia es mucho más factible pero presenta el inconveniente de ser poco específica ya que las células 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<sup>136, 137</sup>. 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 CpGs<sup>138</sup>. 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<sup>139-141</sup> (figura 15 y 16). Recientemente se ha descrito un perfil de hipermetilación concreto para cada

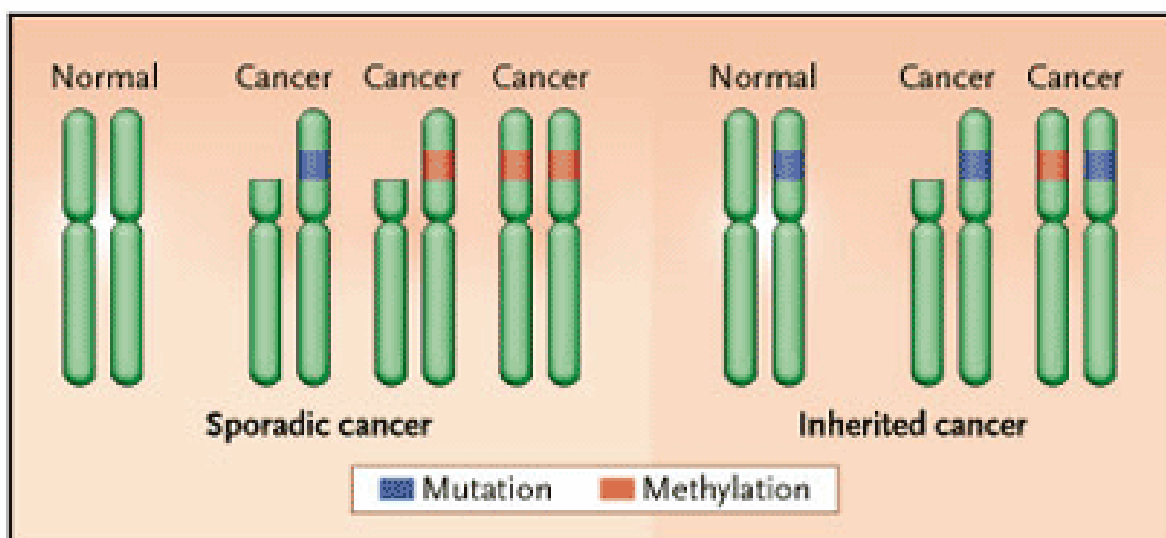
neoplasia humana de forma que, combinando 3-4 marcadores, se puede lograr tipificar prácticamente cada tumor<sup>142</sup>. Algunos de estos genes son compartidos y otros son tumor-específicos. Así, los tumores gastrointestinales comparten un grupo determinado de genes hipermetilados que incluyen *p16<sup>INK4a</sup>*, *p14<sup>ARF</sup>*, *MGMT*, *APC* y *hMLH1*, mientras que el CPCNP presenta un patrón distinto que afecta a los genes *DAPK*, *MGMT* y *p16<sup>INK4a</sup>*.

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<sup>143</sup>. Para que un método sea utilizado como diagnóstico, debe ser rápido, fácil, sensible y no radioactivo. La MSP cumple con estos cuatro requerimientos<sup>144</sup>. 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<sup>145-152</sup> con excelentes resultados. Sin embargo, hasta la fecha, ningún grupo ha utilizado el material obtenido por USE-PAAF para el estudio de micrometástasis mediante determinación de los patrones de metilación.

**Figura 15:** Distribución de los dinucleótidos CpG en el genoma humano y diferencias en los patrones de metilación entre células normales y tumorales.



**Figura 16:** Cambios genéticos y epigenéticos que inactivan los genes supresores tumorales siguiendo la hipótesis de los dos golpes de Knudson.





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

La USE-PAAF 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 USE-PAAF tan sólo ha sido estudiada por un grupo<sup>153</sup>. En este estudio, Tada *et al* demuestran que es posible detectar mutaciones del *KRAS* en material obtenido por USE-PAAF 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<sup>1, 2, 27-30</sup>.

Por otro lado, hasta la fecha, tan sólo existe un estudio que emplea el material obtenido por USE-PAAF para la identificación de micrometástasis. En este estudio el grupo de Wallace<sup>154</sup> 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.

Los trabajos de la presente Tesis Doctoral pretenden aportar nuevas evidencias científicas que validen la utilidad de la USE-PAAF para el diagnóstico de las neoplasias digestivas y pulmonares empleando marcadores moleculares.



## 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 USE y la USE-PAAF presentan las prestaciones adecuadas que hacen de ellas técnicas de elección para el diagnóstico y estudio de extensión locorregional de las neoplasias digestivas y pulmonares, 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 ultrasonografía endoscópica en Oncología, existen patologías de difícil manejo clínico en las 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 USE-PAAF. Por otro lado, la combinación de una técnica diagnóstica novedosa como es la USE-PAAF con los métodos de biología molecular podría suponer un verdadero avance en el diagnóstico de las neoplasias digestivas y pulmonares.

## JUSTIFICACIÓN AL ESTUDIO 1

### ***Ultrasonografía endoscópica en pacientes con pliegues gástricos engrosados por endoscopia y biopsias negativas para malignidad: 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 USE, al permitir explorar la pared, podría ser una técnica fundamental en este contexto. Sin embargo, hasta la fecha, no existe ningún estudio que haya analizado cuáles son las características endosonográficas predictivas de malignidad ni cuál es el impacto clínico de la USE sobre el manejo de estos pacientes.

Resultados publicados en: Ginès A, Pellisé M, Fernández-Esparrach G, Soria MT, Mata A, Membrillo A, Martínez G, Solé M, Llach J, Bordas JM, Piqué JM. Endoscopic ultrasonography in patients with large gastric folds at endoscopy and biopsies negative for malignancy: Predictors of malignant disease and clinical impact. Remitido para su evaluación.

## JUSTIFICACIÓN AL ESTUDIO 2

***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 ultrasonografía endoscópica.***

La utilidad de la USE-PAAF en el diagnóstico citológico de las 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.

Resultados publicados en: Pellisé M, Fernández-Esparrach G, Solé M, Colomo L, Castells A, Llach J, Mata A, Bordas JM, Piqué JM, Ginès A. *Endoscopic ultrasonography-guided fine needle aspiration: predictive factors of an accurate diagnosis and cost-minimization analysis of an on-site cytopathologist.* Remitido para evaluación.

### JUSTIFICACIÓN AL ESTUDIO 3

#### ***Utilidad clínica del análisis mutacional del gen KRAS en el diagnóstico del adenocarcinoma de páncreas mediante punción aspirativa guiada por ultrasonografía endoscópica .***

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 USE-PAAF 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 USE-PAAF podría lograr un rendimiento en el diagnóstico del cáncer de páncreas que, en la actualidad, ninguna técnica posee.

Resultados publicados en : Pellisé M, Castells A, Ginès A, Solé M, Mora J, Castellví-Bel S, Rodríguez-Moranta F, Fernández-Esparrach G, Llach J, Bordas JM, Navarro S, Piqué JM. *Clinical usefulness of KRAS mutational analysis in the*



*diagnosis of pancreatic adenocarcinoma by means of endosonography-guided fine-needle aspiration biopsy. Aliment Pharmacol Ther 2003;17:1299-1307.*

## JUSTIFICACIÓN AL ESTUDIO 4

### ***Detección de micrometástasis ganglionar mediante determinación de perfiles de hipermetilación en material obtenido por punción aspirativa guiada por ultrasonografía endoscópica.***

Con respecto al diagnóstico de la extensión ganglionar de las neoplasias digestivas y pulmonares, la precisión diagnóstica de la USE se sitúa alrededor del 75%, con algunas variaciones según la localización del tumor primario. La obtención de material citológico por USE-PAAF 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 USE-PAAF. La combinación de la citología

convencional junto con esta técnica molecular podría permitir detectar un mayor número de adenopatías metastásicas.

Resultados publicados en: Pellisé M, Castells A, Ginès A, Agrelo R, Solé M, Castellví-Bel S, Fernández-Esparrach G, Llach J, Esteller M, Bordas JM, Piqué JM. *Detection of Lymph-node Micrometastases by Gene Promoter Hypermethylation in Samples Obtained by Endosonography-Guided Fine-Needle Aspiration Biopsy. Clin Cancer Research 2004;10:4444-4449.*



## **OBJETIVOS**

---



Los objetivos específicos de la presente Tesis Doctoral fueron:

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 ultrasonografía endoscópica en estos pacientes.
2. Evaluar **los factores que condicionan el rendimiento de la USE-PAAF** en el diagnóstico citológico de las lesiones digestivas y peridigestivas.
3. Evaluar la **utilidad de la USE-PAAF** en el **diagnóstico de las neoplasias de páncreas** mediante el estudio de mutaciones en el codón 12 del gen *KRAS* en el material aspirado.
4. Evaluar la **utilidad de la USE-PAAF** en el **diagnóstico de extensión de las neoplasias digestivas** (esófago, estómago, recto) y **del cáncer de pulmón** de célula no pequeña mediante el estudio de los patrones de mutación específicos en el material aspirado.





## COMUNICACIONES A CONGRESOS

---



Los resultados de los trabajos que constituyen la base de la presente Tesis Doctoral han sido presentados en los congresos que se relacionan a continuación:

- Pellisé M, Castells A, Solé M, Mora J, Soria MT, Fernández-Esparrach G, Llach J, Bordas JM, Ginès A. Usefulness of K-ras mutational analysis in the diagnosis of pancreatic carcinoma by means of endosonography-guided fine needle aspiration biopsy. 13<sup>th</sup> International Symposium on Endoscopic Ultrasonography. New York, USA Oct 2002. **Gastrointest Endosc 2002; 56 (4)Suppl:S124.**
- Pellisé M, Castells A, Ginès A, Solé M, Mora J, Castellví-Bel S, Piñol V, Fernández-Esparrach G, Soriano A, Mata A, Llach J, Bordas JM, Navarro S, Piqué JM. Usefulness of *KRAS* Mutational Analysis in the Diagnosis of Pancreatic Carcinoma by means of Endosonography-Guided Fine-Needle Aspiration Biopsy. DDW ASGE meeting; Orlando May 18-21 2003. **Gastrointest Endosc 2003 ;57(5) :AB239.**
- Pellisé M, Castells A, Ginès A, Fernández-Esparrach G, Castellví-Bel S, Solé M, Agrelo R, Llach J, Esteller M, Bordas JM, Piqué JM. Detection of lymph node micrometastases by gene promoter hypermethylation in samples obtained by endosonography-guided fine-needle aspiration biopsy. 105<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Gastroenterological Association. New Orleans, Mayo 2004. **Gastrointest Endosc 2004; 59 (5): AB19.**
- Pellisé M, Ginès A, Solé M, Vera D, Fernández-Esparrach G, Castells A, Mata A, Llach J, Bordas JM, Piqué JM. Improving the accuracy of ultrasound-endoscopy fine-needle aspiration (EUS-FNA): factors predicting a correct diagnosis and usefulness of an attendant pathologist. 105<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Gastroenterological Association. New Orleans, Mayo 2004. **Gastrointest Endosc 2004; 59 (5): AB72.**
- Pellisé M, Ginès A, Membrillo A, Fernández-Esparrach G, Soria MT, Soriano A, Mata A, Llach J, Bordas JM, Piqué JM. Impact of endoscopic ultrasound (EUS) on management of patients with large gastric folds and endoscopic biopsies negative for malignancy (LGF-NB). 105<sup>th</sup> Annual Meeting of the American

Gastroenterological Association. New Orleans, Mayo 2004. **Gastrointest  
Endosc 2004; 59 (5): AB73.**

**PUBLICACIONES ORIGINALES**

---



Los resultados de los estudios que constituyen la base de la presente tesis doctoral han sido recogidos en las siguientes publicaciones:

1. Pellisé M, Castells A, Ginès A, Solé M, Mora J, Castellví-Bel S, Rodríguez-Moranta F, Fernández-Esparrach G, Llach J, Bordas JM, Navarro S, Piqué JM. *Clinical usefulness of KRAS mutational analysis in the diagnosis of pancreatic adenocarcinoma by means of endosonography-guided fine-needle aspiration biopsy.* **Alimentary Pharmacology and Therapeutics** **2003;17:1299-1307.** (Factor Impacto = 3,529)
2. Pellisé M, Castells A, Ginès A, Agrelo R, Solé M, Castellví-Bel S, Fernández-Esparrach G, Llach J, Esteller M, Bordas JM, Piqué JM. *Detection of Lymph-node Micrometastases by Gene Promoter Hypermethylation in Samples Obtained by Endosonography-Guided Fine-Needle Aspiration Biopsy.* **Clinical Cancer Research** **2004;10: 4444-4449.** (Factor Impacto = 6,511)

**Factor de impacto global artículos ya publicados: 10,04**

3. Ginès A, Pellisé M, Fernández-Esparrach G, Soria MT, Mata A, Membrillo A, Martínez G, Solé M, Llach J, Bordas JM, Piqué JM. Endoscopic ultrasonography in patients with large gastric folds at endoscopy and biopsies negative for malignancy: Predictors of malignant disease and clinical impact. Remitido para evaluación

4. Pellisé M, Fernández-Esparrach G, Solé M, Colomo L, Castells A, Llach J, Mata A, Bordas JM, Piqué JM, Ginès A. Endoscopic ultrasonography-guided fine needle aspiration: predictive factors of an accurate diagnosis and cost-minimization analysis of an on-site cytopathologist. Remitido para evaluación.



## **ARTÍCULO 1**





















































## **ARTÍCULO 2**





























































## **ARTÍCULO 3**



























## **ARTÍCULO 4**

















## DISCUSSION

---



Los resultados de la presente Tesis Doctoral demuestran que la ultrasonografía endoscópica es una técnica altamente efectiva en el diagnóstico y en el estudio de extensión de las neoplasias digestivas y pulmonares, así como que es factible realizar análisis moleculares en el material aspirado, lo cual puede incluso incrementar su rendimiento diagnóstico.

El primer trabajo de esta Tesis Doctoral demuestra que en los pacientes con pliegues gástricos engrosados y biopsias negativas, un hallazgo endosonográfico como es el engrosamiento de las capas profundas (submucosa y/o muscular  $\geq$  5mm), permite identificar a los pacientes con patología maligna con una elevada precisión (especificidad del 97% y valor predictivo positivo y negativo del 95%). Además, cuando se analiza el impacto que tiene la realización de la USE sobre el manejo de estos pacientes se observa que la probabilidad de que presenten una linitis aumenta del 34% al 95% cuando la USE sugiere malignidad. En cambio, si la USE sugiere benignidad esta 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<sup>10-12</sup> en la literatura sobre la utilidad de la USE en el diagnóstico de los pacientes con pliegues gástricos engrosados son descriptivos y no consideran el subgrupo de pacientes con biopsias negativas que es el que ofrece mayor dificultad diagnóstica y, por tanto, es donde la USE 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 USE 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.

El segundo estudio de esta Tesis doctoral pretendía identificar los factores relacionados con un diagnóstico correcto en pacientes evaluados mediante USE-PAAF, así como evaluar la aportación y el coste de disponer de un patólogo en la sala de exploración durante el procedimiento. Cuando se analizó la serie global de pacientes sometidos a USE-PAAF 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 de coste-minimización permitió establecer que, en nuestro medio, la presencia del patólogo en la sala de exploración es una estrategia coste-eficaz, al permitir disminuir el número de pases totales necesarios para obtener un diagnóstico. Desgraciadamente, no todos los centros hospitalarios pueden disponer de un patólogo en la sala de exploración por lo que se consideró importante evaluar el número de muestras necesarios para conseguir un rendimiento similar al obtenido con ayuda del citólogo. 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 pases se obtiene un buen rendimiento,

mientras que en las masas pancreáticas hacen falta 4 pases para obtener los mismos resultados.

El tercer trabajo de esta Tesis doctoral 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 citológico. Por otra parte, es conocido que las neoplasias de 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 desestructurado. Estas consideraciones refuerzan la importancia del tercer estudio de la presente Tesis, en el cual se demuestra una vez más el alto rendimiento de la USE-PAAF 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 realizar un examen correcto. En aquellos pacientes en los que las muestras de la PAAF son adecuadas, el estudio citológico 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 pases necesarios para el diagnóstico lo que se traduce en una estrategia más coste-eficaz y con menor morbilidad. En caso de no disponer de patólogo es posible que la adición del análisis molecular fuera aún de mayor utilidad.

Por último, el cuarto estudio de esta Tesis aporta una información novedosa que es la posibilidad de detectar micrometástasis mediante estudio de metilación en material obtenido por USE-PAAF. 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 citología convencional, este estudio ha permitido establecer por primera vez un nuevo campo de indicaciones para la USE-PAAF. 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 de esta Tesis demuestran que la USE-PAAF 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 pulmonares.

Por todo ello, en su conjunto los resultados de la presente Tesis Doctoral muestran que la USE-PAAF es de gran utilidad para el diagnóstico y la estadificación de los pacientes con neoplasias digestivas y pulmonares. 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 y, porque no a la luz de nuestros hallazgos, también al biólogo molecular que en

cualquier caso tendría que revertir en una mejoría en el pronóstico de los pacientes con neoplasias digestivas y pulmonares.



## **CONCLUSIONES**

---



Los resultados obtenidos en los diferentes estudios que componen esta Tesis Doctoral, 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 USE es una técnica muy precisa y con un importante impacto clínico en el manejo de este grupo de pecientes.
3. En los pacientes referidos para USE-PAAF, esta técnica aumenta significativamente el porcentaje de diagnósticos correctos en cuanto a benignidad y malignidad con respecto a la USE, en especial en adenopatías y lesiones quísticas.
4. La localización intraparietal de la lesión es el único factor asociado a una mayor probabilidad de obtener un diagnóstico incorrecto.
5. La presencia de un patólogo en la sala de exploración aumenta el rendimiento de la USE-PAAF al reducir el número de pases necesarios para obtener un diagnóstico correcto y es una estrategia coste-eficaz.
6. Es posible efectuar el análisis mutacional del gen *KRAS* en el material obtenido por USE-PAAF, 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 USE-PAAF.
9. La combinación de este análisis con la citología convencional puede ser una aproximación útil en el diagnóstico de extensión de los pacientes con neoplasias digestivas y pulmonares.

## **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. , Vilmann 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, Garipey 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 1; 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.
16. Borrás J, Galcerán J, Anglada LI. El càncer a Tarragona 1980-1985. Estudi epidemiològic descriptiu. Tarragona: Associació Espanyola contra el Càncer, 1988.
17. Hoey J. Cancer of the pancreas: epidemiology and risk factors. *Gastroenterol Clin Biol* 1985; 9:765-766.
18. 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.
19. Lillemoe KD. Current management of pancreatic carcinoma. *Ann Surg* 1995; 221:133-148.
20. 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.
21. 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.
22. Rosch and M. Classen. *Gastroenterologic Endosonography. Textbook and Atlas*. Thieme Medical Publishers, Inc. New York, 1992. pp124-127.
23. 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.



24. 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): 18993.
25. Tierney WM, Francis IR, Eck hauser 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.
26. Mertz HR, Sechopoulos P, Delbeke D, Leach SD. EUS, PET, and CT scanning for evaluation of pancreatic adenocarcinoma. *Gastrointest Endosc* 2000; 52:367-371.
27. Suits J, Frazee R, Erickson RS. Endoscopic ultrasound and fine needle aspiration for the evaluation of pancreatic masses. *Arch Surg* 1999; 134:639-643.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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
32. 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.
33. 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.
34. 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.
35. Rösch T, Lorez M, Braig C, et al. Endoscopic ultrasound in pancreatic tumor diagnosis. *Gastrointest Endosc* 1991; 37: 347-352.

36. 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.
37. Brugge WR. The role of EUS in the diagnosis of cystic lesions of the pancreas. *Gastrointest Endosc* 2000; 52(6S):S18-22.
38. Brugge WR, Lewandrowski K, Lee-Lewandrowski E, Centeno BA, Szydlo T, Regan S, del Castillo CF, Warshaw AL. Diagnosis of pancreatic cystic neoplasms: a report of the cooperative pancreatic cyst study. *Gastroenterology*. 2004 May; 126(5):1330-6.
39. 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.
40. Pera M. Epidemiology of esophageal cancer, especially adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction. *Recent Results Cancer Res* 2000; 155:1-14.
41. Siewert JR, Fink U, Beckurts KTE, Roder JD. Surgery of squamous cell carcinoma of the esophagus. *Ann. Oncol.* 1994; 5:1.
42. 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.
43. Fleming ID, Cooper JS, Henson DE, et al. In: *AJCC Cancer Staging Manual*. Lippincott-Raven (Eds), Philadelphia, 1997.P.
44. 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.
45. 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.
46. 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.

47. 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.
48. 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.
49. Murata Y, Suzuki S, Hashimoto H. endoscopic ultrasonography of the upper gastrointestinal tract. *Surg Endosc.* 1988;2:180-183.
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. *Hepato-gastroenterol.* 1990; 37:376-381.
51. 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.
53. 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.
54. 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.
55. 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.
56. Catalano MF, Sivak MV Jr, Rice T, et al. Endosonography features predictive of lymph node metastasis. *Gastrointest. Endosc.* 1994; 40:442.
57. 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.

58. 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.
59. 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.
60. Harewood GC, Wiersema J. A cost analysis of endoscopic ultrasound in the evaluation of esophageal cancer. *Am J of Gastroenterol* 2002; 97:452-458.
61. Siewert JR, Fink U, Sendler A, et al. Gastric cancer. *Curr Probl Surg* 1997; 34:835-942.
62. Pratt BL, Greene FL. Role of laparoscopy in the staging of malignant disease. *Surg Clin North Am* 2000; 80:1111-26.
63. Fink U, Stein HJ, Schuhmacher C, et al. Neoadjuvant chemotherapy for gastric cancer: Update. *World J Surg* 1995; 19:509-516.
64. Botet JF, Lightdale CJ, Zauber 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.
65. 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.
66. 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.
67. R.Fuenmayor, G.Fernández-Esparrach, A.Ginès, A.Seoane, MT.Soria, M.Pellisè, 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.
68. Castells A, Kroser J, Rustgi AK. Gastrointestinal neoplasms. En: Beers MH, Berkow R, eds. *The Merck Manual of Geriatrics*. 3<sup>rd</sup> ed. Merck & Co., West Point, 2000: 1134-1153.

69. Castells A, Piqué JM. Tumores intestinales. En: Farreras V, Rozman C, eds. Medicina Interna. 14<sup>a</sup> ed. Harcourt, Madrid, 2000: 261-272.
70. 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.
71. 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.
72. 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.
74. 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.
75. Hildebrandt U, Feifel G. Preoperative staging of rectal cancer by intrarectal ultrasound. Dis Colon Rectum 1985; 28: 42-46.
76. 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.
77. 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.
78. Rifkin MD, Ehrlich SM, Marks G. Staging of rectal carcinoma: prospective comparison of endorectal US and CT. Radiology 1989; 170: 319-22.
79. Hawes RH. New staging techniques. Endoscopic ultrasound. Cancer. 1993 Jun 15;71(12 Suppl):4207-13.
80. 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.

81. 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.
82. Beynon J, McC.Mortensen NJ, Foy DMA, Channer JL, Rigby H, Virjee J. Preoperative assessment of mesorectal lymph node involvement in rectal cancer. *Br J Surg* 1989; 76: 276-79.
83. 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.
84. 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.
85. 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.
86. Harewood GC. Assessment of clinical impact of endoscopic ultrasound on rectal cancer. *Am J Gastroenterol*. 2004 Apr;99(4):623-7.
87. 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.
88. Hoffman PC, Mauer AM, Vokes EE. Lung cancer. *The Lancet* 2000;355:479-485.
89. Mountain CF. Revisions in the International System for staging lung cancer. *Chest* 1997; 11: 1710-1717.
90. 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.
91. Wang KP, Brower R, Haponik EF, et al. Flexible transbronchial needle aspiration for staging of bronchogenic carcinoma. *Chest* 1983;84:571-576.

92. 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.
93. 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.
94. 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.
95. 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.
96. 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.
97. Kondo D, Imaizumi M, Abe T, et al. Endoscopic ultrasound examination for mediastinal lymph node metastases of lung cancer. *Chest* 1998;3:586-593.
98. 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.
99. Silvestri GA, Hoffman BJ, Bhutani MS, et al. Endoscopic ultrasound with fine-needle aspiration in the diagnosis and staging of lung cancer. *Ann Thorac Surg* 1996;61:1441-6.
100. Hünerbein 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.
101. Wallace MB, Silvestri GA, Sahai AV, Hawes RH, Hoffman BJ, Durkalski V, Hennessey 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.

102. Aabaken L, Silvestri GA, Hawes R, Reed CE, Marsi V, Hoffman B. Cost-efficacy of endoscopic ultrasonography with fine-needle aspiration vs. Mediastinostomy in patients with lung cancer and suspected mediastinal adenopathy. *Endoscopy* 1999;31(9):707-711.
103. Fritscher-Ravens A. Endoscopic ultrasound evaluation in the diagnosis and staging of lung cancer. *Lung Cancer*. 2003 Sep;41(3):259-67. Review
104. Wallace MB, Ravenel J, Block MI, Fraig M, Silvestri G, Wildi S, Schmulewitz N, Varadarajulu S, Roberts S, Hoffman BJ, Hawes RH, Reed CE. Endoscopic ultrasound in lung cancer patients with a normal mediastinum on computed tomography. *Ann Thorac Surg*. 2004 May;77(5):1763-8.
105. 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.
106. 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.
107. Tada M, Omata M, Ohto M. Clinical application of ras gene mutations for diagnosis of pancreatic adenocarcinoma. *Gastroenterology* 1991;100:233-8.
108. 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.
109. 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.
110. 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.
111. 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.



112. 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.
113. 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.
114. 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.
115. 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.
116. 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.
117. Bos JL. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1988; 49:4682-9
118. Gusterson B, Ott R. Occult axillary lymph-node micrometastases in breast cancer. *Lancet* 1990;336:434-435.
119. 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.
120. Braun S, Pantel K, Müller P, Janni W, Hepp F, Kentenich 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.
121. 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.
122. 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

123. 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.
124. Ajsaka H, Miwa K. Micrometastases in sentinel nodes of gastric cancer. *Br J Cancer*. 2003 Aug 18;89(4):676-80
125. Sanchez-Cespedes, M., Esteller, M., Hibi, K., Cope, F. O., Westra, W. H., 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
126. 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.
127. 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.
128. 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.
129. 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.
130. 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.
131. 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.

132. 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.
133. Bessa, X., Pinol, V., Castellvi-Bel, S., Piazuelo, 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.
134. 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.
135. 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.
136. 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.
137. 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.
138. Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 1986; 321: 209-13.
139. Wajed, S. A., Laird, P. W., and DeMeester, T. R. DNA methylation: an alternative pathway to cancer. *Ann Surg*, 234: 10-20., 2001.
140. Esteller, M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene*, 21: 5427-5440., 2002.
141. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*. 2003; 349(21):2042-54.
142. Esteller, M., Corn, P.G., Baylin, S.B., et al. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res*, 2001; 61: 3225-3229.

143. Fraga MF, Esteller M. DNA Methylation: a profile of methods and applications. *Biotechniques* 2002; 33: 632-49, 2002.
144. 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.
145. 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.
146. 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.
147. Palmisano WA, Divine KK, Saccomanno G, et al. Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. *Cancer Res.* 2000; 60:5954-8.
148. 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.
149. 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.
150. 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.
151. 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.
152. 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.
153. Tada M, Omata M, Ohto M. Clinical application of ras gene mutations for diagnosis of pancreatic adenocarcinoma. *Gastroenterology* 1991; 100:233-8.
154. 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.