

Determinación de mutaciones K-ras y actividad telomerasa en muestras de punción-aspiración (PAAF) de masas pancreáticas. Resultados preliminares*

J. Mora¹, A. Farré², E. Montserrat³, L. Comas¹, E. Urgell¹, N. Rico¹, A. Antonijuan¹, M. Grau¹, R. Boluda¹, P. Giner¹, F. González-Sastre¹.

Resumen

Objetivo: Evaluar si la determinación de la actividad telomerasa permite aumentar la sensibilidad diagnóstica de la detección de mutaciones K-ras en muestras de punción-aspiración con aguja fina (PAAF) pancreáticas y contribuye a mejorar el diagnóstico citológico.

Material y métodos: Se han obtenido de forma prospectiva 33 muestras de PAAF de masas pancreáticas de pacientes con sospecha clínica de cáncer de páncreas (21 hombres y 12 mujeres). Los diagnósticos fueron: 17 adenocarcinomas pancreáticos, 5 otros tumores malignos, 4 tumores neuroendocrinos y 7 patologías benignas (2 pancreatitis crónicas, 4 pancreatitis agudas y 1 colecistitis). La actividad telomerasa fue determinada mediante un método semicuantitativo comercial (PCR-TRAP y medición mediante ELISA). La detección de mutaciones en el codón 12 del gen K-ras se realizó según los métodos RFLP/PCR descritos.

Resultados: En nuestro estudio, la actividad telomerasa no incrementó la sensibilidad diagnóstica obtenida mediante la detección de mutaciones K-ras en el grupo de adenocarcinoma pancreático, que fue de 12/17 (71%). Las 5 muestras de PAAF negativas para K-ras lo fueron también para actividad telomerasa. En el grupo de otros tumores malignos la actividad telomerasa fue positiva en 2/5 mientras que K-ras era positivo únicamente en 1 caso. No se detectó mutación K-ras ni actividad telomerasa en el grupo de tumores neuroendocrinos ni en patología benigna. En 3 casos de adenocarcinomas pancreáticos con citología no valorable, el K-ras fue positivo en los 3 casos y la telomerasa en uno de ellos. Asimismo en un caso de pancreatitis aguda con citología sospechosa tanto K-ras como telomerasa fueron negativos.

Conclusiones: La actividad telomerasa no aumentó la sensibilidad diagnóstica del K-ras en las muestras de adenocarcinoma pancreático aunque fue más sensible en el diagnóstico del grupo otros tumores malignos. Tanto K-ras como actividad telomerasa contribuyeron al diagnóstico citológico en los casos no concluyentes.

Palabras Clave: Mutaciones K-ras, actividad telomerasa, cáncer de páncreas, técnicas basadas en polimorfismos de fragmentos de restricción (RFLP), punción-aspiración aguja fina (PAAF).

Summary. Detection of K-ras mutations and telomerase activity in fine-needle aspirates of pancreatic masses. Preliminary results.

Purpose: We aimed to determine whether telomerase activity increases the diagnostic sensitivity of K-ras mutation analysis, helping to improve cytological diagnosis in pancreatic FNA samples.

Material and methods: We prospectively analysed 33 FNA samples of pancreatic masses from patients with clinically suspected pancreatic cancer (21 men, 12 women). Final diagnoses were 17 pancreatic adenocarcinomas, 5 other malignancies, 4 neuroendocrine tumors and 7 benign diseases (2 chronic pancreatitis, 4 acute pancreatitis and 1 cholecystitis). Telomerase activity was measured by a semiquantitative commercial method (PCR-TRAP and ELISA). Codon 12 K-ras mutations were detected by RFLP-PCR analysis.

Results: Telomerase activity did not increase the diagnostic sensitivity, 12/17 (71%) obtained with K-ras mutation detection in the pancreatic adenocarcinoma group. The 5 K-ras negative FNA samples were also telomerase activity negative. In the other malignancy group, telomerase activity was positive in 2/5 while K-ras was positive only in 1 case. Neither K-ras mutation nor telomerase activity were detected in the neuroendocrine tumors or benign disease groups. K-ras was positive in all 3 cases of pancreatic adenocarcinomas with non-conclusive cytology and telomerase activity in one. Moreover, both K-ras and telomerase activity were negative in one case of acute pancreatitis with suspicious cytology.

Conclusions: Telomerase activity did not increase the diagnostic sensitivity of K-ras in adenocarcinoma pancreatic samples although it was more sensitive in the diagnosis of the other malignancy group. Both K-ras and telomerase activity contribute to cytological diagnosis in non-conclusive cases.

Key words: K-ras mutations, telomerase activity, pancreatic neoplasms, restriction fragment length polymorphism techniques (RFLP), fine-needle aspirates (FNA).

INTRODUCCIÓN

El adenocarcinoma ductal pancreático, que representa el 90% de los cánceres pancreáticos, presenta una incidencia anual de la sociedad occidental de 10/100.000 habitantes de la población total, en progresivo aumento en los últimos 50 años. Es la cuarta y la sexta causa de muerte por cáncer en España en

¹Servicio de Bioquímica Clínica. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona.

²Servicio de Patología Digestiva. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona.

³Servicio de Radiodiagnóstico. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona.

* Este trabajo corresponde a una comunicación científica presentada y premiada en el XXIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, celebrado en Cádiz el 20,21 y 22 de octubre de 2004.

mujeres y varones, respectivamente (1), y presenta la supervivencia más baja cuando se compara con cualquier otra neoplasia (2). Es más común en el varón que en la mujer (2:1) y en el 80% de los casos sucede entre los 60 y 80 años de edad (2,3). El pronóstico de la enfermedad es extremadamente malo. La resección quirúrgica es el único tratamiento potencialmente curativo, aunque del 15-20% de los pacientes que presentan enfermedad operable en el momento del diagnóstico únicamente alrededor de un 20% de ellos sobrevive hasta los 5 años (4). Así pues, el índice de supervivencia a los 5 años sigue siendo en la actualidad inferior al 3,5% a pesar de los avances en el tratamiento de este tumor. La mejora en el pronóstico de estos pacientes pasa por el desarrollo de nuevas estrategias que permitan el diagnóstico precoz del cáncer de páncreas.

Cuando existe una sospecha clínica de cáncer de páncreas y puede identificarse una masa mediante técnicas de imagen habituales (ecografía percutánea o tomografía computerizada), se procede a realizar una punción-aspiración con aguja fina (PAAF) guiada con el fin de obtener un material que, en muchos casos, puede ser el único asequible para el establecimiento del diagnóstico.

La alta incidencia de mutaciones en el codón 12 del gen K-*ras* (65-100%) en cáncer de páncreas, y que dichas mutaciones aparezcan en las fases más precoces de la oncogénesis pancreática, permiten que K-*ras* sea considerado como el marcador molecular idóneo en cáncer de páncreas (4). La detección de mutaciones K-*ras* ha sido descrita en diferentes tipos de muestras, como PAAF de masas pancreáticas (5-8), jugos pancreáticos (9-12), jugos duodenales (13) y muestras de heces (14) de pacientes con sospecha de cáncer de páncreas como estrategia de detección precoz. La detección de mutaciones K-*ras* en estas muestras puede mejorar la eficacia diagnóstica del estudio citológico (15,16). No obstante, las mutaciones K-*ras* han sido descritas, no únicamente en carcinomas intraductales, sino también en hiperplasias mucinosas del páncreas (17) y en muestras de jugo pancreático de pacientes con pancreatitis crónica (9-11, 16) lo cual limitaría su potencial diagnóstico. En un contexto de significación pronóstica, las mutaciones K-*ras* han sido también evaluadas en muestras de plasma de pacientes con cáncer de páncreas (18).

La telomerasa es una ribonucleoproteína que actúa compensando el acortamiento del telómero durante la replicación del ADN. Los telómeros son estructuras especializadas que consisten en secuencias repetidas de hexanucleótidos TTAGGG, situadas en los extremos de los cromosomas, y que tienen como función proteger y mantener la estabilidad de los mismos. La enzima telomerasa ejerce como una transcriptasa inversa añadiendo secuencias teloméricas al extremo del telómero. Para ello consta de una región catalítica denominada transcriptasa inversa de la telomerasa, hTERT, y una subunidad de ARN denominada hTR, que sirve de molde para la síntesis de nuevas secuencias teloméricas. La subunidad hTERT sería en realidad la única con actividad enzimática propiamente dicha. Sin embargo, la actividad telomerasa solamente se mantiene en los primeros estadios del desarrollo y en las células que conservan la capacidad replicativa como las células madre o células germinales. Esta actividad no se encuentra en las células maduras ya que éstas tienen limitado el número de divisiones hasta una situación límite de acortamiento telomérico que induce a la apoptosis. Las células que reactivan la actividad telomerasa pueden inmortalizarse; este proceso conduce a la formación y el crecimiento tumoral,

escapando la célula a su fase de senectud. Así pues, la activación de la actividad telomerasa ha sido implicada en la inmortalización de las células humanas y en la patogenia del cáncer. La actividad telomerasa es indetectable en la mayoría de células y tejidos normales y puede ser detectada en el 80-95% de los tumores malignos. También se ha relacionado con la malignidad del tumor, asociándose a un peor pronóstico y a una agresividad mayor (19-21).

La posibilidad de realizar un análisis molecular en el material de PAAF de masas pancreáticas permite un diagnóstico en estadios iniciales y contribuye al diagnóstico citológico en los casos donde la citología no es concluyente o es negativa. En un estudio previo prospectivo (22) nuestro grupo demostró la utilidad diagnóstica de la detección de mutaciones en el codón 12 del gen K-*ras* en muestras de PAAF pancreáticas como un complemento al estudio citológico en casos de citología negativa, en presencia de células sospechosas o cuando la citología informaba de material insuficiente, sin que en ningún caso se informara de falsos positivos. La actividad telomerasa ha sido también descrita en muestras de PAAF de nódulos tiroideos, mamarios, de pulmón y pancreáticos (23,25) con la finalidad del diagnóstico diferencial entre nódulo benigno y maligno y en muestras de jugo pancreático (26).

El objetivo del presente trabajo ha sido evaluar si la determinación de la actividad telomerasa permite aumentar la sensibilidad diagnóstica de la detección de mutaciones K-*ras* en muestras de PAAF y contribuye a mejorar el diagnóstico citológico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes y muestras

Se han obtenido de forma prospectiva 33 muestras de PAAF de masas pancreáticas de pacientes con sospecha clínica de cáncer de páncreas (21 hombres y 12 mujeres; edad media: 64 años, intervalo: 36-87 años) y que, una vez separado el material enviado a Patología para su diagnóstico citológico, han sido inmediatamente congeladas. Los diagnósticos fueron: 17 adenocarcinomas pancreáticos, 5 otros tumores malignos, 4 tumores neuroendocrinos y 7 patologías benignas (2 pancreatitis crónicas, 4 pancreatitis agudas y 1 colecistitis). El material celular enviado a Bioquímica se guarda a -80°C hasta su análisis molecular; en este momento, la muestra se descongela en hielo y se divide en dos partes iguales, una para la determinación de mutaciones en el codón 12 del gen K-*ras*, que puede mantenerse a temperatura ambiente, y la otra para el análisis de la actividad telomerasa que ha de manipularse siempre a 4°C para mantener la integridad del componente ARN de la enzima telomerasa.

Detección de Mutaciones en el codón 12 del gen K-*ras*

La extracción del ADN se realizó en el material celular lisado con proteinasa K y SDS siguiendo el método estándar del fenol-cloroformo-álcohol isoamílico y posterior precipitación con isopropanol. El ADN, una vez precipitado y tras unos lavados con etanol al 70%, se resuspendió en 50 μL de agua autoclavada.

La detección de mutaciones en el codón 12 del gen K-*ras* se realizó mediante dos técnicas basadas en los polimorfismos de los fragmentos de restricción (RFLP) para la enzima *Bst*NI en productos amplificados mediante la reacción en cadena por la polimerasa (PCR): método estándar no enriquecido (NE-

RFLP/PCR), con una detección de 1 alelo mutado en hasta 10^2 alelos normales y método enriquecido por digestión enzimática continua (CED-RFLP/PCR) que consigue detectar 1 alelo mutado en hasta 10^4 alelos normales. La descripción de estos métodos ha sido realizada en trabajos previos (22, 27-30). Los fragmentos obtenidos con estos métodos son de 143 pb cuando el alelo está mutado y de 114 pb cuando el alelo es normal y se visualizan en un gel de poliacrilamida al 8% tras tinción con bromuro de etidio. Con la incorporación del control de digestión en ambas técnicas es posible distinguir claramente una muestra que contiene la mutación de una muestra mal digerida; para que una muestra sea positiva, la banda correspondiente al alelo mutado tiene que ser más intensa que la banda del control de digestión (128 pb).

Caracterización de las Mutaciones

La caracterización de las mutaciones obtenidas en el codón 12 del gen *K-ras* se realizó mediante el método de los polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP) descrito anteriormente (18). Las condiciones de la reacción de amplificación mediante PCR son las descritas para el método NE utilizando en la primera PCR los cebadores K1USO (5'-GGTGGAGTATTTGATAGTGTA-3') y DD5P (5'-TCATGAAATGGTCAGAGAA-3'), y en la segunda PCR los cebadores K1USO y K1DSO (5'-GGTCTGCACCAGTAATATGCA-3'). Posteriormente 15 μ L del producto amplificado se diluyeron en 45 μ L de tampón desnaturalizante (formamida-xilenocianol-azul de bromofenol-EDTA) y se incubaron 4 minutos a 95°C. A continuación los tubos se enfriaron durante 5 minutos en hielo y se cargaron en un gel de poliacrilamida al 12%. La electroforesis se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 18-20 horas a una potencia de 5W. El gel fue teñido con plata y secado al vacío a 85°C. En cada gel de procesaron controles para cada una de las diferentes mutaciones: aspártico (GAT), valina (GTT), arginina (CGT) y cisteína (TGT), así como el control negativo que codifica para glicina (GGT). Las bandas de movilidad anómalas de las muestras se compararon con las bandas de los diferentes controles para caracterizar el tipo de mutación.

Análisis de la actividad telomerasa

La determinación de la actividad telomerasa se realizó mediante un método comercial TRAP-ELISA (TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA®, Roche Diagnostics GmbH, Alemania) que se basa en el protocolo de amplificación de secuencias repeti-

das teloméricas (TRAP) original de Kim et al. (31) adaptado a una detección colorimétrica de los productos amplificados que reemplaza a la electroforesis con detección radiactiva descrita en el método TRAP convencional. La concentración de proteínas en el extracto celular obtenido tras incubación en hielo con el tampón de lisis, incluido en el equipo de reactivos, se midió mediante el método del azul brillante de Coomassie G-250 (Bio-Rad, California, USA). El método TRAP-ELISA consta de 3 etapas: la elongación del telómero, la amplificación mediante PCR y la detección del producto mediante ELISA. En la etapa de elongación, la telomerasa presente en el extracto celular (la concentración óptima para iniciar esta reacción es de 1-3 μ g de proteína) añade las secuencias teloméricas (TTAGGG) al extremo 3' del oligonucleótido marcado con biotina (P1-TS). Estos productos de elongación marcados con biotina son amplificados por PCR (utilizando los oligonucleótidos P1-TS y P2 suministrados y siguiendo las condiciones del fabricante). Para la reacción en cadena de la polimerasa se utilizó un equipo PTC-100® (MJ Research, Nevada, USA). A continuación una alícuota del producto marcado y amplificado por PCR se somete a desnaturalización y se hibrida con una sonda, específica para secuencias teloméricas, marcada con digoxigenina. El producto resultante se inmoviliza en una placa de 96 pocillos recubiertos de estreptavidina a través de la unión estreptavidina-biotina. El complejo formado se detecta incubando con un anticuerpo anti-digoxigenina marcado con peroxidasa y, la absorbancia final obtenida, tras la adición del substrato tetrametilbenzidina (TMB) y posterior reactivo de detención de color, se mide a 450 nm (con una absorbancia de referencia a 690 nm). Al valor de absorbancia obtenido para cada muestra ($A_{450nm} - A_{690nm}$) se le resta la absorbancia de su correspondiente control negativo (para cada muestra se prepara una alícuota en la cual se destruye la actividad telomerasa mediante incubación a 37°C). Este método TRAP-ELISA es semicuantitativo; a partir de una absorbancia $> 0,2 A_{450nm} - A_{690nm}$ unidades se informa de actividad telomerasa positiva. El control positivo comercial suministrado presenta una absorbancia $> 1,5 A_{450nm} - A_{690nm}$ unidades.

RESULTADOS

En la tabla I se indican los resultados obtenidos del estudio de la detección de mutaciones *K-ras* y/o actividad telomerasa en las 33 muestras de PAAF de masas pancreáticas de pacientes

Tabla I. Detección de mutaciones *K-ras* y/o actividad telomerasa en muestras de punción-aspiración de masas pancreáticas

Diagnósticos	n	Mutaciones <i>K-ras</i>	Mutaciones <i>K-ras</i> y/o Actividad Telomerasa
• Patología Tumoral			
– Adenocarcinomas Pancreáticos	17	12/17 (71%)	12/17 (71%)
– Otros Tumores Malignos			
• M ₁ Pulmón	1	0/1	0/1
• Adenocarcinoma Retroperitoneal	1	0/1	1/1
• Sarcoma Retroperitoneal	1	1/1	1/1
• Colangiocarcinomas	2	0/2	0/2
– Tumores Neuroendocrinos	4	0/4	0/4
• Patología Benigna			
– Pancreatitis Crónica	2	0/2	0/2
– Pancreatitis Aguda	4	0/4	0/4
– Colecistitis	1	0/1	0/1

con sospecha clínica de cáncer de páncreas. La mutación K-ras se detectó en 12 de los 17 adenocarcinomas pancreáticos y en uno de los otros tumores malignos (sarcoma retroperitoneal metastásico). No hubo diferencias en la detección de mutaciones utilizando el método estándar (NE-RFLP/PCR) o el método más sensible enriquecido por digestión enzimática continua (CED-RFLP/PCR). Las 7 muestras de PAAF correspondientes a masas benignas no evidenciaron en ningún caso la mutación K-ras. Las muestras positivas para K-ras, detectadas mediante los métodos NE y CED descritos (detección de 1 alelo mutado en hasta 10^2 y 10^4 alelos normales respectivamente), se caracterizaron mediante el método SSCP que tiene una sensibilidad menor (detección de 1 alelo mutado en hasta 50 alelos normales). La caracterización fue posible en 10/13 muestras positivas y los resultados fueron: 4 mutaciones aspártico, 4 mutaciones valina y 2 mutaciones cisteína; en 3 muestras la sensibilidad del método fue insuficiente para poder ser caracterizadas. Los adenocarcinomas positivos para la mutación K-ras presentaron los siguientes estadios tumorales: 3 II, 5 III y 4 IV y los negativos 4 II y 1 IV.

El estudio de la actividad telomerasa no incrementó la sensibilidad de la detección de mutaciones K-ras en ninguna de las muestras de adenocarcinoma pancreático. La actividad telomerasa fue positiva en una muestra del grupo otros malignos (adenocarcinoma retroperitoneal) que no presentaba la mutación K-ras.

En la figura 1 se muestra el patrón de bandas obtenido en un gel de poliacrilamida al 8% cuando se utiliza el método CED-RFLP/PCR para la detección de mutaciones K-ras el cual, mediante digestión continua del alelo normal (114 pb), permite el enriquecimiento del alelo mutado (143 pb). Como controles positivo y negativo (C⁺ y C⁻) se utilizaron dos líneas celulares pancreáticas, la NP9 y la NP18 que son positivas y negativas para la mutación, respectivamente. En cada gel se incorporaban también controles de reactivos de la PCR (H) para asegurar la no-contaminación del experimento y el marcador de peso molecular (ϕ x 174, Hae III). Las bandas obtenidas tras caracterización mediante gel SSCP se presentan en la figura 2.

La contribución de la detección de mutaciones K-ras y actividad telomerasa al diagnóstico citológico se indica en la tabla II. En un total de 6/33 (18%) muestras de PAAF el diagnóstico citológico no fue concluyente (3 casos informados de sospechosos de malignidad y 3 casos de material insuficiente). La detección de mutaciones K-ras y el estudio de la actividad telomerasa contribuyeron al diagnóstico en 6/6 y en 4/6 respectivamente; de estas 6 muestras, 3 eran adenocarcinomas pancreáticos (2 con citología sospechosa y 1 material insuficiente) y todos fueron positivos para la mutación K-ras, siendo uno de ellos, con citología sospechosa, positivo también para la actividad telomerasa; de las 3 muestras restantes con diagnóstico de no adenocarcinoma correspondientes a 1 colangiocarcinoma (material insuficiente) y a 2 pancreatitis agudas (1 sospechosa de malignidad y 1 material insuficiente) todas fueron negativas para la mutación K-ras y para la actividad telomerasa.

DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio confirman que la determinación de mutaciones K-ras en muestras de PAAF de masas pancreáticas ofrece una alta sensibilidad y especificidad para

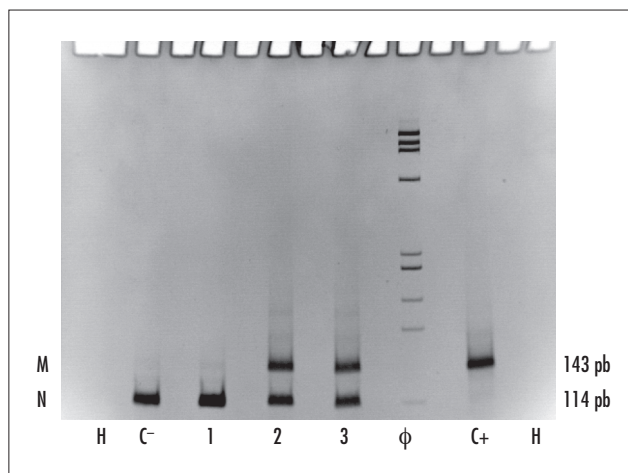


Figura 1 Método CED-RFLP/PCR : método enriquecido por digestión enzimática continua de los polimorfismos de los fragmentos de restricción en productos amplificados mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Control negativo (C⁻), control positivo (C⁺), marcador de peso molecular (ϕ x 174, Hae III), muestra negativa (1), muestras positivas (2,3) y control de reactivos (H). La banda que corresponde al alelo mutado (M) es de 143 pares de bases y la banda del alelo normal (N) de 114 pb.

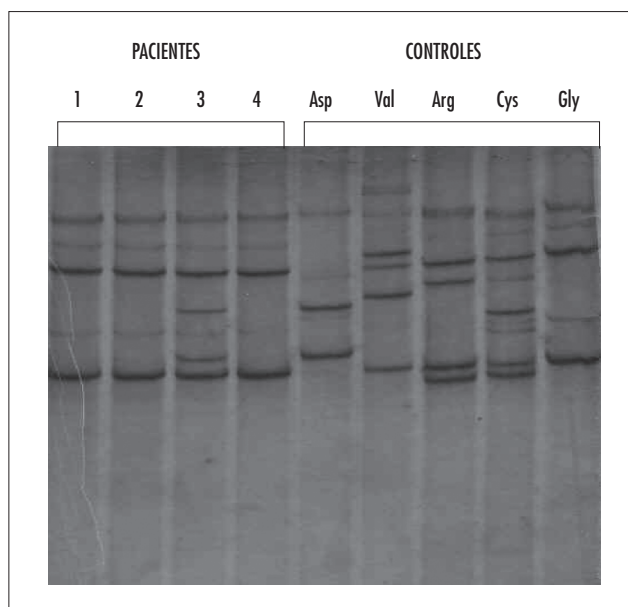


Figura 2 Gel SSCP con muestras de pacientes (1-4) y controles para la caracterización de mutaciones en el codón 12 del gen K-ras. Muestras negativas (1,2 y 4) con patrón de bandas correspondiente a glicina y muestra positiva (3) con patrón de bandas correspondiente a la mutación aspártico.

el diagnóstico del cáncer de páncreas, detectándose 12/17 (71%) de las muestras de PAAF de adenocarcinoma pancreático y siendo su determinación negativa en todas las muestras de PAAF de masas benignas. Esta sensibilidad obtenida fue la misma utilizando el método estándar (NE-RFLP/PCR) o el método enriquecido (CED-RFLP/PCR) indicando que, en estas muestras positivas, la mutación K-ras estaba presente en una fracción elevada de células (por lo menos en la proporción de 1 célula mutada entre 100 células normales). La sensibilidad de detección de mutaciones K-ras en muestras de PAAF

Tabla II. Contribución de la detección de mutaciones K-ras y actividad telomerasa al diagnóstico citológico

Citología	n	Mutaciones K-ras	Actividad Telomerasa
• Sospechosa de Malignidad			
– Adenocarcinomas Pancreáticos	2	2/2	1/2
– Pancreatitis Aguda	1	0/1	0/1
• No Valorable por Material Insuficiente			
– Adenocarcinoma Pancreático	1	1/1	0/1
– Colangiocarcinomas	1	0/1	0/1
– Pancreatitis Aguda	1	0/1	0/1

de masas pancreáticas, en trabajos anteriores de nuestro grupo, osciló entre 63% y 81% dependiendo de la sensibilidad del método utilizado (22, 28). Estudios recientes presentan, en este tipo de muestras, sensibilidades del mismo orden, entre 74% (31), 77% (32) y 79% (8). Aunque la presencia de mutaciones en tumores papilares mucinosos es controvertida y asociada frecuentemente a pancreatitis crónica (17), en nuestro estudio no se detectaron falsos positivos en muestras de PAAF de masas pancreáticas benignas, corroborando los datos publicados en diversos trabajos (5,8,22,28,29,32) en donde la especificidad de la detección de mutaciones K-ras en punciones benignas era del 100% incluso en tumores papilares mucinosos (8). Los tipos de mutaciones detectadas fueron 4 mutaciones aspártico, 4 mutaciones valina y 2 mutaciones cisteína, siendo aspártico y valina las mutaciones más frecuentes detectadas en cáncer de páncreas (33).

La actividad telomerasa no incrementó en estas muestras la sensibilidad obtenida con la detección de mutaciones K-ras (71%); las 5/17 muestras de adenocarcinoma pancreático que fueron negativas para la mutación K-ras lo fueron también para la actividad telomerasa. Únicamente en una muestra del grupo de otros tumores malignos, correspondiente a un adenocarcinoma retroperitoneal, la actividad telomerasa fue positiva cuando la detección de mutaciones K-ras era negativa. Respecto a la sensibilidad de la actividad telomerasa utilizando el método TRAP, los datos publicados en cáncer de páncreas oscilan entre 35% (34) y 95% (35) cuando se analizan muestras de tejidos y entre 62% (36) y 78% (37) al analizar muestras de PAAF o jugos pancreáticos. En el grupo de otros tumores malignos la actividad telomerasa fue positiva en 2/9 (22%) en concordancia con el 25% publicado (36). Las especificidades descritas en estos estudios oscilan entre 67% y 100% en pancreatitis crónica y entre 86% y 100% en tejidos normales (35-37). En nuestro caso la especificidad en patología benigna fue del 100% (7/7).

Tanto la detección de mutaciones K-ras como la determinación de la actividad telomerasa contribuyeron al diagnóstico citológico en los casos no concluyentes (por células sospechosas o por material insuficiente) pero nuevamente la contribución de la detección de mutaciones K-ras fue superior (6/6) respecto a la de la telomerasa (4/6).

En conclusión, a diferencia de otros autores que apuntan hacia la complementariedad de las dos determinaciones moleculares (37, 38), en nuestro caso la actividad telomerasa no permitió detectar ninguno de los 5 adenocarcinomas pancreáticos que eran K-ras negativos. No obstante, tanto la determinación de actividad telomerasa como la detección de mutaciones K-ras contribuyeron al diagnóstico citológico en los casos

no concluyentes (por células sospechosas o por material insuficiente) tal como se indicaba en publicaciones anteriores (15, 22, 25, 33, 37, 38).

Correspondencia:
Josefina Mora Brugués.
Servei de Bioquímica Clínica.
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.
Antoni M. Claret 167. 08025 Barcelona.
e-mail: jmora@hsp.santpau.es

BIBLIOGRAFÍA

- González JR, Sánchez V, Borràs JM. La mortalitat per càncer. En: Institut Municipal de Salut Pública, editors. El càncer a Barcelona 2001. 1ª ed. Barcelona 2001; p.7-26.
- Di Magno EP, Reber HA, Tempero MA. AGA technical review on the epidemiology, diagnosis, and treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gastroenterology* 1999; 117: 1464-84.
- Malats N, Costafreda S. Epidemiología del cáncer de páncreas. *Gastroenterol Hepatol* 1999; 22: 438-43.
- Li D, Xie K, Wolff R, Abbruzzese JL. Pancreatic cancer. *Lancet* 2004; 363: 1049-57.
- Urban T, Ricci S, Grange JD, Lacave R, Boudghene F, Breittmayer F, et al. Detection of c-Ki-ras mutation by PCR/RFLP analysis and diagnosis of pancreatic adenocarcinomas. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 2008-12.
- Villanueva A, Reyes G, Cuatrecasas M, Martínez A, Erill N, Lerma E, et al. Diagnostic utility of K-ras mutations in fine-needle aspirates of pancreatic masses. *Gastroenterology* 1996; 19: 1587-94.
- Pabst B, Arps S, Binmoeller K, Thul R, Walsemann G, Fenner C, et al. Analysis of K-ras mutations in pancreatic tissue after fine needle aspirates. *Anticancer Res* 1999; 19: 2481-3.
- Tada M, Komatsu Y, Kawabe T, Sasahira N, Isayama H, Toda N, et al. Quantitative analysis of K-ras gene mutation in pancreatic tissue obtained by endoscopic ultrasonography-guided fine needle aspiration: clinical utility for diagnosis of pancreatic tumor. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2263-70.
- Kondo H, Sugano K, Fukayama N, Kyogoku A, Nose H, Shimada K, et al. Detection of point mutations in the K-ras oncogene at codon 12 in pure pancreatic juice for diagnosis of pancreatic carcinoma. *Cancer* 1994; 73: 1589-94.
- Watanabe H, Sawabu N, Songur Y, Yamaguchi Y, Yamakawa O, Sato-mura Y, et al. Detection of K-ras point mutation at codon 12 in pure pancreatic juice for the diagnosis of pancreatic cancer by PCR-RFLP analysis. *Pancreas* 1996; 12: 18-24.
- Kimura W, Zhao B, Futakawa N, Mutto T, Makuuchi M. Significance of K-ras codon 12 point mutation in pancreatic juice in the diagnosis of carcinoma of the pancreas. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 532-9.
- Okai T, Watanabe H, Yamaguchi Y, Mouri I, Motoo Y, Sawabu N. EUS and K-ras analysis of pure pancreatic juice collected with duodenoscope after secretin stimulation for diagnosis of pancreatic mass lesion: a prospective study. *Gastrointestinal Endosc* 1999; 50: 797-803.
- Iguchi H, Sugano K, Fukayama N, Ohkura H, Sadamoto K, Ohkoshi K, et al. Analysis of Ki-ras codon 12 mutations in the duodenal juice of patients with pancreatic cancer. *Gastroenterology* 1996; 110: 221-6.
- Caldas C, Hahn SA, Hruban RH, Redston MS, Yeo CJ, Kern SE. Detection of K-ras mutations in the stool of patients with pancreatic adenocarcinoma and pancreatic ductal hyperplasia. *Cancer Res* 1994; 54: 3568-73.

15. Urgell E, Puig P, Boadas J, Capellà G, Queraltó JM, Boluda R, et al. Prospective evaluation of the contribution of K-*ras* mutational analysis and CA 19.9 measurement to cytological diagnosis in patients with clinical suspicion of pancreatic cancer. *Eur J Cancer* 2000; 36: 2069-75.
16. Boadas J, Mora J, Urgell E, Puig P, Roca M, Cussó X, 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.
17. Yanagisawa A, Ohtake K, Ohnashi K, Hori M, Kitagawa T, Sugano H, et al. Frequent c-Ki-*ras* oncogene activation in mucous cell hyperplasia of pancreas suffering from chronic inflammation. *Cancer Res* 1993; 53: 953-6.
18. Castells A, Puig P, Mora J, Boadas J, Boix L, Urgell E, et al. K-*ras* mutations in DNA extracted from the plasma of patients with pancreatic carcinoma: diagnostic utility and prognostic significance. *J Clin Oncol* 1999; 17: 578-84.
19. Holt SE, Shay JW. Role of telomerase in cellular proliferation and cancer. *J Cell Physiol* 1999; 180: 10-8.
20. Vasef MA, Ross JS, Cohen MB. Telomerase activity in human solid tumors. Diagnostic utility and clinical applications. *Am J Clin Pathol* 1999; 112: 68-75.
21. Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 1997; 33: 787-91.
22. Mora J, Puig P, Boadas J, Urgell E, Montserrat E, Lerma E, 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.
23. Mora J, Lerma E; Thyroid Neoplasia Study Group. Telomerase activity in thyroid fine needle aspirates. *Acta Cytol* 2004; 48: 818-24.
24. Lerma E, Mora J. Telomerase activity in "suspicious" thyroid cytology. *Cancer* 2005; (en prensa).
25. Pearson AS, Chiao P, Zhang L, Zhang W, Larry L, Katz RL, et al. The detection of telomerase activity in patients with adenocarcinoma of the pancreas by fine needle aspiration. *Int J Oncol* 2000; 17: 381-5.
26. Uehara H, Nakaizumi A, Tatsuta M, Baba M, Takenaka A, Uedo N, et al. Diagnosis of pancreatic cancer by detecting telomerase activity in pancreatic juice: comparison with K-*ras* mutation. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 2513-8.
27. Puig P, Urgell E, Capellà G, Villanueva A, Grau M, Sancho FJ et al. Improved detection of K-*ras* codon 12 mutations in fecal exfoliated cells. *Lab Invest* 1999; 79: 617-8.
28. Urgell E, Puig P, Boadas J, Capellà G, Queraltó JM, Boluda R, et al. Prospective evaluation of the contribution of K-*ras* mutational analysis and CA 19.9 measurement to cytological diagnosis in patients with clinical suspicion of pancreatic cancer. *Eur J Cancer* 2000; 36: 2069-75.
29. Pellisé M, Castells A, Ginés A, Solé M, Mora J, Castellví-Bel S et al. Clinical usefulness of K-*ras* mutational analysis in the diagnosis of pancreatic adenocarcinoma by means of endosonography-guided fine-needle aspiration biopsy. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 1299-307.
30. Mora J, Gómez G, Martínez S, Urgell E, Zapico E, Comas L, et al. Detección tisular de mutaciones K-*ras* en cáncer de pulmón: contribución a los resultados de CEA y CYFRA 21-1 en suero. *Química Clínica* 2004; 23: 20-4.
31. Kim NW, Piatyszek NA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PLC, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; 266: 2011-5.
32. Takahashi K, Yamao K, Okubo K, Sawaki A, Mizuno N, Ashida R, et al. Differential diagnosis of pancreatic cancer and focal pancreatitis by using EUS-guided FNA. *Gastrointest Endosc* 2005; 61: 76-9.
33. Tada M, Tateishi K, Kawabe T, Sasahira N, Isayama H, Komatsu Y, et al. Quantity of mutant K-*ras* gene in pancreatic secretions for diagnosis of pancreatic carcinoma with different assays: analysis of 100 patients. *Clin Chim Acta* 2002; 324: 105-11.
34. Buchler P, Conejo-García JR, Lehmann G, Muller M, Emrich T, Reber HA, et al. Real-time quantitative PCR of telomerase mRNA is useful for the differentiation of benign and malignant pancreatic disorders. *Pancreas* 2001; 22: 331-40.
35. Hiyama E, Kodama T, Shinbara K, Iwao T, Itoh M, Hiyama K, et al. Telomerase activity is detected in pancreatic cancer but not in benign tumors. *Cancer Res* 1997; 57: 326-31.
36. Ohuchida K, Mizumoto K, Ishikawa N, Sato N, Nagai E, Yamaguchi K, et al. A highly sensitive and quantitative telomerase activity assay with pancreatic juice is useful for diagnosis of pancreatic carcinoma without problems due to polymerase chain reaction inhibitors: analysis of 100 samples of pancreatic juice. *Cancer* 2004; 101: 2309-17.
37. Zhou GX, Huang JF, Li ZS, Xu GM, Liu F, Zhang H. Detection of K-*ras* point mutation and telomerase activity during endoscopic retrograde cholangiopancreatography in diagnosis of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1337-40.
38. Myung SJ, Kim MH, Kim YS, Kim HJ, Park ET, Yoo KS, et al. Telomerase activity in pure pancreatic juice for the diagnosis of pancreatic cancer may be complementary to K-*ras* mutation. *Gastrointest Endosc* 2000; 51: 708-13.