

Utilidad de la endomicroscopia confocal láser basada en *probes* (Cellvizio) en gastroenterología

Utility of Probe-based (Cellvizio) Confocal Laser Endomicroscopy in Gastroenterology

Elías Alfonso Forero Piñeros, MD,¹ Héctor José Cardona, MD,² Kunal Karia, MD,³ Amrita Sethi, MD,⁴ Michel Kahaleh, MD.⁵

¹ Gastroenterólogo. Jefe, Servicio de Gastroenterología y Endoscopia, Hospital Central de la Policía. Bogotá, Colombia

² Gastroenterólogo. Jefe, Servicio de Gastroenterología, Hospital Simón Bolívar. Gastro Invest SAS. Bogotá, Colombia

³ Internista. *Fellow*, Endoscopia, Hospital Presbiteriano y Weill Cornell Medical College. Universidad de Cornell. Nueva York, Estados Unidos

⁴ Gastroenteróloga. Endoscopista intervencionista. Universidad de Columbia. Nueva York, Estados Unidos

⁵ Gastroenterólogo. Endoscopista intervencionista. Jefe, Servicio de Endoscopia. Profesor, Clínica Médica, Weill Cornell Medical College. Nueva York, Estados Unidos

Fecha recibido: 08-09-14
Fecha aceptado: 21-07-15

Resumen

La endomicroscopia confocal láser basada en *probes* (Cellvizio de Mauna Kea Technologies, París) es una nueva tecnología que permite, durante cualquier procedimiento endoscópico, realizar análisis histológicos en tiempo real (biopsia óptica), mejorando el diagnóstico y ayudando a definir el tratamiento de múltiples patologías digestivas. Es de resaltar, para nuestro medio, su utilidad en patologías de difícil diagnóstico como son las estenosis biliares indeterminadas y las neoplasias quísticas pancreáticas, cuyo diagnóstico temprano y exacto es muy difícil con las técnicas actualmente disponibles, y que es necesario para definir la realización o la exclusión de tratamientos quirúrgicos de alta morbilidad y alto costo, como por ejemplo, la cirugía de Whipple. En esta revisión se muestran los aportes actuales de esta tecnología, ya disponible en nuestro medio, para el diagnóstico y estudio de las patologías digestivas.

Palabras clave

Endomicroscopia confocal láser, cáncer gastrointestinal, detección temprana.

Abstract

Probe based confocal laser endomicroscopy (Cellvizio Mauna Kea, Paris) is a new technology that allows performance of histological analysis (optical biopsy) during any endoscopic procedure. This improves diagnosis and helps define the treatment needed for multiple digestive diseases. Its utility for diseases that are difficult to diagnose such as indeterminate biliary strictures and pancreatic cystic neoplasms is noteworthy. Early and accurate diagnoses can be very difficult with currently available techniques, but they are exactly what are needed to determine whether or not expensive surgical treatments with great potential morbidity, for example the Whipple procedure, need to be performed. This review looks at the contribution that this technology can make in our country where it is now available for the diagnosis and study of digestive diseases.

Keywords

Confocal laser endomicroscopy, gastrointestinal cancer, early detection.

El cáncer gastrointestinal contribuye de forma importante a la morbilidad y mortalidad global por cáncer. La detección temprana mejora los resultados de los pacientes; sin embargo, la práctica clínica corriente aún no logra realizarla en la mayoría de los casos, lo cual permitiría un tratamiento menos invasivo, menos costoso y más exitoso que el actual (1).

La microscopia confocal endoscópica láser (CLE), también llamada biopsia óptica, se refiere a una nueva tecnología que da imágenes de muy alta resolución, a través de unas sondas de fibra óptica que se pasan por los canales de los equipos de endoscopia: logran una imagen con resolución de 1 a 2 micras (μm) en un campo de visión de 500 a 700 μm aproximadamente. Se capta la imagen de la

luz fluorescente reflejada, producida dentro de las células o en su superficie, por agentes de contraste fluorescentes exógenos tipo fluoresceína, acriflavina o proflavina, entre otros; así, se logra la visualización *in vivo* de la arquitectura microscópica de los tejidos, permitiendo su evaluación y diagnóstico histopatológico inmediato dentro del procedimiento endoscópico (figura 1). Los cambios neoplásicos se acompañan usualmente de un incremento en la densidad de la microvascularización y una pérdida progresiva de su regularidad, así como de una desorganización de la estructura celular y de la capacidad de captación por parte de las células de la fluoresceína, lo que las torna oscuras a esta examinación. De forma general, estos son los hallazgos que se busca diagnosticar precozmente al utilizar esta tecnología.

Los *probes* utilizados para estos estudios consisten en haces coherentes de más de 10000 fibras ópticas en cada uno, con diferentes especificaciones que permiten evaluaciones en diferentes niveles del tracto digestivo y del sistema biliopancreático, con diámetros entre 0,9 y 2,5 mm, diferente resolución y diferente profundidad de examinación. Cada uno tiene una vida media de 20 procedimientos (2); y entre ellos tenemos:

- Esofágico y gástrico (Gastroflex-Mauna Kea): diámetro de 2,6 mm; resolución lateral de 1 μm . Magnifica 1000 veces.
- Biliar (Colangioflex-Mauna Kea): diámetro menor de 1 mm; resolución lateral de 3,5 μm . Magnifica 400 veces (3, 4).
- Intraaguja (AQ-Flex 19-Mauna Kea): para ser pasado a través de agujas de punción guiada por ultrasonido de 19 G. Útil para el estudio de lesiones quísticas pancreáticas. Diámetro de 0,85 mm; campo de visión de 320 μm . Resolución lateral de 3,5 μm . Longitud de 4 m, profundidad de penetración de 30, 40 y hasta 70 μm (5).
- Colónico (Coloflex-Mauna Kea): diámetro de 2,6 mm; resolución de 1 μm . Campo de visión de 240 μm . Penetración de 65 μm (6) (figura 2).

Diez segundos antes de iniciar el examen, se deben inyectar 2,5 mL de fluoresceína intravenosa la cual, aunque

permanece en las células hasta 45 minutos, después de los 8 primeros la calidad de la imagen se deteriora significativamente, por lo que se recomienda realizar la evaluación durante ese período de tiempo inicial. Se pueden presentar reacciones adversas a su administración, entre 1% y 6%, la mayoría leves, y consisten en náuseas, decoloración transitoria de la piel, hipotensión transitoria, eritema en el sitio de la inyección, erupción difusa autolimitada, leve dolor en epigastrio, entre otras. La tasa total de eventos adversos es de 1,4%. No se ha descrito anafilaxia, ni se usa en embarazadas ni en lactantes (7-10).



Figura 2. Equipos: torre y catéteres.

Ocasionalmente, se utiliza la acriflavina como agente de contraste en colon, la cual es tóxica, aunque se ha descrito potencial carcinogénico en animales, lo que ha limitado su uso.

Esta revisión muestra el potencial de la microscopia confocal para mejorar el diagnóstico temprano de las neoplasias digestivas con potencial maligno.

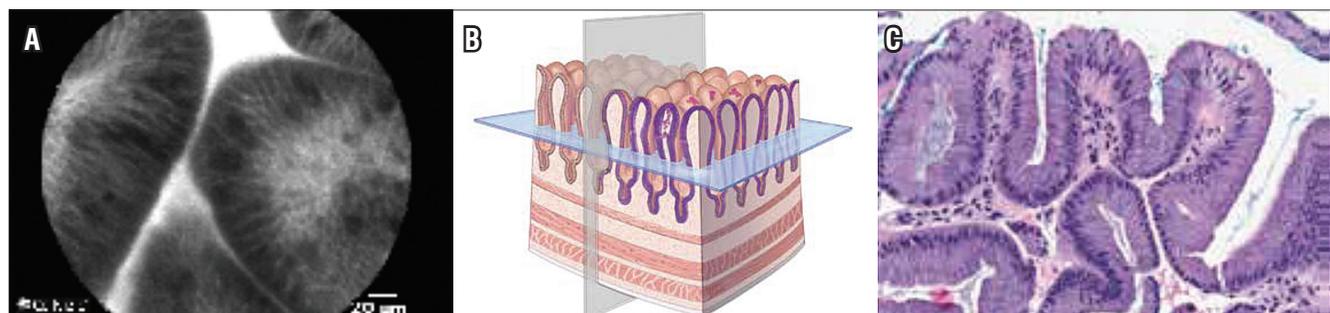


Figura 1. A. Biopsia óptica. B. Esquema. C. Biopsia física.

ESÓFAGO DE BARRETT Y CÁNCER DE ESÓFAGO

La incidencia del adenocarcinoma de esófago está en aumento. La detección temprana aumenta la supervivencia en 5 años de 2,8% (para casos avanzados) a 49,3% para tumores locales; sin embargo, si el diagnóstico se hace en estadio 0, la supervivencia aumenta en 95%. El precursor es el esófago de Barrett, que evoluciona a displasia de bajo grado, luego a displasia de alto grado (o tumor intraepitelial), cáncer temprano y por último, al cáncer invasivo.

La endoscopia actual de alta definición con luz blanca (HDWLE), con imágenes de banda angosta (NBI) y cromoendoscopia, aún no discrimina claramente el epitelio columnar simple del esófago de Barrett y de las áreas de displasia, sobre todo de bajo grado. La neoplasia en estos pacientes no es evidente claramente, incluso con una cuidadosa inspección endoscópica; actualmente se acepta el protocolo de Seattle para su seguimiento, con biopsias aleatorias en 4 cuadrantes (cada 2 cm sin sospecha de displasia y cada 1 cm si hay sospecha); pero incluso aplicándolo, no se diagnostican el 48% de las neoplasias tempranas, además de que es un protocolo poco practicado por el endoscopista promedio, lo que hace imprescindible mejorar las técnicas de diagnóstico a través de mejores técnicas de imagen durante la endoscopia, con o sin biopsias dirigidas según las mismas (11).

Después de la esofagectomía por displasia de alto grado se encuentran focos no sospechados de adenocarcinoma en el 40% de los pacientes. El protocolo de Seattle solo estudia el 3,5% de la superficie mucosa en riesgo. La adición de HDWLE, magnificación óptica y cromoendoscopia electrónica con NBI ha logrado disminuir el número de biopsias necesarias en cada paciente, pero todavía persiste un gran subdiagnóstico de la displasia. Otras técnicas que están emergiendo, como la autofluorescencia (Olympus), no han logrado demostrar beneficio, dado que aunque tienen mayor sensibilidad de detección, también tienen hasta 40% de falsos positivos. Adicionar cromoendoscopia química con lugol detecta un 5% de lesiones adicionales, pero tiene poca aplicación clínica regular. La mezcla de estas técnicas aumenta la exactitud, pero aún no se detectan todos los casos.

Ya hay múltiples investigaciones sobre la utilidad de la microscopia confocal láser (Cellvizio-Mauna Kea) para el estudio de esta patología. Los hallazgos generales descritos son la visualización del epitelio columnar con células caliciformes (que se ven oscuras porque la mucina contenida en ellas no capta bien la fluoresceína) y con progresiva desorganización de la estructura vascular (vasos más gruesos e irregulares) y de la estructura epitelial (con células cada vez menos captantes de la fluoresceína, y por lo tanto más oscuras y desordenadas); se han desarrollado progresivamente criterios diagnósticos de CLE para esta patología:

En 2008, se desarrollaron los 5 primeros criterios diagnósticos de CLE sugestivos de neoplasia en esófago de Barrett, y se consideraban los hallazgos como altamente sugestivos de neoplasia si había 2 o más de los siguientes criterios:

- Revestimiento epitelial irregular
- Anchura variable del revestimiento epitelial
- Patrón vascular irregular
- Fusión de glándulas
- Presencia de áreas oscuras (sugestivas de disminución de la captación de fluoresceína)

Estos criterios tenían, para diagnosticar displasia de alto grado o cáncer temprano, una sensibilidad (S) de 75%, especificidad (E) de 89% a 91%, valor predictivo positivo (VPP) de 30% a 35%, valor predictivo negativo (VPN) de 98% y exactitud (Exac) de 88% a 90%, con buena concordancia interobservador (Kappa de 0,6). Al adicionarle a esto la HDWLE y el NBI, se logró S: 100%, E: 83%, VPN de 67% y VPP de 100. Dado tan bajo valor predictivo negativo, se desarrolló la Clasificación de Miami, consistente en los siguientes criterios:

- Vasos irregulares
- Fusión de criptas y vellosidades
- 1 de 3 hallazgos asociados con el epitelio entre: grosor epitelial irregular, falta de homogeneidad del epitelio y borde epitelial oscuro

Con esta clasificación se logró, para expertos, S: 91%, E: 100%, Exac: 95%, con concordancia interobservador casi perfecta (Kappa = 0,83). Para no expertos, S: 50%-75%, E: 93%-97% y Kappa 0,64.

Según esta clasificación de Miami, las características de cada estadio de la evolución de la enfermedad serían las siguientes:

- Epitelio escamoso normal: células planas y sin criptas o vellosidades, con vasos brillantes que se encuentran dentro de las papilas
- Esófago de Barrett sin displasia: arquitectura viliforme uniforme de células columnares, intercaladas regularmente con células caliciformes oscuras
- Esófago de Barrett con displasia de alto grado: arquitectura viliforme irregular, oscura y de bordes engrosados y vasos dilatados e irregulares
- Adenocarcinoma: estructura irregular, desorganizada y no viliforme, con múltiples células columnares oscuras y vasos dilatados e irregulares

Esta clasificación ha mostrado exactitud y buena concordancia interobservador entre expertos y no expertos, después de una corta sesión de entrenamiento formal.

Las mejores imágenes son obtenidas con el *probe* perpendicular a la mucosa (algunos endoscopistas utilizan un

cap de 4 mm en la punta del endoscopio y succionan para lograrlo); y se deben realizar antes de la toma de biopsias, pues el sangrado puede oscurecer la imagen por el escape de la fluoresceína.

Recientemente se creó otra clasificación específica para el diagnóstico de displasia, con los siguientes criterios:

- Glándulas de forma y tamaño desigual
- Glándulas no equidistantes
- Células caliciformes difíciles de identificar
- Células pleomórficas
- Células agrandadas
- Superficie epitelial en dientes de sierra

El diagnóstico de displasia se hace con 2 o más criterios, con S: 75%, E: 90%, VPP: 82%, VPN: 85%, Exac 84%, y buena concordancia interobservador entre expertos (Kappa = 0,66).

Esta clasificación, en uso conjunto con la de Miami, facilita la identificación de neoplasia en los pacientes con esófago de Barrett. Al utilizar la CLE se disminuye la necesidad de biopsias para el diagnóstico de las lesiones neoplásicas, mientras que en la práctica corriente, los sitios sospechosos detectados se marcan con argón plasma para facilitar la biopsia y el tratamiento. Se cree que su mayor utilidad es en los casos de duda al utilizar HDWLE y NBI, en donde la microscopia confocal parece el complemento ideal. En general, la utilidad de CLE en esófago de Barrett está en:

- Detección adicional de neoplasia: sin duda la CLE basada en *probe* (pCLE) es superior a la HDWLE ($p = 0,002$), sobre todo en áreas planas aparentemente normales. La pCLE tiene el doble de sensibilidad que HDWLE para diagnosticar displasia y cáncer (valor predictivo positivo de 68,3% *versus* 34,2% con HDWLE sola). Además, su alto valor predictivo negativo con la sumatoria de criterios mencionados, la hace la mejor prueba de exclusión actual de neoplasia en el Barrett. El uso de la pCLE podría mejorar la eficacia de programas de vigilancia en estos pacientes (12, 13).
- Cambio en el diagnóstico y manejo de los pacientes el 34% de las veces, y lo hace de manera inmediata.
- Disminución de la necesidad de biopsia, y por ende los costos de las mismas, aunque por ahora no desaparece completamente la necesidad de hacerlas. Disminuye en 80% la cantidad de biopsias necesarias (14).
- Es una técnica fácil de interpretar y con curva de aprendizaje corta para esófago de Barrett.
- Guía la terapia: si se identifican áreas de displasia de alto grado se podría, en el mismo procedimiento, ejecutar de inmediato una mucossectomía (EMR) o disección submucosa endoscópica (ESD), según el protocolo de cada institución, y sin necesidad de esperar 1 semana o más a los resultados de patología, con necesidad de

un segundo tiempo de procedimiento, lo que también podría incidir en los costos y en la morbilidad.

- Al realizarlo conjuntamente con NBI y endoscopia de alta definición, se logra la detección de la mayoría de las displasias, con un valor predictivo negativo de 96% y una sensibilidad de casi 100% en análisis por paciente.
- En pacientes sometidos a ablación con radiofrecuencia, identifica sitios de esófago de Barrett residual, además de revisar márgenes de otros tipos de tratamiento, como EMR o ESD, disminuyendo el sobretratamiento y el subtratamiento (aunque faltan estudios para definir los criterios en estos casos y para el costo/efectividad). Un estudio reciente no encontró evidencia en relación con mejorar el diagnóstico de neoplasia residual al adicionar pCLE en comparación con HDWLE sola en estos casos (15).

La pCLE también ha recibido críticas en el estudio del Barrett. Algunas investigaciones muestran falsos positivos de displasia de bajo grado de hasta 64%, por lo que insisten en que se debe confirmar con biopsias de las áreas sospechosas. Otros estudios solo hablan de su utilidad real en lesiones planas, y por tanto en la necesidad de realizarlos únicamente en centros de referencia y no de forma generalizada en cualquier servicio de endoscopia, y justifican esto en que la prevalencia de lesiones neoplásicas tempranas en estos pacientes es muy baja. Cuando la HDWLE identifica una lesión como sospechosa, la probabilidad *pretest* de neoplasia es tan alta que lo que añadiría en estos casos una técnica como esta es cuestionable, y un resultado negativo no descartaría necesariamente neoplasia, por lo que no cambiaría el manejo (16). Futuros estudios aclararán finalmente, el subgrupo de pacientes en los que es más costo/efectivo y útil la aplicación de esta tecnología.

Imágenes en patología del esófago (cortesía de Cellvizio): véanse las figuras 3 a 9.

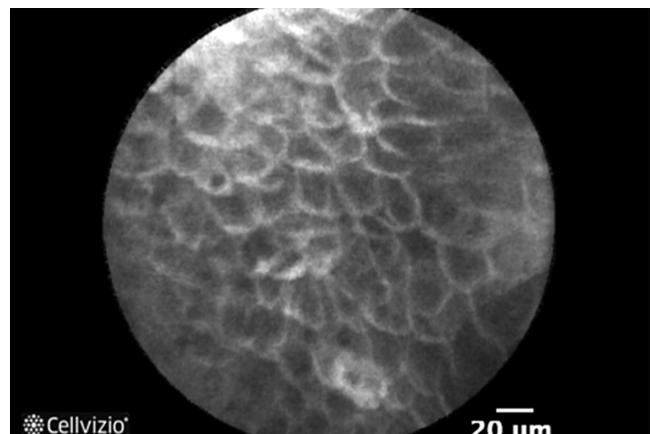


Figura 3. Esófago: epitelio escamoso normal. Cellvizio que muestra células planas y con patrón en escalera.

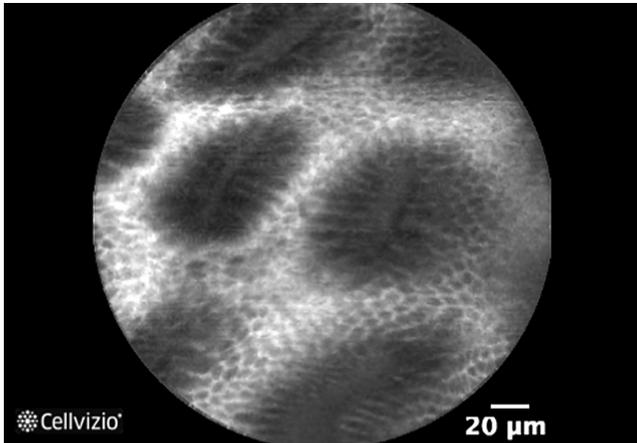


Figura 4. Metaplasia gástrica en esófago. Cellvizio con epitelio columnar regular, con glándulas redondas y regulares (*pits*) y con vasos sanguíneos normales y ectásicos.

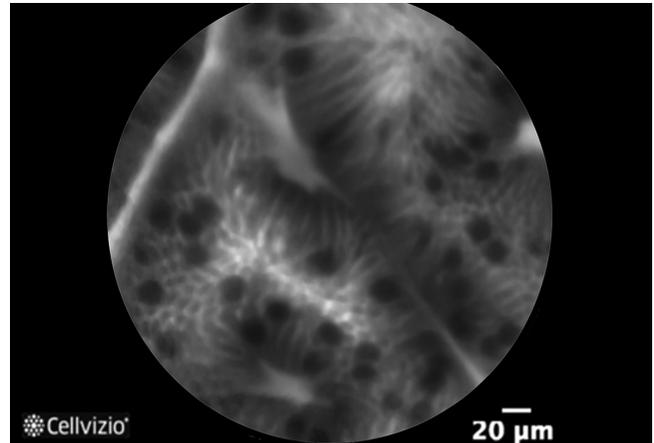


Figura 5. Metaplasia intestinal en esófago. Esófago de Barrett sin displasia: Cellvizio con superficie columnar regular, con células *globet* y mucina oscura fácilmente identificable, con glándulas equidistantes, de igual tamaño y forma, y con células regulares y equidistantes.

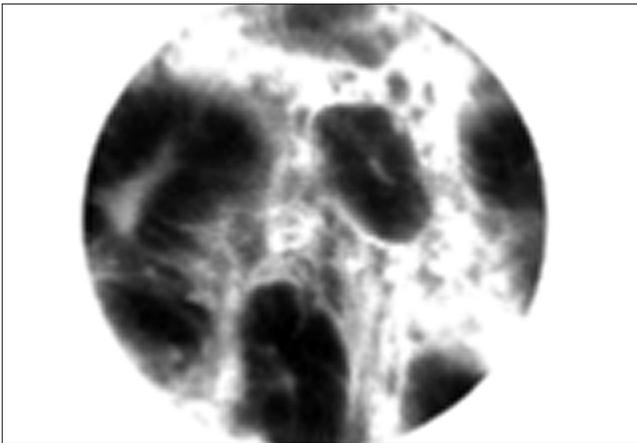


Figura 6. Displasia en esófago de Barrett. Cellvizio que muestra displasia de bajo grado con superficie epitelial con apariencia serrada, de glándulas no equidistantes, y células *globet* difíciles de identificar, con glándulas de forma y tamaño irregular y células grandes y pleomórficas.

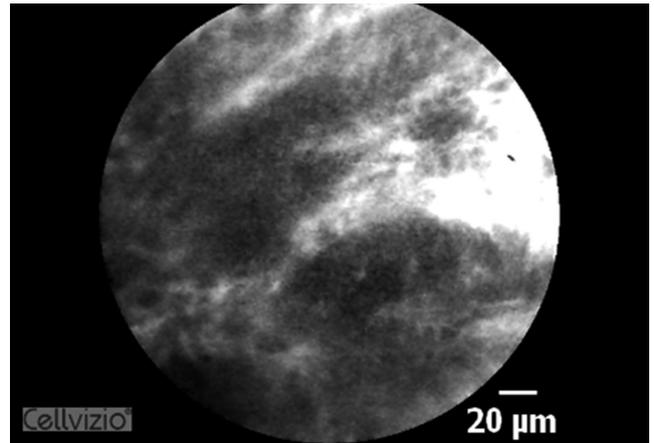


Figura 7. Displasia de alto grado en Barrett.

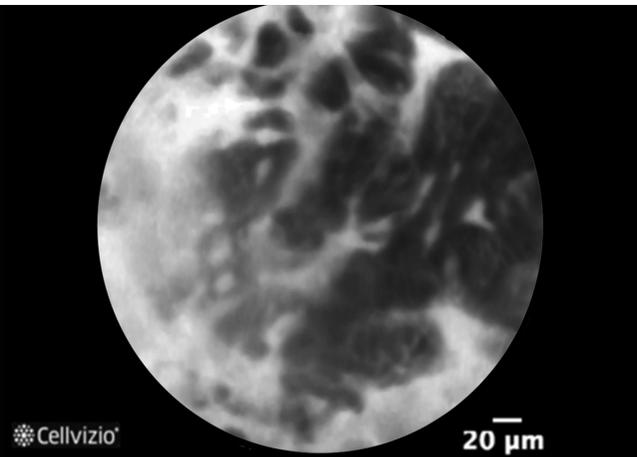


Figura 8. Adenocarcinoma en esófago de Barrett.

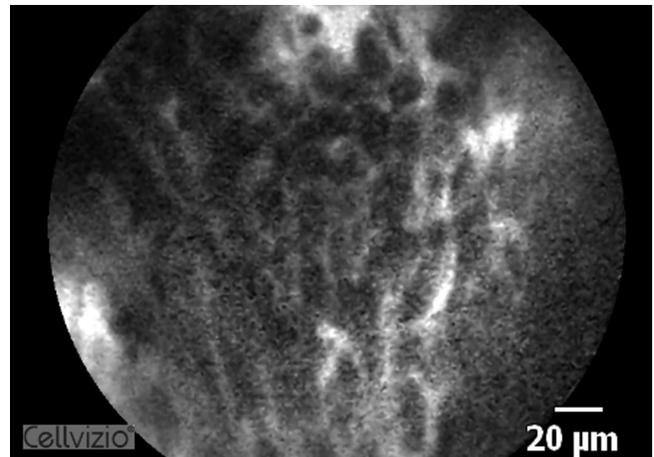


Figura 9. Esófago con cáncer de células escamosas.

ESTÓMAGO

En el estómago, al igual que en el esófago, hay limitación en el diagnóstico endoscópico de la metaplasia intestinal incompleta, de la displasia gástrica y del cáncer gástrico temprano, con solo HDWLE y NBI y con el uso de la magnificación, aunque en menor proporción que en el esófago, gracias sobre todo a los desarrollos de los criterios japoneses (Yao y colaboradores). Aunque los excelentes resultados con solo magnificación más NBI únicamente se han logrado hasta ahora en el Japón, ya que en el resto del mundo el diagnóstico de cáncer gástrico en etapas tempranas sigue siendo menor al 10% de los casos. Aquí, la pCLE da beneficios diagnósticos, aunque en menor proporción que en el esófago, por eso hay menos estudios y su papel se demorará más en definirse en la práctica clínica y en los estudios de costo/efectividad. El entrenamiento requerido también es corto, al igual que la concordancia interobservador (17); se identifican también las típicas células caliciformes que definen la metaplasia intestinal, además de mostrar claramente la apariencia vellosa celular al evidenciar las células caliciformes columnares con ribete en cepillo. Los estudios han mostrado que, para cáncer gástrico temprano, la pCLE tiene S: 81,8%, E: 90,9%, y Exac de 96,2%. Además, es útil para diagnosticar el linfoma gástrico, según reportes aislados, y para diferenciar pólipos adenomatosos, de hiperplásicos y fúndicos, con una exactitud de 97%. Al utilizar como medio de contraste la acriflavina tópica, se diagnostica la infección por *Helicobacter pylori* con S: 83% y E: 91%. Se puede diagnosticar además la atrofia gástrica con S: 93% y E: 95%, y la metaplasia con S: 99% y E: 100%. Faltan estudios para definir su utilidad clínica en este grupo de pacientes.

Imágenes de patología gástrica (cortesía de Cellvizio): véanse las figuras 10 a 16.

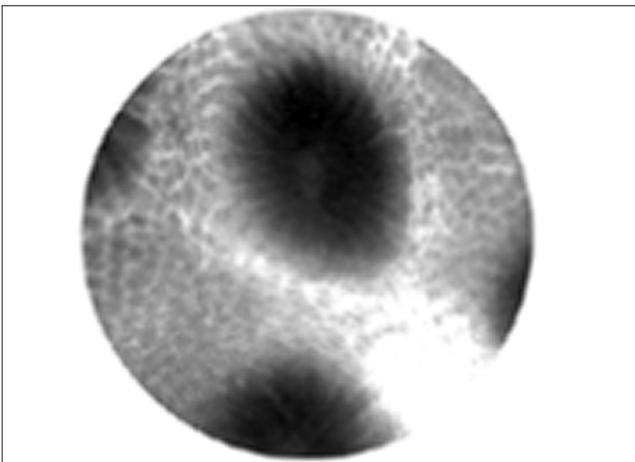


Figura 10. Estómago. Mucosa corporal normal, con glándulas fúndicas, con células epiteliales homogéneas y glándulas regulares, homogéneas en tamaño y en altura epitelial.

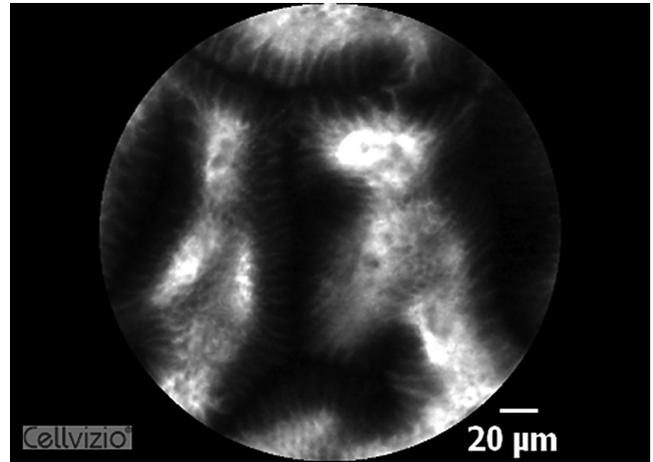


Figura 11. Estómago. Mucosa antral normal.

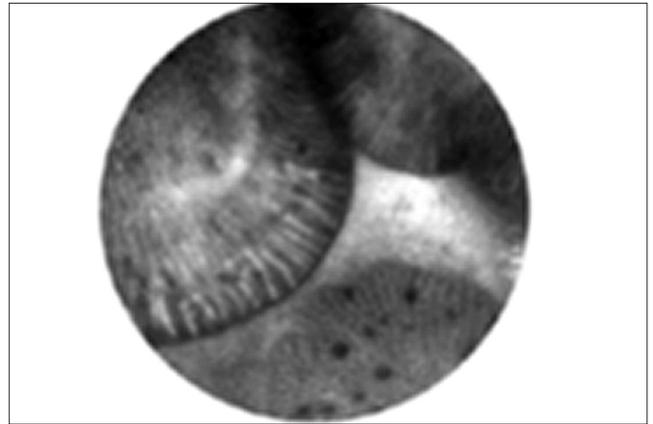


Figura 12. Estómago con metaplasia intestinal. Apariencia vellosa con células goblet grandes y oscuras con escaso tallo y células absortivas brillantes. Vasos con calibre normal helicoidales o en panal de abejas.

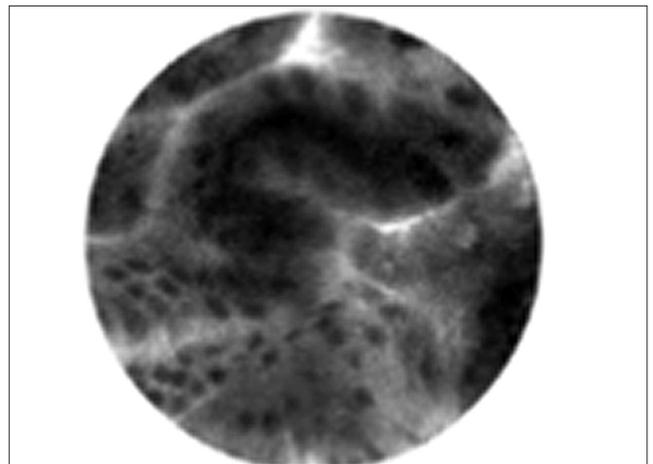


Figura 13. Estómago con displasia de bajo grado. Glándulas irregulares en tamaño y altura, con irregularidades de la organización celular, con células epiteliales hiperdensas, con incremento de la estratificación y con vasos sanguíneos dilatados y tortuosos.

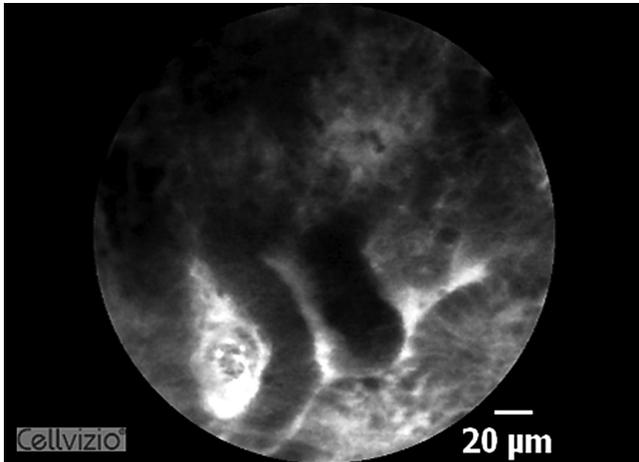


Figura 14. Estómago con displasia de alto grado.

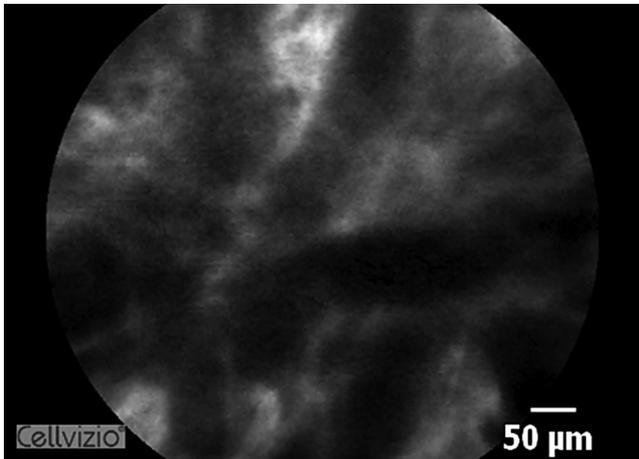


Figura 15. Estómago con cáncer. Con glándulas destruidas y desorganizadas, con células desordenadas, irregulares y de tamaño variable, y con incremento del calibre de los vasos sanguíneos, los cuales son irregulares en tamaño y forma.

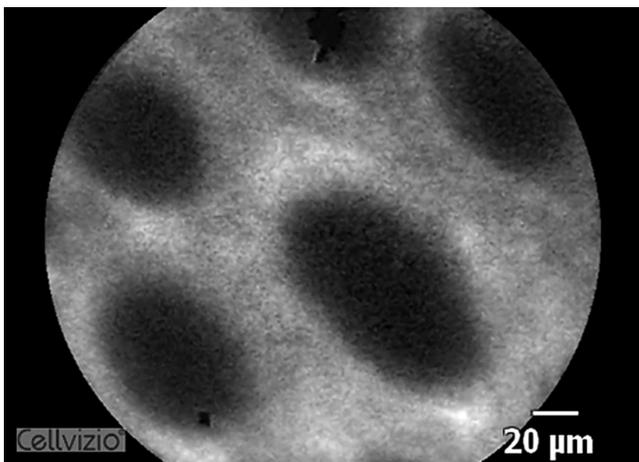


Figura 16. Estómago con carcinóide.

INTESTINO Y ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

Para el diagnóstico de la enfermedad celíaca, la endoscopia de alta definición tiene solo sensibilidad de 83% y especificidad de entre 6% y 94%, lo que hace que se requiera mejorar el diagnóstico endoscópico. El estudio de los anticuerpos específicos tampoco es 100% definitivo, es costoso y no está disponible en todo lado, además de que subdiagnostica los casos leves. Utilizar la técnica de inmersión en agua y adicionarle la magnificación óptica puede incrementar la sensibilidad a 94% y la especificidad a 88% (18). Se ha demostrado la utilidad de la pCLE para diagnosticar la enfermedad celíaca, la atrofia vellosa, incluso cuando es leve y moderada, y el incremento de linfocitos intraepiteliales, con S: 94% y E: 92%. Aún está por definirse su utilidad clínica en esta patología.

También se ha demostrado su utilidad en la mucosa intestinal, para detectar tempranamente los cambios asociados con el deterioro microcirculatorio por la sepsis (19), así como los cambios tempranos de la mucosa intestinal en la enfermedad injerto *versus* huésped, donde además no es siempre posible tomar biopsias intestinales dado que la mayoría son pacientes hematológicos trasplantados con trastornos de la coagulación; en estos pacientes se pueden observar con pCLE de manera temprana, los característicos cuerpos apoptóticos, las alteraciones en la densidad de las uniones epiteliales tipo *gap* y los cambios característicos de las criptas, consistentes en destrucción focal de criptas y apoptosis de las mismas; esto permite ajustar más rápido los tratamientos inmunosupresores y evitar la toma de biopsias (20). Se han realizado estudios de todo el intestino delgado, pasando la sonda gástrica o la colónica, a través de enteroscopia de doble balón, detectando todo tipo de cambios, como pérdida de vellosidades, atrofia, hiperplasia de criptas, incremento del flujo sanguíneo en estados inflamatorios, y haciendo el diagnóstico de neoplasias, lo que en el futuro ayudará al manejo de muchas otras enfermedades intestinales (21).

La pCLE también es útil para la evaluación y seguimiento de la enfermedad inflamatoria intestinal. En colitis ulcerativa, luego de 8 a 10 años de evolución después del diagnóstico, se incrementa la probabilidad de presentarse cáncer. Actualmente, se recomienda colonoscopia anual luego de este tiempo, y utilizar el protocolo de tomar biopsias de lesiones sospechosas y adicionar biopsias aleatorias en intervalos regulares de 10 cm, haciendo necesario tomar normalmente hasta 50 biopsias en cada procedimiento de seguimiento, las cuales realmente solo examinan menos del 1% de la superficie del colon; además, la displasia puede darse tanto en áreas inflamadas como en áreas normales sin lesiones evidentes. Un estudio mostró que adicionar cromoendoscopia a la pCLE detectaba 4,75 veces más displa-

sia intraepitelial que el protocolo convencional de biopsias (detectaba 19 *versus* 4, $p = 0,005$), y reducía la necesidad de biopsias a la mitad (21,2 *versus* 42,2, $p = 0,08$), sin incrementar el tiempo promedio del procedimiento. En estos pacientes, también ayuda a diferenciar la masa asociada con displasia de las masas simplemente adenomatosas en los pacientes con colitis ulcerativa crónica, lo que no se puede hacer solo con endoscopia de alta definición, y sí ayuda a definir el tratamiento. También es superior en definir inflamación subclínica en mucosa aparentemente normal, precisando la arquitectura de las criptas, las alteraciones microvasculares, y las fugas de fluoresceína; asimismo, puede ver el aumento en las bacterias intramucosales en pacientes con enfermedad activa, en comparación con los pacientes normales. La pCLE también se ha utilizado también para detectar cambios sutiles del reservorio ileal en pacientes sometidos a proctocolectomía restaurativa, para detectar pouchitis subclínica o displasia a este nivel, con una sensibilidad de detección de 88,9% en comparación del 38,9% al utilizar solamente endoscopia de alta definición.

De forma similar, se busca definir temprano la actividad en la enfermedad de Crohn y hacer seguimiento a largo plazo para diagnosticar temprano las neoplasias. En esta enfermedad, el riesgo de cáncer asociado con colitis es de 8% en 20 años, y 18% en 30 años cuando no hay compromiso hepático asociado (colangitis esclerosante primaria), y si hay este compromiso, el riesgo se incrementa a 33% en 20 años y 40% en 30 años. La mortalidad global por cáncer de colon en los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal es de 15%, y adicionar pCLE a la colonoscopia de alta definición permite detectar la displasia en colon con S: 93%, E: 100% y Exac de 99%. En un estudio de seguimiento, se encontró neoplasia intraepitelial de bajo grado en el 20% de los pacientes, y 60% de ellos eran de lesiones diminutas en el colon derecho.

En la enfermedad de Crohn activa, la pCLE muestra un aumento de la tortuosidad de las criptas colónicas, con incremento del volumen de las mismas, microerosiones, aumento de la inflamación y del infiltrado inflamatorio en la lámina propia. En la enfermedad de Crohn quiescente hay aumento de criptas y del número de células caliciformes (22); con la pCLE en estos pacientes, se busca anticipar la recaída de la enfermedad, y para esto el mejor predictor es la extrusión de las células epiteliales y la disfunción de barrera asociada; se puede hacer análisis cuantitativo para ver el incremento del recambio de estas uniones; se revisa el íleon terminal y si hay colitis, también el colon. En este último también se puede hacer análisis cuantitativo de la estructura de *pits*, que permite detectar la inflamación residual microscópica con mayor exactitud que la endoscopia (23). Faltan estudios que definan el papel de la pCLE en la enfermedad inflamatoria intestinal (24, 25).

También se ha probado la utilidad de la pCLE en otras enfermedades inflamatorias del colon. En la colitis microscópica, la endoscopia de alta definición es normal pero la pCLE detecta el incremento del colágeno subepitelial como una “cáscara” alrededor de las criptas (26); en la colitis pseudomembranosa asociada con el *clostridium difficile*, la pCLE identifica temprano los cambios histológicos asociados con la infección con S: 88,9% y Exac de 96,3%, adicionalmente, se puede visualizar la bacteria si se utiliza como medio de contraste la acriflavina y se realiza una fluorescencia de hibridación *in situ* (FISH). El diagnóstico rápido y exacto de esta infección es de importancia crucial para el tratamiento del paciente y para prevenir la transmisión nosocomial (27).

Imágenes de patología del intestino delgado (cortesía de Cellvizio): véanse las figuras 17 y 18.

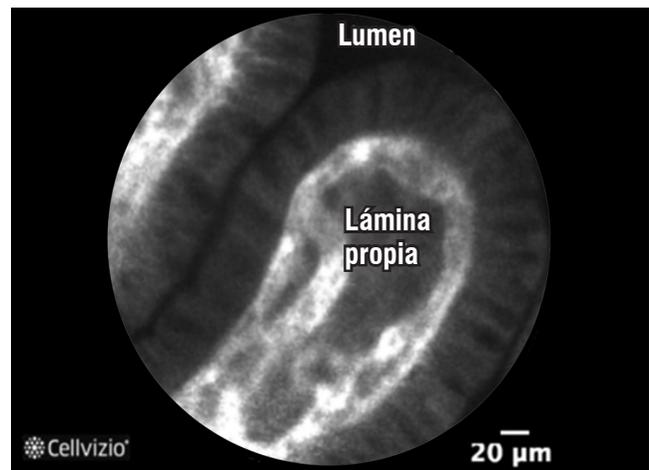


Figura 17. Intestino delgado. Normal.

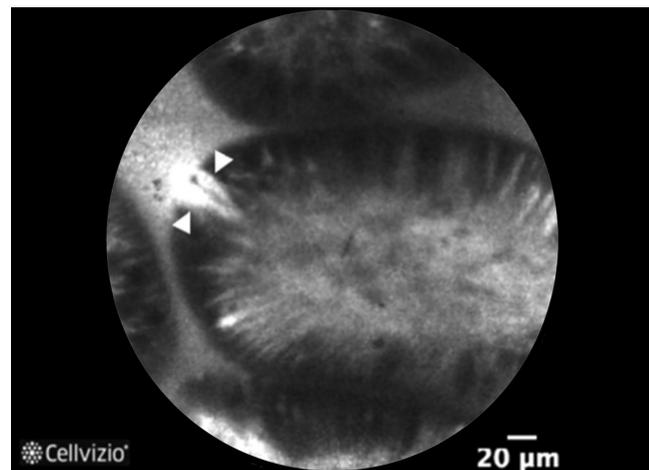


Figura 18. Intestino delgado. Enfermedad de Crohn con daño en uniones *gap* epiteliales.

PÓLIPOS Y CÁNCER DE COLON

El cáncer colorrectal es el tercero entre los diferentes tipos de cáncer y produce 9% de las muertes por esta causa. Su detección temprana aumenta la supervivencia en 5 años de 64% a 90%. Solo dos tercios se originan en adenomas, y hasta un tercio en mucosa normal. Se han propuesto los focos de criptas aberrantes como estadios muy tempranos de transformación maligna, cambios imposibles de detectar solo con la colonoscopia, ya que esta no detecta el 25% de los pólipos, sobre todo los diminutos; y los programas masivos de tamizaje de cáncer de colon previenen solo el 65% de los casos y no pueden definir su posible desarrollo a partir de algunos pólipos, por lo que se deben seguir mejorando las técnicas de imagen. La pCLE ha demostrado que distingue los pólipos hiperplásicos de los adenomatosos con S de 97% y E de 96%, y distingue adenomas vellosos de adenomas tubulares con S de 100% y E de 92%; adicionar NBI aumenta E a 99%. En general, para definir cambios de neoplasia colónica, tiene S: 97%, E: 99% y Exac de 99%; sin embargo, aumenta la duración del procedimiento, no evita completamente la toma de biopsias, y la concordancia interobservador no es perfecta (76%), por lo que aún no se ha incluido como rutina en los programas de prevención. También ha demostrado ser útil para detectar neoplasia residual después de resecciones mucosales (28-30).

Otras aplicaciones experimentales en cáncer de colon evalúan la densidad microvascular de los tumores para definir su evolución, y monitorear la respuesta a la terapia antioncogénica y la evolución biológica del tumor (31).

Imágenes de patología colónica (cortesía de Cellvizio): véanse las figuras 19 a 27.

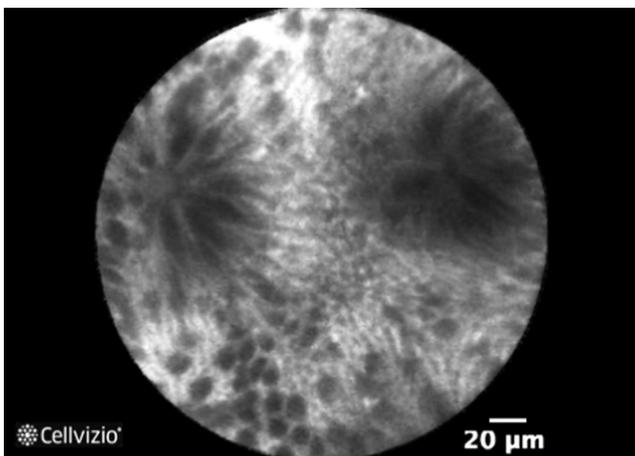


Figura 19. Colon normal. Cellvizio con criptas de estructura redondeada, con células goblet oscuras y con vasos sanguíneos estrechos y regulares alrededor de las criptas.

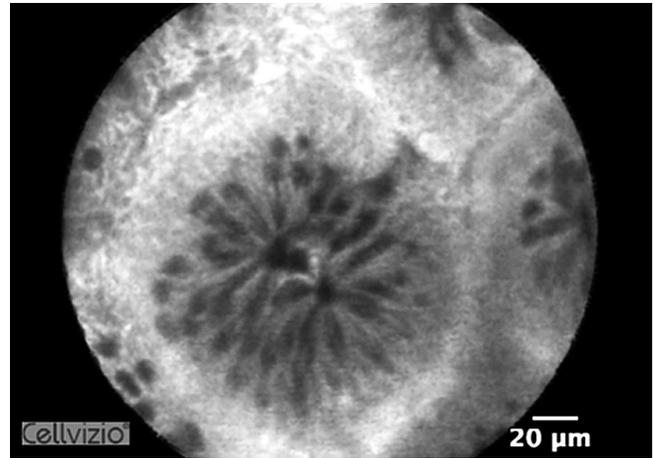


Figura 20. Colon con pólipo hiperplásico. Cellvizio con criptas luminales abiertas de forma de estrella, con criptas y epitelio normal alrededor de la lesión, con distribución normal de las células goblet y con glándulas tortuosas de apariencia doblada.

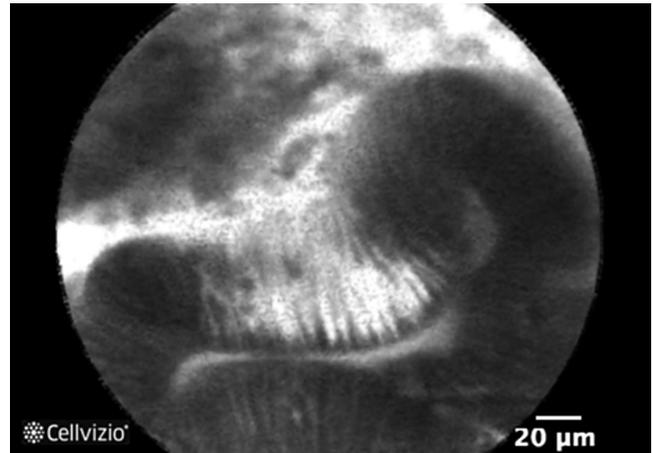


Figura 21. Colon con pólipo adenomatoso. Cellvizio con estructuras tubulares y vellosas, con engrosamiento de la superficie epitelial, con células oscuras y con criptas elongadas o distorsionadas.

ESTENOSIS BILIOPANCREÁTICAS INDETERMINADAS

Se define la estenosis biliar indeterminada como aquella que tiene al menos una modalidad de imagen previa, con evaluación citopatológica negativa, en intentos anteriores de muestreo (por cepillado o biopsia endobiliar) durante CPRE, en ausencia de una causa alternativa (32).

Las estenosis biliopancreáticas indeterminadas siguen siendo un difícil problema diagnóstico en medicina. El 95% de los colangiocarcinomas son adenocarcinomas y su diagnóstico temprano puede llevar a tratamientos como resección quirúrgica o trasplante hepático en casos seleccionados. Hacer diagnósticos inexactos lleva a que se

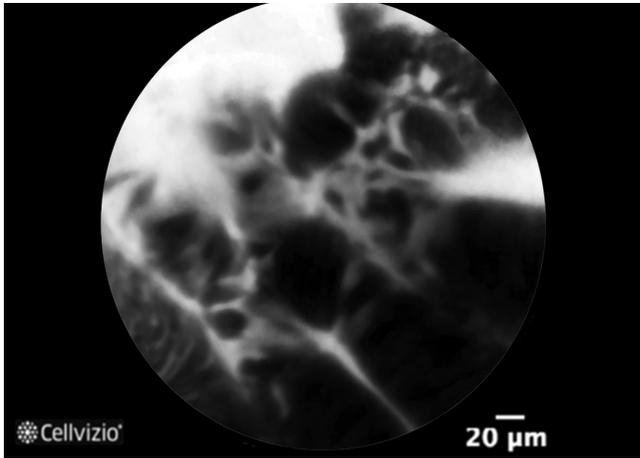


Figura 22. Colon con adenocarcinoma. Cellvizio con completa desorganización y pérdida de las estructuras en el tejido.

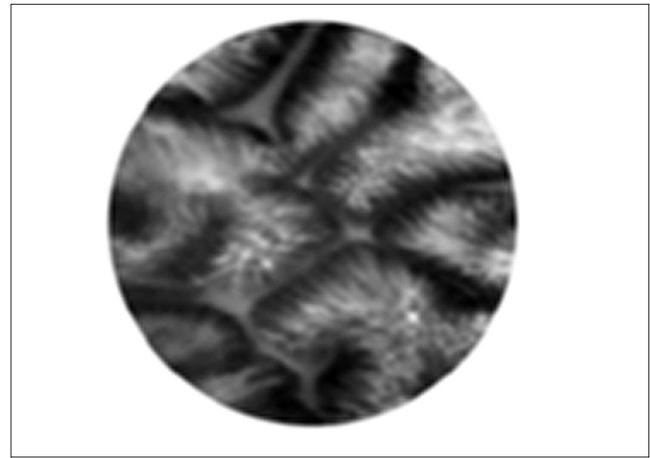


Figura 23. Colon con pólipo adenomatoso serrado. Glándulas con forma tortuosa de tamaño desigual y arquitectura de la luz de la cripta indeterminable, aspecto granular incrementado y apariencia de pliegues sinuosos y abundantes digitaciones.

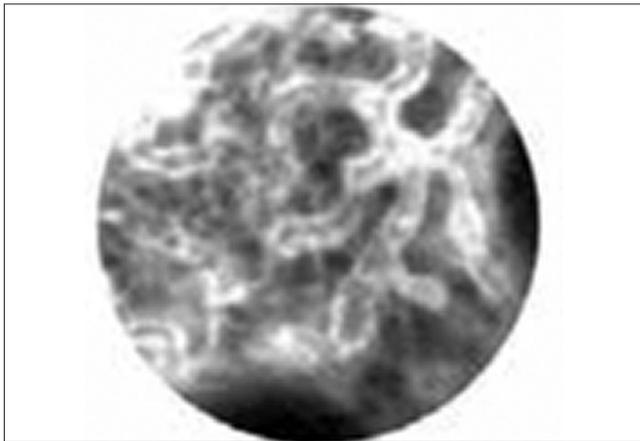


Figura 24. Colon con colitis ulcerativa activa. Existen diferencias en tamaño, forma y distribución de las criptas, con incremento en la distancia entre criptas y destrucción focal de las mismas, con capilares aumentados, dilatados y distorsionados, y con presencia de infiltración celular.

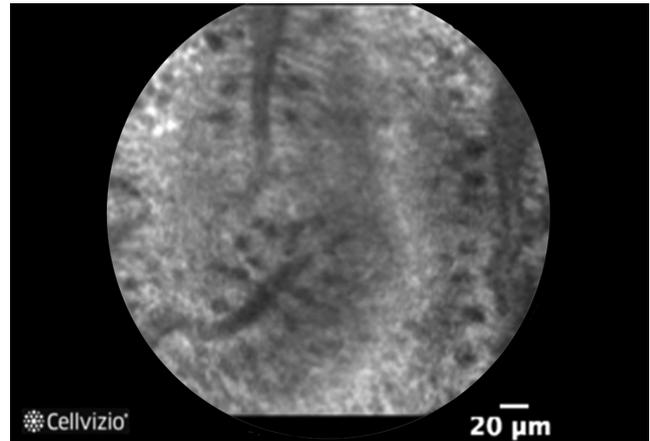


Figura 25. Colon con colitis ulcerativa quiescente o regenerativa. Apertura de las criptas lumbales de forma de estrella, con agregados focales de criptas de forma regular y con células *globet* normales o disminuidas, con capilares normales en número o ligeramente incrementados y de forma hexagonal o en panal de abejas y con persistencia de infiltración celular.

practiquen muchas cirugías innecesarias: 15% de los cánceres biliares operados resultan ser patologías benignas; sin embargo, los pacientes con colangiocarcinoma estadio T1 tienen excelente supervivencia en 5 años con tratamiento quirúrgico. La inexactitud de los métodos diagnósticos en esta patología generalmente retrasa y complica el tratamiento de los pacientes, que terminan requiriendo intervenciones cada vez mayores o más complicadas (33).

Con la colangiopancreatografía retrógrada endoscópica (CPRE), la sola apariencia no permite definir el diagnóstico; entre los criterios morfológicos de radiología que sugieren malignidad puede mencionarse estenosis largas,

irregulares, asimétricas, con transición abrupta y con curvatura nodular. Sin embargo, utilizando estos criterios se logra un diagnóstico con sensibilidad de 74% a 85%, especificidad de 70% a 75%, valor predictivo positivo de 74% a 78%, valor predictivo negativo de 70% a 82% y exactitud de 72% a 80%, quedando más de un 30% de pacientes sin diagnóstico en la práctica clínica (34). El estudio de cepillado solo tiene S: 30%-60%, las biopsias con pinzas fórceps tienen S: 43%-81%, y al adicionar al cepillado, la realización de biopsias de estas estenosis tiene S: 30%-57%, E: 90%-100%, VPP 94%-100% y VPN de 8% a 62%. En pacientes con colangitis esclerosante primaria disminuye aún más

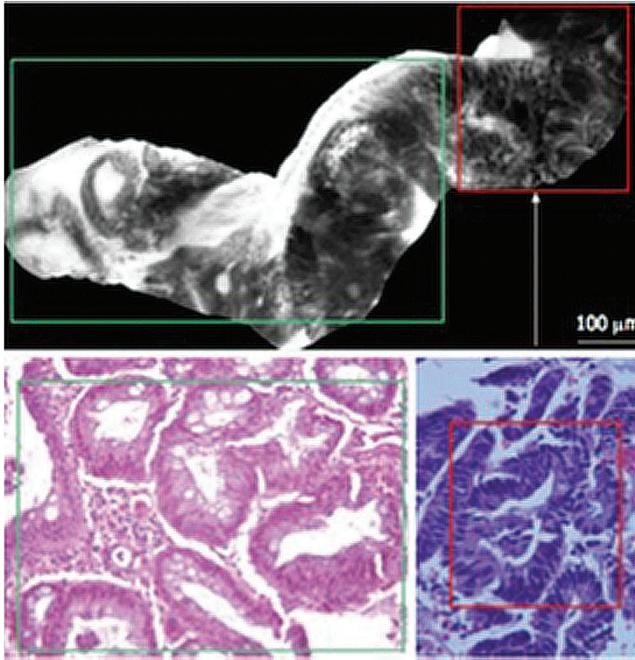


Figura 26. Colon con neoplasia sobre colitis ulcerativa. Capa epitelial irregular con pérdida de las criptas y de las células *globolet*, con arquitectura celular irregular y con poca mucina o sin mucina, con vasos sanguíneos dilatados y distorsionados con incremento de fugas y con arquitectura irregular y con pobre orientación al tejido adyacente, y cambio de mucosa inflamada a mucosa neoplasia detectado con Cellvizio.

la especificidad. Agregar biopsia al cepillado aumenta un poco la sensibilidad, pero los mejores resultados se obtienen cuando se combinan al menos 2 métodos de muestra de tejido: cepillado más biopsia logran sensibilidad de 73,5%; agregar análisis genético con FISH mejora un poco la sensibilidad pero es muy poco disponible y muy costoso.

El ultrasonido endoscópico no evalúa fácilmente las estenosis del conducto hepático común ni del área hiliar para diferenciar estenosis benigna de maligna, tiene una sensibilidad de 78% y una especificidad de 84%. La punción citológica ecoguiada por ultrasonido endoscópico tiene sensibilidad de 43% a 89% con E: 100%, VPP 100%, pero con VPN de 29% a 67% y Exac de 70% a 91%; además, tiene la posibilidad de producir siembras de tumores peritoneales.

El ultrasonido endoscópico intraductal (IDUS) tiene S: 83%-91%, E: 50%-92%, VPP: 92%-96%, VPN: 67%-100% y Exac de 76% a 90%.

Con la colangioscopia se detectan vasos irregulares y se dirigen mejor las biopsias, por tanto se logra S: 78%-96%, E: 75%-100%, VPP: 60%-100%, VPN: 58%-91% y Exac de 93,4%. El *Spyglass* más biopsia logra S: 82%, E: 82% VPP: 100% VPN: 100% y Exac de 82%.

Está emergiendo evidencia de la utilidad de la pCLE en la evaluación de estenosis o neoplasias intraductales

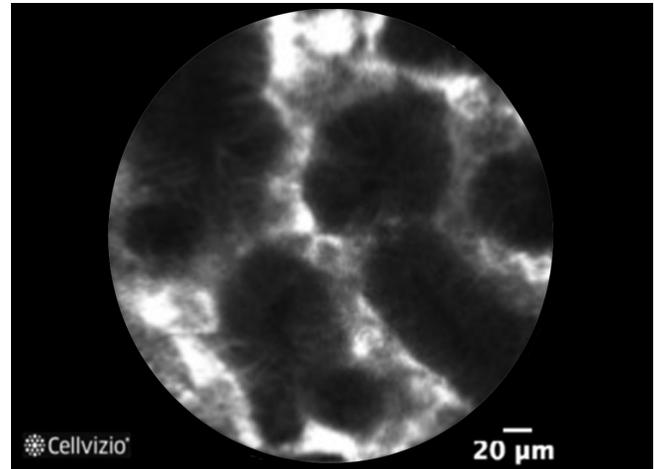


Figura 27. Colon. Masa similar a adenoma en paciente con colitis ulcerativa.

del páncreas y del árbol biliar. Ella brinda información tisular en tiempo real, dando visualización tanto epitelial como subepitelial e incorporando información dinámica como flujo sanguíneo, captación de contraste y fugas; puede penetrar en observación hasta 40 a 70 μm debajo de la superficie epitelial, y puede dirigir la toma de biopsias guiadas por colangioscopia o por fluoroscopia. Se pasa el *probe* Colangioflex de Mauna Kea a través de catéter biliar, o del *spyglass* o del canal de un colangioscopio. La bilis no afecta la calidad de la imagen. Las descripciones iniciales mostraron en las estenosis benignas un patrón reticular normal con diferentes escalas de gris pero no oscuras, sin pérdida de estructuras mucosas ni irregularidades en el epitelio y con vasos delgados (estructuras blancas alargadas no gruesas). Las estenosis neoplásicas se describen con un fondo gris oscuro, pobre estructura mucosal y vasos grandes e irregulares. Con los estudios iniciales con pCLE para estas estenosis se logró una S: 83%, E: 88% y Exac de 86%; un estudio posterior con 102 pacientes con estenosis pancreatobiliares indeterminadas mostró que la exactitud diagnóstica de la CPRE más la adquisición de tejido fue de 73%, y que al adicionar pCLE la sensibilidad aumentaba de 45% a 98%, el valor predictivo negativo de 69% a 97% y la exactitud aumentaba a 90% ($p = 0,01$).

Los criterios de pCLE habitualmente aceptados para definir malignidad en estenosis biliares indeterminadas son:

- Pérdida del patrón reticular de menos de 20 μm
- Detección de revestimiento epitelial irregular
- Presencia de estructuras vellosas o parecidas a glándulas
- Pérdida de las estructuras mucosas (sugere de fibrosis)
- Vasos sanguíneos saculares, dilatados y tortuosos, con bifurcaciones inconsistentes
- Presencia de áreas negras (que representan áreas de disminución de la captación de fluoresceína)

De estos, los de mayor poder predictivo de neoplasia son la presencia de vasos irregulares y la pérdida de estructuras mucosas identificables, de acuerdo con el uso del *Probe Colangioflex* de Mauna Kea (35, 36).

Después, estos se mejoraron con el desarrollo de los criterios de Miami:

- Estenosis benignas: bandas de ramificación finas (menos de 20 μm de diámetro), red reticular de bandas oscuras y vasos de menos de 20 μm de grosor.
- Estenosis malignas: acúmulos glandulares oscuros, bandas de ramificación gruesas (mayores a 20 μm de grosor) y vasos brillantes de más de 20 μm de grosor y con tortuosidad

Luego del desarrollo de los criterios de Miami aumentó la sensibilidad a 98%, pero la especificidad disminuyó a 67% y la exactitud a 81% (muchos falsos positivos por inflamación), además de que la concordancia interobservador en los criterios de Miami para esta patología es pobre, aunque mejora con entrenamiento (37, 38). Por lo anterior se desarrolló la clasificación de París (39), con el fin de reducir los falsos positivos.

Los criterios adicionales para definir estenosis *benignas* incluyen:

- Congestión vascular
- Estructura reticular engrosada
- Aumento del espacio interglandular
- Patrones granulares oscuros, pequeños y con escalas

Con las modificaciones de París en la clasificación de Miami se logró especificidad de 75%-83,3% y exactitud de 86%, por lo cual falta refinar los criterios y el entrenamiento de los médicos para esta patología.

Para pacientes con estenosis dominante por colangitis esclerosante primaria, la evaluación diagnóstica es mucho más difícil y existen menos criterios. En ellos, la incidencia de colangiocarcinoma está entre 7% y 14%, y a pesar de utilizar múltiples modalidades de muestreo de tejido, su detección sigue siendo muy difícil. La pCLE permite una visualización suficiente de las estenosis dominantes en 95% de los casos (40). Un estudio en ellos adicionando pCLE a las técnicas usuales de muestreo histológico, para excluir neoplasia, encontró sensibilidad de 100%, especificidad incrementada de 61% a 94,4%, valor predictivo positivo de 22,2% y un valor predictivo negativo de 89,5% a 100%, logrando ser un buen examen para excluir neoplasia en estos pacientes, aunque también es pobre la concordancia interobservador. En este subgrupo de pacientes, la pCLE podría ayudar a determinar los adecuados intervalos de vigilancia para disminuir la repetición innecesaria de CPRE, con sus riesgos y sus costos, además de definir una pronta cirugía en caso de alta sospecha de malignidad asociada, aunque

aún no hay criterios específicos, sino que se utilizan los de evaluación de cualquier estenosis indeterminada.

En lesiones ampulares se ha intentado mejorar la evaluación diagnóstica utilizando pCLE pero con resultados pobres por falta de criterios específicos, y con mala concordancia interobservador, por lo que para esta patología faltan más estudios (41, 42).

Imágenes de patología de conductos biliopancreáticos (cortesía de Cellvizio): véanse las figuras 28 a 31.

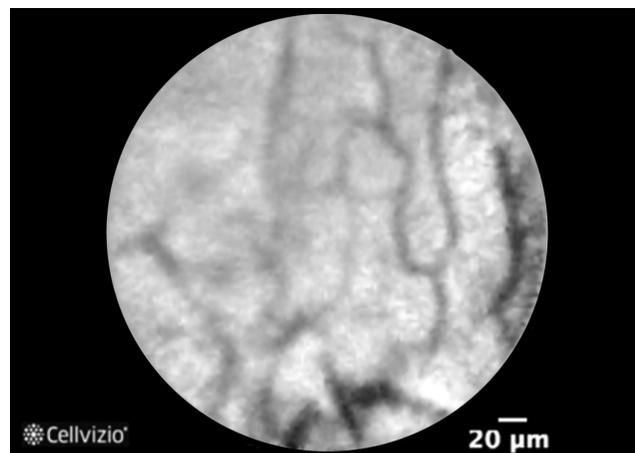


Figura 28. Conducto biliar normal. Hallazgos de Cellvizio que muestra red reticular de bandas y bifurcaciones delgadas oscuras de menos de 20 micras, con fondo gris alrededor y con vasos menores de 20 micras.

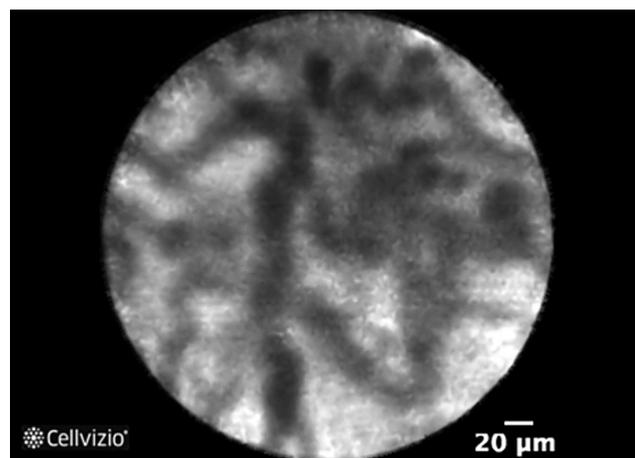


Figura 29. Conducto biliar con estenosis inflamatoria. Bandas blancas múltiples, con patrón granular oscuro en escalas, con incremento del espacio entre las escalas, mayor de 20 micras y con estructuras reticulares engrosadas.

NEOPLASIAS QUÍSTICAS PANCREÁTICAS

La mayoría de las veces, los quistes pancreáticos se detectan de forma incidental en la realización de estudios de imá-

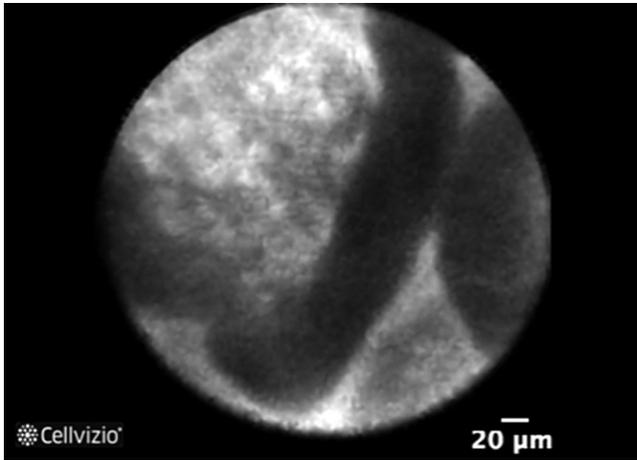


Figura 30. Conducto biliar con estenosis maligna. Colangiocarcinoma: con bandas blancas gruesas mayores de 20 micras, con bandas macizas oscuras, con epitelio y con banas oscuras gruesas mayores de 40 micras.

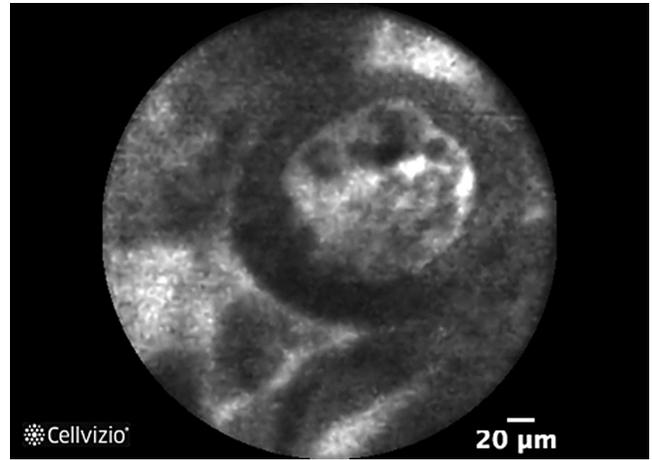


Figura 31. Vías biliopancreáticas, con sonda colangioproflex. IMPN con sus proyecciones digitiformes.

genes abdominales; de ellos, 60% son neoplasias quísticas, 30% son pseudoquistes y 10% son quistes congénitos o misceláneos. Los menores de 2 cm son muy difíciles de diferenciar solo por técnicas de imagen (43). Las neoplasias quísticas pancreáticas continúan siendo un problema diagnóstico a pesar del desarrollo del ultrasonido endoscópico y de la punción citológica ecoguiada (FNA-EUS) para evaluación citológica de marcadores tumorales y genéticos, que mejoró la exactitud diagnóstica, pero aún persisten importantes dificultades y se siguen realizando muchas cirugías innecesarias de alta morbimortalidad (por ejemplo, Whipple) por no haberse podido descartar completamente el riesgo de malignidad en muchas de esas lesiones. La morfología por ultrasonido endoscópico solo da una exactitud diagnóstica de 51% a 73%, sobrediagnosticando además los quistes con lesiones nodulares murales, lo que mejora un poco con el estudio de la citología y del líquido, sobre todo con la medición del antígeno carcinoembrionario, que aumenta la exactitud a 79%. Estudios genéticos del líquido con K-ras y otros análisis de extracción de ARN son experimentales, costosos y hasta ahora, tampoco han sido definitivamente diagnósticos.

Durante la pancreatoscopia, la pCLE ha permitido facilitar el diagnóstico de los IMPT (tumores papilares mucinosos intraductales) al aplicar los criterios de estenosis biliopancreáticas utilizando ColangiFlex. Sin embargo, se desarrolló un *probe* especial (AQ-Flex 19), que se utiliza a través de una aguja 19 G de punción citológica ecoguiada (nCLE), para estudiar las lesiones quísticas pancreáticas durante una punción, en tiempo real, y definir en ellas cuáles tienen potencial maligno y requieren cirugía (IMPT, cistoadenoma mucinoso, cistoadenocarcinoma, neoplasia endocrina quística) y cuáles no (cistoadenoma seroso y pseudoquiste pancreá-

tico). Se realiza la punción e inmediatamente el estudio de la imagen de la microscopia confocal laser, antes de la aspiración del tejido y del fluido para su análisis.

En los estudios iniciales con nCLE se descubrió que detectar estructuras epiteliales vellosas predecía quistes neoplásicos con S: 59%, E: 100%, VPP: 100% y VPN de 50%. Detectar estas estructuras vellosas ya por sí solo, define la necesidad de manejo quirúrgico. Se reportó una tasa total de complicaciones no graves de 9%, pancreatitis leve de 3% y dolor abdominal transitorio y sangrado que no requirió intervención adicional de 6%. Estos resultados mostraron baja sensibilidad pero alta especificidad, y que se requería mayor evaluación de la seguridad.

Recientemente el doctor Napoleón recopiló los criterios diagnósticos de las diferentes estructuras pancreáticas así (44):

- Páncreas normal: compuesto por estructuras grises ovales (adipocitos) y estructuras lobulares oscuras (acinos)
- IMPT: detección de papilas, las cuales en vista longitudinal se ven como proyecciones papilares digitiformes, o transversalmente como anillos oscuros con núcleos claros
- Cistoadenoma seroso: red vascular superficial con vasos delgados y conectados, y aspecto dinámico sorprendente
- Cistoadenoma mucinoso: pared quística con borde epitelial y flujo vascular normal delgado
- Pseudoquiste: campo oscuro con partículas brillantes (macrófagos)

Se conocen reportes aislados de la combinación de *spyglass* con nCLE donde se aumenta la sensibilidad diagnóstica hasta casi el 100%, y sin aumento de las complicaciones. Faltan estudios, así como falta también mejoría en la calidad de imagen del *spyglass*, pero es una combinación promisoriosa.

Está renaciendo el interés por la ablación de algunos quistes con etanol más paclitaxel, con publicaciones que muestran resolución de hasta 80% de los casos, con complicaciones aceptables de dolor abdominal transitorio en 7,9% de ellos y pancreatitis aguda en 2%. Además, no se sabe si dichas ablaciones prevengan completamente el riesgo de malignidad posterior, sin contar que no es aplicable en los IMPT pues estos casos tienen altísimo riesgo de pancreatitis y requieren seguimientos más estrechos (45).

Se están realizando trabajos para evaluar la utilidad del nCLE en el diagnóstico de la pancreatitis autoinmune pseudotumoral y de otros tipos.

Imágenes de patología de páncreas (cortesía de Cellvizio): véanse las figuras 32 a 40.

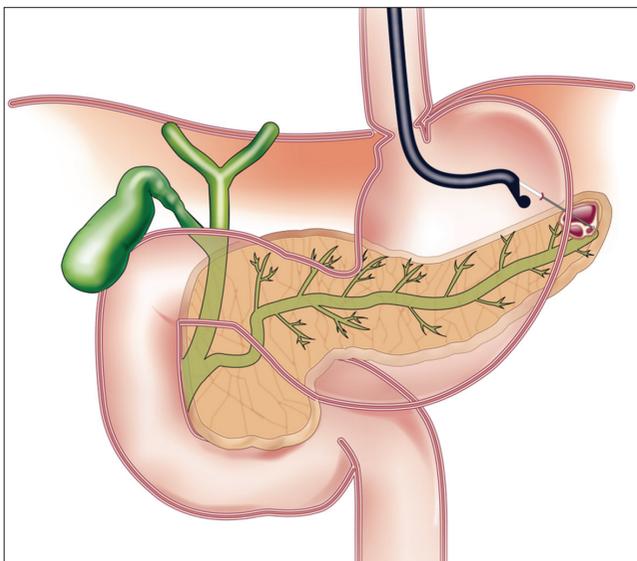


Figura 32. Lesiones quísticas del páncreas estudiadas con sonda AQ-19 Flex que se pasa a través de aguja 19 de punción citológica guiada por ultrasonido endoscópico, como muestra el esquema.

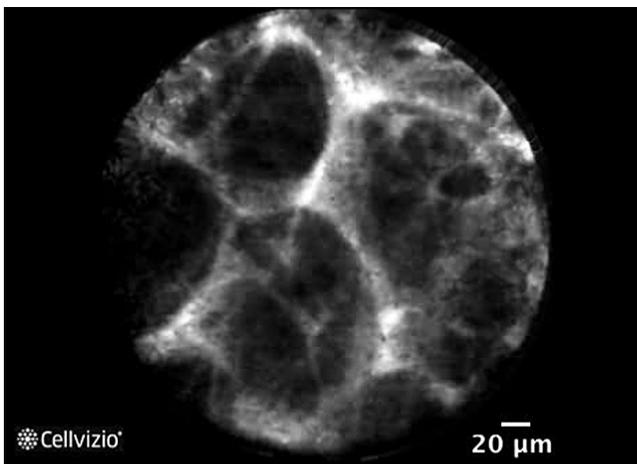


Figura 33. Páncreas normal.

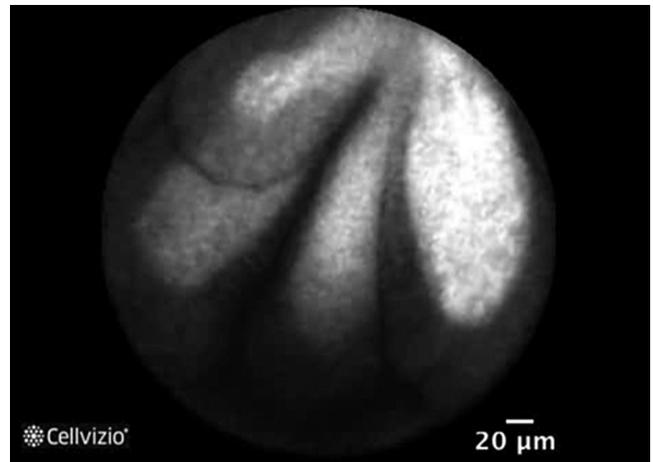


Figura 34. Páncreas. Lesión quística. IMPN sin displasia.

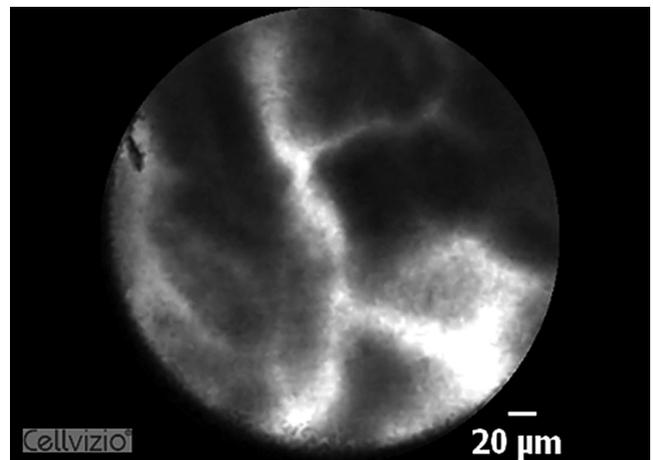


Figura 35. Páncreas. Lesión quística. IMPN con displasia de alto grado.

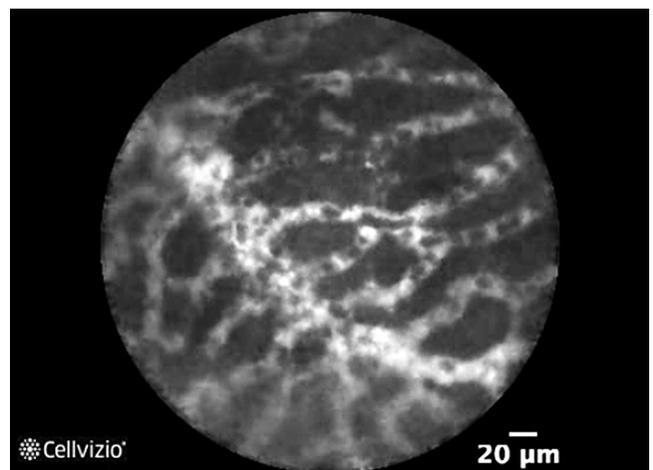


Figura 36. Páncreas. Lesión quística. Cistoadenoma seroso, con su superred vascular característica.

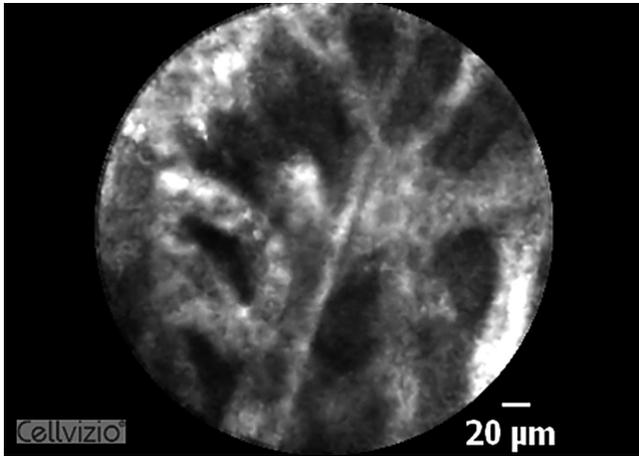


Figura 37. Páncreas. Lesión quística. Tumor neuroendocrino.

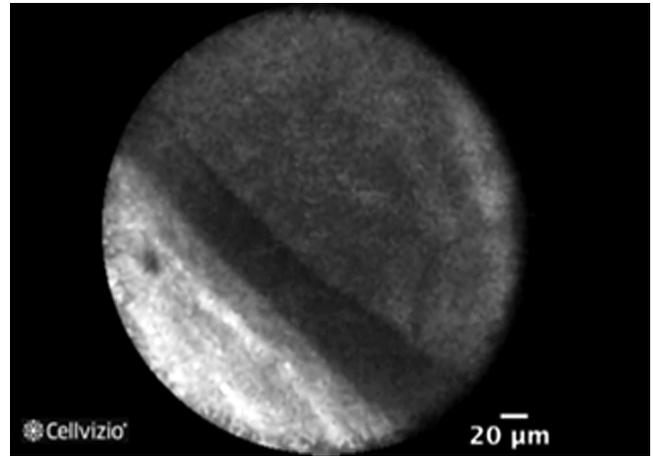


Figura 38. Páncreas. Lesión quística. Cistoadenoma mucinoso que muestra tejido similar a ovario y epitelio.

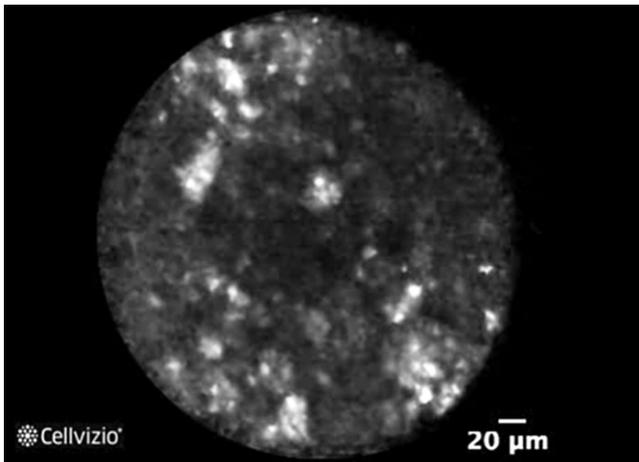


Figura 39. Páncreas. Lesión quística. Pseudoquiste pancreático con sus típicos detritos y su correspondiente histología de abundantes macrófagos.

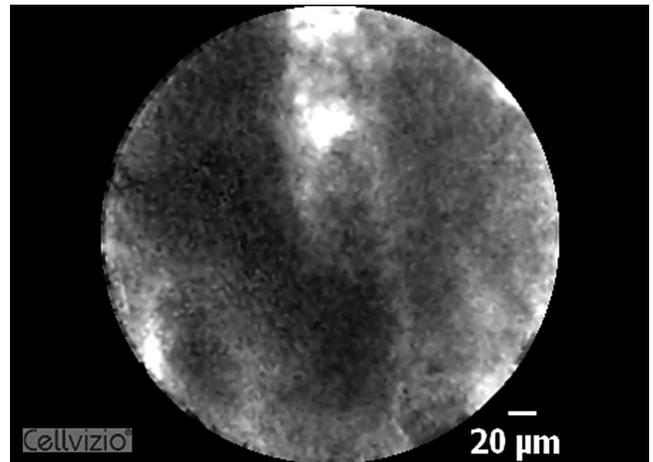


Figura 40. Páncreas. Lesión sólida. Adenocarcinoma.

FUTUROS DESARROLLOS

Actualmente y de forma simultánea a la microscopia confocal láser, están investigándose otras tecnologías, muchas de las cuales la complementarán en el arsenal diagnóstico. Entre ellas están:

- HRME (*high-resolution microendoscopy*), la cual es una tecnología similar a la CLE pero con un catéter menos costoso, y de la que hasta ahora existen muy pocos estudios
- Tomografía de coherencia óptica
- Imagen metabolómica
- Imágenes de espectrometría de masa y espectrometría de dispersión de luz
- Microscopia multifotón

- Imágenes armónicas de segunda generación
- Endoscopia RAMAN
- Microscopia de dispersión coherente
- Microscopia de fluorescencia de imágenes (FLIM), entre otras.

Además, se están planteando nuevos desarrollos de la tecnología CLE:

- Desarrollo de nuevos medios de contraste inespecíficos, como proflavina, lecitinas, aglutininas de germen de trigo, aglutininas de *hélix pomatia*, lecitina *aspergillusoryzae*, entre otras
- Desarrollo de nuevos medios de contraste específicos, como por ejemplo la desoxiglucosa fluorescente, que es

captada preferencialmente por las células neoplásicas del esófago de Barrett, y con desarrollo simultáneo de nuevas clasificaciones basadas en las nuevas imágenes

- Desarrollo de agentes de contraste moleculares genéticos específicos de cada enfermedad
- Anticuerpos específicos de varias enfermedades para ser también marcados con fluoresceína y mejorar la visualización y el diagnóstico

Sigue siendo un área en permanente desarrollo y sus avances permitirán mejorar la información sobre la estructura y naturaleza de los tejidos, lo que permitirá diagnósticos cada vez más exactos y tempranos de estas patologías. El futuro es promisorio (46).

Agradecimientos

A la doctora Monica Gaidhane, del Hospital Presbiteriano de la Universidad de Cornell en Nueva York, por su colaboración en la recolección de la bibliografía, y al Señor Georges Tavary, de la empresa Mauna Kea, por el suministro de algunas imágenes incluidas en esta publicación.

REFERENCIAS

1. Carns J. Optical molecular imaging in the gastrointestinal tract. *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 2013;23(3):707-23.
2. Templeton A. Confocal microscopy in the esophagus and stomach. *Clin Endosc.* 2013;46:445-9.
3. Shieh F. High-definition confocal endomicroscopy of the common bile duct. *J Clin Gastroenterol.* 2012;46(5):401-6.
4. Meining A. Classification of probe-based confocal laser endomicroscopy findings in pancreaticobiliary structures. *Endoscopy.* 2012;44:251-7.
5. Konda V. A pilot study of in vivo identification of pancreatic cystic neoplasms with needle-based confocal laser endomicroscopy under endosonographic guidance. *Endoscopy.* 2013;45:1006-13.
6. Liu J. Beyond white light endoscopy: The role of optical biopsy in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2013;19(43):7544-51.
7. Humphris J. Status of confocal laser endomicroscopy in gastrointestinal disease. *Trop Gastroenterology.* 2012;33(1):9-20.
8. Coda S. State of the Art in advanced endoscopic imaging for the detection and evaluation of dysplasia and early cancer of the gastrointestinal tract. *Clin Exp Gastroenterol.* 2014;7:133-50.
9. Neumann H. Confocal laser endomicroscopy for in vivo diagnosis of clostridium difficile associated colitis- a pilot study. *PLoS One.* 2013;8(3):e58753.
10. Dunbar KB. Endomicroscopy in Barrett's esophagus. *Gastrointest Endoscopy Clin N Am.* 2013;23:565-79.
11. Hyun Ko K. Recent advances in molecular imaging of premalignant gastrointestinal lesions and future application for early detection of Barrett esophagus. *Clin Endosc.* 2014;49(1):7-14.
12. Sharma P. Real-time increased detection of neoplastic tissue in Barrett's esophagus with probe-based confocal laser endomicroscopy: Final results of an international multicenter prospective, randomized, controlled trial. *Gastrointest Endosc.* 2011;74(3):465-72.
13. Bertani H. Improved detection of incident dysplasia by probe-based confocal laser endomicroscopy in a Barrett's esophagus surveillance program. *Dig Dis Sci.* 2013;58(1):188-93.
14. Canto MI. In vivo endomicroscopy improves detection of Barrett's esophagus-related neoplasia: A multicenter international randomized controlled trial. *Gastrointest Endosc.* 2014;79:211-21.
15. Wallace M. Multicenter randomized controlled trial of confocal laser endomicroscopy assessment of residual metaplasia after mucosal ablation or resection of GI neoplasia in Barrett's esophagus. *Gastrointest Endosc.* 2012;76:539-49.
16. Boerwinkel D. The clinical consequences of advanced imaging techniques in Barrett's esophagus. *Gastroenterology.* 2014;146:622-9.
17. Pittayanon R. The learning curve of gastric intestinal metaplasia interpretation on the images obtained by probe-based confocal laser endomicroscopy. *Diag Ther Endosc.* 2012;2012:278045.
18. Ianiro G. Endoscopic tools for the diagnosis and evaluation of celiac disease. *World J Gastroenterol.* 2013;19(46):8562-70.
19. Schmidt C. Confocal laser endomicroscopy reliably detects sepsis-related and treatment-associated changes in intestinal mucosal microcirculation. *Br J Anaesth.* 2013;111(6):996-1003.
20. Hundorfean G. Highlighting crypt necrosis by using confocal laser endomicroscopy for the in vivo and real-time diagnosis of gi graft versus-host disease. *J Clin Oncol.* 2012;30(35):e368-9.
21. Miehleke S. Probe-based confocal laser endomicroscopy in double balloon enteroscopy. *Z Gastroenterol.* 2011;49(12):1529-34.
22. Neumann H. Assessment of Crohn's disease activity by confocal laser endomicroscopy. *Inflamm Bowel Dis.* 2012;18(12):2261-9.
23. Musquer N. Probe-based confocal laser endomicroscopy: A new method for quantitative analysis of pit structure in healthy and Crohn's disease patients. *Dig Liv Dis.* 2013;45:487-92.
24. Kraus E. Characterization of lymphoid follicles with rearing signs as first manifestation of early Crohn's disease by conventional histopathology and confocal laser endomicroscopy. *Int J Clin Exp Pathol.* 2012;5(5):411-21.
25. Bessissow T. Advanced endoscopic imaging for dysplasia surveillance in ulcerative colitis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013;7(1):57-67.
26. Neumann H. In vivo diagnosis of lymphocytic colitis by confocal laser endomicroscopy. *Gut.* 2013;62(2):333-4.

27. Hundorfean G. In vivo detection of mucosal healing-involved histiocytes by confocal laser endomicroscopy. *World J Gastroenterol.* 2012;18(32):4447-9.
28. Su P. Efficacy of confocal laser endomicroscopy for discriminating colorectal neoplasms from non-neoplasms: A systematic review and meta-analysis. *Colon Dis.* 2013;15(1):e1-12.
29. Goetz M. Real-time histology in colonoscopy. *Gastrointest Clin North Am.* 2013;42(3):567-35.
30. Shahid M. Diagnostic accuracy of probe-based confocal laser endomicroscopy in detecting residual colorectal neoplasia after EMR: A prospective study. *Gastrointest Endosc.* 2012;75:525-33.
31. Cartana T. Confocal laser endomicroscopy for the morphometric evaluation of microvessels in human colorectal cancer using targeted anti-CD31 antibodies. *PLoS One.* 2012;7(12):e52815.
32. Wani S. Probe-based confocal laser endomicroscopy for the diagnosis of indeterminate biliary strictures. *Curr Opin Gastroenterol.* 2013;29:319-23.
33. Smith I, Kahaleh M. A review on the use of confocal laser endomicroscopy in the Bile Duct. *Gastroenterol Res Pract.* 2012;2012:454717.
34. Yoon WJ. Endoscopic evaluation of bile duct strictures. *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 2013;23:277-93.
35. Loeser C. Confocal endomicroscopic examination of malignant biliary strictures and histologic correlation with lymphatics. *J Clin Gastroenterol.* 2011;45(3):246-52.
36. Yoon WJ. Endoscopic evaluation of bile duct strictures. *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 2013;23(2):277-93.
37. Talreja J, Kahaleh M. Interpretation of probe-based confocal laser endomicroscopy of indeterminate biliary strictures: Is there any interobserver agreement? *Dig Dis Sci.* 2012;2338-6.
38. Kalaitzakis E. Establishing a diagnosis in indeterminate pancreatic-biliary strictures: Is confocal laser endomicroscopy the answer? *Dig Dis Sci.* 2012;57:3052-4.
39. Caillot F, Kahaleh M. Refined Probe-based confocal laser endomicroscopy classification for biliary strictures: The Paris Classification. *Dig Dis Sci.* 2013;2533-5.
40. Heif M. ERCP with probe-based confocal laser endomicroscopy for the evaluation of dominant biliary stenosis in primary sclerosing cholangitis patients. *Dig Dis Sci.* 2013;58(7):2068-74.
41. Ho HC. Confocal laser endomicroscopy of ampullary lesions, can we agree on black or white? *J Clin Gastroenterol.* 2013;47(5):377-8.
42. Bakhru MR, Kahaleh M. Interobserver agreement for confocal imaging of ampullary lesions: A multicenter single-blinded study. *J Clin Gastroenterol.* 2013;47(5):440-2.
43. Iftimia N. Cystic lesions of the pancreas: More reliable differentiation with in situ high-resolution optical imaging? *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2012;6(2):125-27.
44. Napoleón B. Criterios diagnósticos de las diferentes estructuras pancreáticas. En: VI Reunión Internacional de Usuarios de Cellvizio. Lisboa, Portugal; 2015.
45. Nakai Y. Role of endoscopic ultrasonograph in pancreatic cystic neoplasms: Where do we stand and where will be go. *Dig Endosc.* 2014;26:135-43.
46. Shahid M. Diagnostic accuracy of probe-based confocal laser endomicroscopy and narrow band imaging for small colorectal polyps: a feasibility study. *Am J Gastroenterol.* 2012;107:231-9.