

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA  
FACULTAT DE MEDICINA  
DEPARTAMENT DE CIÈNCIES MORFOLÒGIQUES

**ESTUDIO DE LAS MUTACIONES DE LOS GENES *C-KIT* Y *PDGFRA*  
Y LA EXPRESIÓN DE miRNAs EN UNA SERIE DE TUMORES  
ESTROMALES DEL TRACTO GASTROINTESTINAL (GIST) DE LA  
CSPT. CORRELACIÓN ENTRE LOS HALLAZGOS MOLECULARES Y  
LA EVOLUCIÓN CLÍNICA.**

Directora de la Tesis  
M. ROSA BELLA CUETO

Co-director de la Tesis  
ENRIC CONDOM MUNDÓ

Tesis Doctoral presentada por RUTH ORELLANA FERNÁNDEZ para optar al  
grado de Doctor en Medicina y Cirugía

Sabadell, mayo de 2013



**Maria Rosa Bella Cueto**, Professora Associada de Patologia Estructural i Molecular de la Unitat d'Anatomia Patològica del Departament de Ciències Morfològiques de la Universitat Autònoma de Barcelona, Doctora en Medicina i Cirurgia i consultora del Servei de Patologia de la Corporació Sanitària Parc Taulí Sabadell-Institut Universitari, i

**Enric Condom i Mundó**, Professor Associat d'Anatomia Patològica del Departament de Patologia i Terapèutica Experimental de la Universitat de Barcelona, Doctor en Medicina i Cirurgia i Cap del Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Universitari de Bellvitge, certifiquen que la tesi:

**“Estudio de las mutaciones de los genes *c-KIT* y *PDGFRA* y la expresión de miRNAs en una serie de tumores estromales del tracto gastrointestinal (GIST) de la Corporació Sanitària Parc Taulí. Correlación entre los hallazgos moleculares y la evolución clínica”**,

ha estat realitzada per **Ruth Orellana Fernández** sota la seva direcció, i que es troba en condicions de ser defensada davant del tribunal corresponent.

M. Rosa Bella Cueto

Enric Condom Mundó

Sabadell, maig de 2013.



*A Emmanuel, mi tesoro*



*A mis padres*





## AGRADECIMIENTOS

---

Este trabajo tiene su origen en la base de datos de GIST que empezó Eva Musulén, que me dio la oportunidad de colaborar como residente en la recogida de datos y de conocer este tipo de tumor tan particular. Muchos han sido los intentos por conseguir financiación y poder llevar a cabo el estudio de mutaciones en los casos que con el tiempo han ido formando una larga serie. Finalmente en 2009, en colaboración con Carles Pericay del Servicio de Oncología del hospital, conseguimos los medios para hacer realidad tan ansiado estudio. Quiero destacar que este proyecto se ha podido realizar gracias al trabajo y colaboración de muchísimas personas, algunas sin saber que de alguna manera también estaban contribuyendo, para todas ellas mi más profundo agradecimiento.

Vull agrair a la Mercè Rey i a la Neus Combalia l'oportunitat que em van donar aquell estiu de 1992, de fer una petita estada en el Servei de Patologia, quan jo era estudiant de tercer de medicina, i descobrir el que volia fer a nivell professional. Gràcies Mercè per ajudar-me a tirar endavant aquest projecte i creure que es podia fer. Gràcies per la confiança i les concessions d'aquests últims mesos, sense aquest temps preciós, no hagués estat possible.

Gracias Rubén, por dedicar tantas y tantas horas a sacar adelante los resultados de las mutaciones y por enrolarte con tanto entusiasmo en el mundo de los microRNA. Gracias por ser el pilar de este estudio. Gracias por tantas tardes de debate sobre c-KIT,  $\Delta\Delta$  Ct, deleciones,... sin tus explicaciones todo esto se hubiera convertido en una tortura. Gracias Jose y Mari Carmen por vuestra rigurosidad en el trabajo de laboratorio.

Gràcies Tona i Enric, per acceptar ser els meus directors de tesi, per adaptar-vos al meu ritme i aportar-me totes les vostres reflexions, capacitat de síntesis i experiència. Gràcies per la vostra comprensió en els moments de màxima pendent i ajudar-me a no caure en un forat negre. Tona, gràcies pel teu paper tant important com a tutora de residents, la meva tutora. Gràcies per tot el que m'has ensenyat com a docent i com a companya. Gràcies pels teus consells professionals i personals, gràcies per la teva sempre disposició a fer un cop de mà, encara que tu t'estiguis ofegant.

Gracias Maribel y Rosa por ayudarme a resolver alguna que otra duda sobre la inmunohistoquímica.

Gràcies al Joan Carles Oliva per tota la seva ajuda i treball en l'estudi estadístic. Gràcies per ajudar-me a entendre una mica més, aquest ós, que per a molts metges és l'estadística. Gràcies per la teva col·laboració desinteressada i la teva disposició per a resoldre dubtes d'última hora i donar els retocs oportuns a les gràfiques. Gràcies per deixar-me torturar algun que altre gat.

Gracias a todos los que formáis parte del Servicio de Patología del Parc Taulí, secres (María, Emy, Eva, Carla), técnicos (Olga, Mari Carmen, Maribel, Rosa, Dani), citotécnicos (Ana Ferran, Luis, Cati, Joana, Henar), adjuntos (Javier, Neus, Tona, Ampar, M<sup>a</sup> Angeles, M<sup>a</sup> Rosa, Irgmar, Alex, Carmen, Mariona) residentes, al grup d'inclusió, Josep y Susana, Tere, Ana Galcerán, Loli y a ti Mercè, la jefa. Gracias a todos, sin vuestra colaboración no hubiera sido posible.

Neus, gràcies per la formació que m'has donat i per la teva gran amistat. Gràcies per creure en mi i compartir la teva experiència en els àmbits de Citologia i Hematologia. Gràcies pels bons moments i per ser un bon refugi en els dolents.

Gracias Javier, Joan Carles, M<sup>a</sup> Angeles y Amparo por todo lo que me habéis enseñado durante mis años de residencia, al principio de mi andadura como adjunto, y cada día como compañeros. Gracias Javier por las infinitas charlas motivadoras, siempre alentando a seguir hacia adelante, gracias por ayudarme a seguir creyendo que esta es la manera de trabajar.

Gracias Alex por tu amistad, por tu ayuda en los momentos de máximo apogeo y la buena sintonía y complicidad en el ámbito profesional, es muy fácil trabajar contigo. Gràcies Maria Rosa per estar sempre, encara que no ho sembli.

Gràcies pels teus ànims, que sempre reconforten.

Gracias a todos los residentes que han pasado por el Servicio, y de los cuales también he podido aprender muchas cosas. Gracias a los que estáis ahora, Marta, Ónica, Lina y Rodolfo, por entender que os tenga un poco abandonados. Gracias a los adjuntos del Servicio de Cirugía, a los adjuntos del Servicio de Oncología, y en definitiva a todos aquellos que en algún momento han participado en el proceso diagnóstico y terapéutico de estos tumores.

Gracias Olga y Emmanuel, por alentarme a que hiciera este trabajo. Olga, gracias por tu amistad infinita, por compartir y ofrecerme cualquier tipo de ayuda, profesional o personal. Gracias a Han van Krieken y Uta Flucke, patólogos de Nijmegen por su acogida y hospitalidad y su interés por el estudio de microRNA en GIST, sus opiniones, ideas y ofrecimiento de colaboración. Emmanuel, gracias por tu infinita paciencia, por tus cuidados, por tu ayuda, por ese contrapunto de templanza, de razón y de paz, por tu amor infinito. Gracias por compartir conmigo.

Gracias papás. A ti mami, por contagiarme tu amor por la medicina, el compromiso profesional, tu dedicación y entrega a tu profesión que te mantiene viva y al pie del cañón, aunque tantas horas me haya robado de mamá.

Gracias por tu amor incondicional. Papá, que suerte que me enseñaras que cuesta más hacer las cosas mal que hacerlas bien, a ser responsable, independiente, a tener respeto por los demás y por uno mismo, a no poner excusas.

Álvaro, David, gracias por estar siempre pendientes de mí, aunque yo no me de cuenta. Gracias por quererme.

Trini, gracias por no ser la típica abuela que siempre da el para bien a sus nietos, gracias por hacerme saber que tengo defectos, por tu humor ácido, por tener una mente tan abierta, sin duda adelantada a tu época. Gracias a ti y al abuelo por acercarme a mis orígenes. Abuelo, si te hubieras vuelto loco de contento sabiendo que elegía la especialidad que quería, imagínate ahora.

En definitiva gracias a todos, compañeros de profesión, compañeros de trabajo, amigos de dentro y amigos de fuera, familiares, gracias por estar a mi lado y hacer que me haya sentido tan apoyada durante todos estos meses. Todo mi agradecimiento y afecto por vuestro esfuerzo y comprensión.



# ÍNDICE

---

<b>Índice</b> .....	.1
<b>Abreviaturas</b> .....	.5
<b>Introducción</b> .....	9
Definición de tumor estromal del tracto gastrointestinal (GIST).....	9
Historia de los GIST.....	9
Origen celular de los GIST.....	11
Epidemiología y manifestaciones clínicas.....	14
Características macroscópicas e histológicas.....	14
Espectro inmunohistoquímico.....	16
Diagnóstico diferencial.....	20
Evaluación del potencial maligno.....	22
<i>    Criterios consenso NIH/Fletcher</i> .....	23
<i>    Criterios AFIP/Miettinen</i> .....	24
<i>    Sistema de estadiaje TNM</i> .....	25
<i>    Nomograma Memorial Sloan-Ketering Cancer Center</i> .....	26
<i>    Factores clínicos y anatomopatológicos</i> .....	27
Significado de <i>c-KIT</i> .....	29
Mutaciones en el gen <i>c-KIT</i> .....	32
<i>    Mutaciones en el exón 11 (dominio yuxtamembrana)</i> .....	35
<i>    Mutaciones en el exón 9 (dominio extracelular)</i> .....	37
<i>    Mutaciones en el exón 13 (dominio quinasa I) y exón 17 (lazo de activación)</i> .....	38
Mutaciones en el gen <i>PDGFRA</i> .....	38
<i>    Relación de las mutaciones de c-KIT y PDGFRA con el comportamiento biológico de los GISTs</i> .....	39
GIST wild-type.....	40
Formas especiales de GIST.....	41
<i>    GIST familiar/asociado a síndromes</i> .....	41
<i>    GIST pediátrico</i> .....	42
<i>    GISTs asociados a otras neoplasias</i> .....	43

Alteraciones citogenéticas.....	43
Expresión genética y vías de señalización.....	44
MicroRNAs.....	45
<i>Definición</i> .....	45
<i>MicroRNA-221 y 222</i> .....	47
<i>MicroRNA-494</i> .....	49
<i>Aplicación de los miRNAs en el diagnóstico y tratamiento de los GISTs</i> .....	50
Tratamiento.....	50
<b>Hipótesis de trabajo</b> .....	63
<b>Objetivos</b> .....	65
<b>Material y método</b> .....	69
Material de estudio.....	69
Recogida de datos clínicos y parámetros histológicos.....	70
Estudio inmunohistoquímico.....	73
Análisis de mutaciones en <i>c-KIT</i> , <i>PDGFRA</i> y <i>BRAF</i> .....	78
Análisis de niveles de expresión de microRNAs.....	90
Análisis estadístico.....	105
<b>Resultados</b> .....	109
Análisis descriptivo de datos clínico-patológicos.....	109
Análisis descriptivo del estudio inmunohistoquímico.....	120
Asociaciones entre parámetros clínico-patológicos.....	124
Análisis descriptivo de las mutaciones en <i>c-KIT</i> y <i>PDGFRA</i> .....	130
Asociaciones entre mutaciones y parámetros clínico-patológicos.....	133
GISTs wild-type.....	157
Análisis descriptivo de los niveles de expresión de miRNAs.....	158

Asociaciones entre los niveles de expresión de miRNAs, mutaciones y parámetros clínico-patológicos.....	162
Análisis descriptivo del seguimiento.....	174
Análisis de supervivencia.....	180
Supervivencia global.....	181
Supervivencia específica.....	187
Supervivencia libre de recurrencia.....	190
Validación en nuestra serie de la predicción del nomograma.....	195
<b>Discusión</b> .....	199
Parámetros clínico-patológicos relacionados con GIST.....	199
Marcadores inmunohistoquímicos relacionados con GIST.....	201
Valor del índice de proliferación Ki-67 en GIST.....	202
Estado mutacional.....	203
Niveles de expresión de miRNAs.....	208
Seguimiento.....	210
Supervivencia.....	212
Validación en nuestra serie del nomograma.....	213
Comentarios adicionales.....	214
<b>Conclusiones</b> .....	219
<b>Bibliografía</b> .....	223





## **ABREVIATURAS:**

AJCC: American Joint Committee on Cancer

CGA: campos microscópicos de gran aumento

CIC: células intersticiales de Cajal

EEM: error estándar de la media

EORTC: European Organization for Research and Treatment of Cancer

FNCLCC : Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer

GANT: tumores de nervio autonómico gastrointestinal

GEIS: Grupo español de investigación en sarcomas

GI: gastrointestinales

GIST: tumor estromal gastrointestinal

IC95%: Intervalo de confianza

IHQ: inmunohistoquímico/a

MAPK: proteína quinasa mitógeno-activada

ME: microscopía electrónica

miRNA: microRNA

mRNA: RNA mensajero

MSKCC: Memorial Sloan-Kettering Cancer Center

NCCN: National Comprehensive Cancer Network

NF-1: neurofibromatosis múltiple tipo 1

NIH: National Institutes of Health

PDGFRA: receptor alfa del factor de crecimiento derivado de las plaquetas

PET: tomografía por emisión de positrones

PI3K: 3-quinasa fosfatidilinositol

RISC: Complejo Silenciante Inducido por RNA

SCF: "stem cell factor"

SG: supervivencia global

SLP: supervivencia libre de progresión

SLR: supervivencia libre de recurrencia

TGI: tracto gastrointestinal

WT: wild-type



# **INTRODUCCIÓN**



## **1. DEFINICIÓN DE TUMOR ESTROMAL DEL TRACTO GASTROINTESTINAL:**

Los tumores estromales del tracto gastrointestinal (GISTs) son las neoplasias estromales más frecuentes en esta localización (2% de todas las neoplasias del tracto gastrointestinal) y presentan diferencias clinico-patológicas con respecto a otros tumores mesenquimales como leiomiomas, leiomiosarcomas y schwannomas. Son tumores constituidos por células fusiformes y/o epitelioides, que de forma característica expresan c-kit (CD117, receptor de “stem cell factor”) y CD34 (marcador de células intersticiales fibroblásticas dendríticas) (1). Presentan variabilidad en la expresión de actina y marcadores neurales, aunque generalmente son negativos para desmina (2-3). Esta definición excluye tumores de músculo liso, schwannomas y neurofibromas.

Las características que presentan estos tumores desde el punto de vista inmunohistoquímico y de microscopía electrónica han permitido demostrar que se originan a partir de células intersticiales de Cajal, con positividad para c-kit (CD117), CD34 y vimentina (4). Las células intersticiales de Cajal están situadas en el plexo mientérico, se disponen entre las fibras musculares de la pared intestinal, y constituyen la interfase entre la inervación autonómica de la pared intestinal y la musculatura lisa intestinal, cuya función es regular el peristaltismo intestinal.

La identificación en la mayoría de los GISTs de mutaciones en uno de los dos genes de receptores tirosinquinasa (*c-KIT* y *PDGFRA*) es un elemento clave en la patogénesis de los GISTs (5), a la vez que ha permitido definir esta entidad y distinguirla de otras neoplasias (6).

## **2. HISTORIA DE LOS GIST:**

La terminología utilizada para clasificar los tumores mesenquimales del tracto gastrointestinal (TGI) ha sufrido diversas modificaciones durante los últimos 70 años. En 1940, para Scout et al, la mayoría de tumores mesenquimales del TGI se consideraban tumores de músculo liso (leiomiomas, leiomiomas celulares y leiomiosarcomas), en función del grado de celularidad y actividad mitótica; y los tumores mesenquimales de aspecto epitelioides se consideraban leiomioblastomas o leiomiosarcomas epitelioides. La introducción de la

microscopía electrónica (ME) en el estudio de tumores, entre finales de 1960 y principios de 1970, reveló que la mayoría de ellos no tenían las características típicas de diferenciación de células de músculo liso. Con la introducción de la inmunohistoquímica (IHQ), a principios de 1980, se corroboró la ausencia de características inmunofenotípicas de diferenciación de músculo liso (7).

El término "*tumor del estroma gastrointestinal*" se introdujo como término histogenético arbitrario para referirse a un grupo de tumores mesenquimales del TGI que no podían considerarse de origen neurogénico (proteína S-100 negativa) ni de músculo liso (ausencia de miofilamentos en la microscopía electrónica) (8); así pues la designación de GIST se ha utilizado como término para englobar los diferentes tumores mesenquimales, en ausencia de un marcador específico para su diagnóstico (9). En 1991, Traweek et al describen que CD34, además de expresarse en tumores vasculares, también se expresa en sarcomas epitelioides y en una minoría de leiomiomas (10). En 1994, van de Rijn et al y Monihan et al describen la expresión de CD34 en una gran proporción de tumores mesenquimales del TGI (11-12). En 1995, Miettinen et al también describen alta expresión de CD34 en tumores mesenquimales gastrointestinales (GI), que no son ni leiomiomas ni schwannomas (3). Aunque CD34 se consideró un marcador útil para diferenciar GISTs del resto de tumores mesenquimales GI, había un número considerable de estos tumores negativos para CD34, que resultaba difícil de interpretar si pertenecían al mismo grupo de GISTs CD34 positivos.

Posteriormente, se descubrió que los denominados GISTs, formaban un grupo de tumores mesenquimales del TGI biológicamente distinto. Quizá el criterio diagnóstico más específico y aplicable fue la determinación inmunohistoquímica de la expresión de c-kit (CD117) (2, 4-5). El otro grupo minoritario de tumores mesenquimales lo forman los verdaderos leiomiomas y schwannomas del TGI, que muestran criterios histológicos e inmunohistoquímicos bien definidos, principalmente localizados en esófago, colon y recto.

Los GISTs de diferentes localizaciones pueden presentar ligeras diferencias histológicas y en el perfil IHQ, por ejemplo en la expresión de actina (13). Sin embargo, hallazgos recientes IHQ, citogenéticos y moleculares sugieren que

los GISTs, independientemente de su localización, comparten características fundamentales.

El término “tumores de nervio autonómico gastrointestinal” (GANT), equivalente al anteriormente empleado “plexosarcoma”, se utilizó en los GISTs con características ultraestructurales que recordaban a los plexos autonómicos gastrointestinales y mostraban diferenciación neural (14). Los GANT se consideran actualmente una variante morfológica de los GISTs, dado que presentan las mismas características morfológicas, IHQ y estado mutacional (15).

### **3. ORIGEN CELULAR DE LOS GIST:**

En 1998 se propuso que los GISTs podrían originarse de las células intersticiales de Cajal (CIC) (5), y diversos autores apoyaron esta teoría (4, 16-17).

Las CIC fueron descritas por primera vez en 1893 por Santiago Ramón y Cajal, como un tipo de célula especial que formaba parte de la red de capas del plexo mientérico del TGI (18). Especuló que estas células podían tener un papel importante en los movimientos del TGI.

Posteriormente tres nuevos conceptos mejoraron el conocimiento de las CIC:

- La publicación de una monografía titulada “Interstitial Cells of Cajal: Intestinal Pacemaker Cells?” de Thuneberg en 1982 (19), donde el autor resume todos los datos disponibles sobre las CIC en base a hallazgos de microscopía óptica y electrónica y estudios electrofisiológicos. Según su revisión, las características ultraestructurales de las CIC varían desde células fibroblásticas a células similares a las musculares, según diferencias de localización, nivel y especie. Se reconocieron cuatro tipos de CIC (CIC-I a CIC-IV). Concluye que existen suficientes datos para asignar la función de marcapasos a las CIC.

En 1989, diversos estudios electrofisiológicos recogieron la actividad marcapasos en las capas de plexos mientéricos ricas en CIC (20). Thomsen et al describieron que una única CIC generaba contracciones espontáneas y corriente interna rítmica (21), de modo que se considera a las CIC células marcapasos para el movimiento autónomo del TGI (pacemaker cells). Se considera que las CIC derivan de precursores

comunes que producen CIC y células musculares longitudinales, pero no neuronas.

- El descubrimiento de que las células identificadas como CIC entre las capas musculares de intestino delgado de ratones expresaban el receptor quinasa c-kit, y que c-kit participa en el desarrollo y maduración de CIC (22-23). Se aceptó que las CIC podrían tener función de células marcapasos, con tinción IHQ para c-Kit, como marcador fiable para identificarlas microscópicamente (24).
- Los GISTs no tenían marcadores inmunofenotípicos de tumores musculares ni de vaina nerviosa, expresaban c-kit y presentaban mutaciones en el gen *c-KIT*. Estas observaciones permitieron afirmar que las CIC son las células a partir de las cuales se originan los GISTs (2, 4, 25).

Muchos investigadores aplicaron la microscopía electrónica para caracterizar las CIC como células mesenquimales, células de músculo liso o híbridos celulares con ambas características. Algunos autores sugirieron que había diversos tipos de CIC en función de los diferentes niveles y capas del TGI. La microscopía electrónica no aclaraba si las CIC representaban un único tipo de célula con variaciones morfológicas que reflejaban su estado de desarrollo y funcionalidad, o una mezcla de varios tipos celulares entre los que se incluían células que no eran en realidad CIC (24, 26).

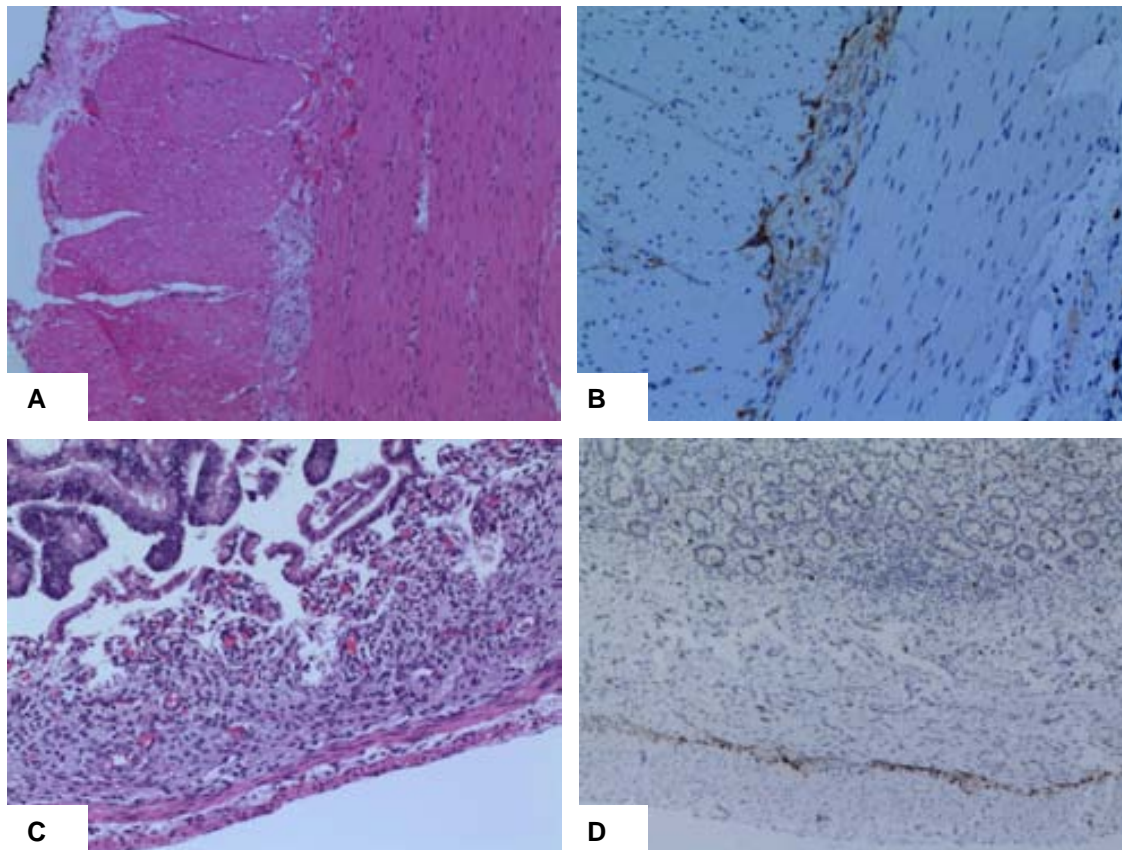
Las CIC son las únicas células fusiformes mesenquimales del TGI que expresan doble positividad para CD34 y c-kit, junto con los mastocitos, de los que se diferencian fácilmente con tinciones de histoquímica (giemsa, azul de toluidina o triptasa). Con la tinción inmunohistoquímica c-kit, se demuestra como las CIC forman una red de células en el plexo mientérico intestinal, y en el borde submucoso de la capa muscular circular y entre las capas musculares circulares y longitudinales. Las CIC se pueden observar en el intestino adulto en relación al plexo mientérico y en el intestino fetal en forma de un extenso cinturón en la capa muscular externa (**Fig.1**).

La alteración en el desarrollo de las CIC se ha relacionado con la enfermedad de Hirschprung y la estenosis pilórica infantil.



Estas particularidades hacen que se considere que los GISTs se originen a partir de ellas. Además, la variación regional en la distribución de las CIC a lo largo del TGI (más común en estómago e intestino delgado y menos frecuente en esófago y recto) concuerda con la prevalencia anatómica de los GISTs. Sin embargo, las localizaciones no gastrointestinales de una pequeña proporción de GISTs (omento, peritoneo y retroperitoneo) pone de manifiesto que la histogénesis de estos tumores es todavía incierta (12).

Las CIC integran una parte de la fisiología de las funciones motoras digestivas como células marcapasos, controlando el peristaltismo, la contracción muscular y probablemente como mediadores de neurotransmisión (3).



**Fig.1** (A-B) HE y tinción para c-kit que pone de manifiesto la presencia de CIC en relación a plexo mientérico en el intestino adulto. (C-D) HE y tinción para c-kit que pone de manifiesto la presencia de CIC en forma de cinturón en la capa muscular externa en el intestino fetal.

#### **4. EPIDEMIOLOGÍA Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS:**

La incidencia de los GISTs es de 10-20 casos/millón de habitantes. Ocurren típicamente en personas de más de 50 años, con una media de 55-65 años. Son raros en menores de 40 años y excepcionales en niños (27). Predominan ligeramente en varones.

Se localizan con mayor frecuencia en estómago (50-60%), seguidos de intestino delgado (20%), colon y recto (10%), y esófago (<5%). Ocasionalmente se localizan en epiplón, mesenterio y retroperitoneo (5%) (25).

La localización es un factor pronóstico independiente, de forma que los tumores localizados en intestino delgado tienen peor pronóstico que los gástricos.

Se han descrito variantes morfológicas asociadas a determinada localización: las lesiones epitelioideas ocurren con más frecuencia en estómago, mientras que las lesiones fusocelulares en intestino delgado muestran un patrón de tipo paraganglioma-like, organoide y contienen fibras esquenoides.

##### **Espectro clínico:**

Los síntomas dependen del tamaño y la localización, aunque son inespecíficos. Algunos GISTs gástricos y de intestino delgado son pequeños (<2 cm), asintomáticos, y se detectan de forma incidental durante controles por enfermedad neoplásica o durante la cirugía por otra causa no relacionada. Según diferentes estudios, los GISTs gástricos se presentan de forma más frecuente con discreto dolor abdominal o hemorragia digestiva alta. En GISTs de intestino delgado los síntomas son dolor, hemorragia o signos de obstrucción (27).

#### **5. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS E HISTOLÓGICAS:**

##### **Espectro macroscópico:**

Los GISTs pueden medir entre 0,3 y 38 cm. de diámetro máximo. La mayoría de lesiones pueden presentar un crecimiento endofítico o exofítico, expansivo (21%), pseudoexpansivo con formación de nódulos satélite (45%) o infiltrativo (34%), entre el tejido adiposo de los mesos o disociando las fibras musculares lisas. Este tipo de crecimiento, en ocasiones sin límites netos, puede ser la causa de una resección incompleta del tumor cuando se practica una simple

enucleación, aunque en general son tumores bien delimitados, no encapsulados, a veces pseudoencapsulados. Por su relación con la pared del tubo digestivo, pueden tener localización submucosa (con o sin ulceración de la mucosa suprayacente), intramural o subserosa. A la sección, la superficie de corte puede ser de color variable (grisáceo, blanquecino, rojizo o parduzco), dependiendo del grado de hemorragia; y suelen ser sólidos de aspecto carnoso, con áreas de degeneración quística o necrosis, más frecuentes en lesiones de gran tamaño (28). Suelen ser únicos; si hay más de un GIST, se debe descartar que se trate de un GIST familiar o asociado a otras afecciones concomitantes (neurofibromatosis, tríada de Carney) (29).

El aspecto macroscópico más característico es en forma de masa tumoral dependiente de la pared gástrica o intestinal proyectada hacia la cavidad abdominal, aunque otras veces se presenta como masa polipoide intraluminal. Algunos tumores pueden crecer en ambos sentidos en forma de “reloj de arena”. De forma ocasional, pueden crecer en el omento gastrocólico o gastrohepático, separados de la pared gástrica o intestinal. A veces, son multicéntricos y se presentan en forma de múltiples nódulos intramurales y en el omento.

### **Espectro histológico:**

Los GISTs presentan un amplio espectro histológico debido a las distintas morfologías celulares que pueden presentar: células fusiformes (77%), células epitelioides (8%) y mixtos (15%) (25).

Los tumores predominantemente fusocelulares están constituidos por células con núcleo fusiforme y escaso citoplasma pálido y eosinófilo, de aspecto fibrilar. En el 5% de los casos pueden observarse vacuolas citoplasmáticas yuxtannucleares, sobre todo en los tumores gástricos. Son generalmente hipercelulares y pueden presentar un crecimiento sin patrón definido, fascicular, verticilado, estoriforme o formando empalizadas nucleares (recordando tumores de nervio periférico) con mínimo estroma intercelular.

El grupo de tumores epitelioides está constituido por células con citoplasma amplio, generalmente eosinófilo, incluso de aspecto oncocítico, o claro, con bordes bien definidos. Pueden presentar glucógeno intracitoplasmático de distribución perinuclear (30). El espectro histológico incluye variantes con nidos

sólidos, patrón cordonal, trabecular, organoide o alveolar, formando grupos celulares de tipo insular (simulando tumores neuroendocrinos), o con vacuolización citoplasmática.

Los tumores de tipo mixto muestran transición abrupta entre el componente fusocelular y el epitelioide.

El estroma puede ser mixoide o hialinizado, con hialinización perivascular (28). La densidad celular y el estroma varían según cada caso. Las características nucleares de los GISTs son muy variables, desde una población celular monótona ovalada/fusiforme hasta un pleomorfismo nuclear marcado, aunque no es un hallazgo común. El índice mitótico es muy variable, y oscila entre la ausencia de mitosis y la presencia de más de 150 mitosis en 50 campos microscópicos de gran aumento (CGA).

Los GISTs localizados en intestino delgado son generalmente fusocelulares, y en esta localización presentan fibras colágenas extracelulares en madeja, llamadas “fibras esquenoides” (31), intensamente eosinófilas, PAS positivas, que aunque fueron interpretadas como un signo de diferenciación neural, parece que carecen de significado histogenético (1, 16) y se asocian a buen pronóstico.

Los GISTs de colon y recto son frecuentemente fusocelulares.

Se puede observar un variable componente inflamatorio asociado, de predominio linfoplasmocitario, cambios microquísticos, necrosis y hemorragia. La trama vascular puede ser de densidad variable.

Este amplio perfil histomorfológico, junto con los hallazgos IHQ y ultraestructurales, sugieren una gran diversidad de opciones de diferenciación.

## **6. ESPECTRO INMUNOHISTOQUÍMICO:**

Uno de los elementos clave de la guía consenso de la National Institutes of Health (NIH) publicada en 2002 fue definir el papel determinante de la inmunoreactividad para c-kit (CD117) en el diagnóstico de los GISTs (1). Así pues, la expresión de c-kit es una de las características que mejor define a este grupo de tumores, aunque no es un marcador celular o tumoral específico (Tabla. 1-2) (5, 32).

**Tabla.1** Expresión de c-kit en tejido normal

<i>Tracto gastrointestinal</i>	<i>Tejido extragastrointestinal</i>
<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>CIC</b></li><li>• <b>Mastocitos</b></li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• <i>Células precursoras hemopoyéticas CD34 positivas</i></li><li>• <i>Melanocitos</i></li><li>• <i>Células basales epidérmicas</i></li><li>• <i>Células de Langerhans inmaduras epidérmicas</i></li><li>• <i>Células epiteliales (mama, glándula salival, túbulos renales)</i></li><li>• <i>Células gliales</i></li><li>• <i>Precursores osteoclasto</i></li></ul>

**Tabla.2** Tumores c-kit positivos

<i>Tumores gastrointestinales</i> <ul style="list-style-type: none"><li>• <i>GIST</i></li></ul>
<i>Tumores de localización extragastrointestinal</i> <ul style="list-style-type: none"><li>• <i>Melanoma (ausente en fase de crecimiento vertical y metástasis)</i></li><li>• <i>Sarcoma de células claras de tendones y aponeurosis</i></li><li>• <i>Carcinoma endometrial</i></li><li>• <i>Carcinoma oat-cell pulmonar</i></li><li>• <i>Grupo de sarcoma de Ewing</i></li><li>• <i>Linfoma anaplásico</i></li><li>• <i>Células de Reed-Sternberg de linfoma de Hodgkin</i></li><li>• <i>Mastocitosis</i></li><li>• <i>Leucemia mieloide aguda</i></li><li>• <i>Glioma</i></li><li>• <i>Germinoma</i></li></ul>

Se observa positividad para c-kit en el 80-100% de GISTs, independientemente de la citomorfología. La ausencia de expresión de c-kit en tumores de músculo liso y neurales hace que sea de gran utilidad en el diagnóstico diferencial entre GIST y otros tumores mesenquimales del TGI (2, 4, 32). El estudio clínico-patológico realizado por Miettinen et al sobre GISTs primarios de omento, peritoneo y retroperitoneo refuerza la importancia de c-kit para diferenciar GISTs de localizaciones poco frecuentes de otros tumores mesenquimales en estas localizaciones, facilitando un correcto diagnóstico y un adecuado seguimiento clínico.

La positividad para c-kit en general es intensa y difusa, de tipo citoplasmático, de membrana o con acentuación paranuclear en la zona de Golgi (2, 4, 33). Esta variedad de patrones de tinción podría correlacionarse con diferentes tipos

de mutación de *c-KIT*. En la mayoría de casos la tinción alcanza el 90-100% de las células tumorales, y sólo en pocos casos la tinción es focal (en el 5-20% de las células tumorales). Sin embargo, existen casos en los que la tinción es más débil o sólo membranosa, además de tener una distribución más irregular de las células positivas (20-30%). Estos casos pueden ser motivo de confusión y deben ser evaluados de modo riguroso.

El patrón de tinción paranuclear (Golgi-like) se ha relacionado con la acumulación de proteína c-kit alterada, en GISTs con mutaciones que provocan su activación y fosforilación, que permanece secuestrada en el retículo endoplásmico o compartimento de Golgi, sin completar su maduración y poder dirigirse a la membrana celular. A partir de este hecho, se propuso como posible marcador de mutaciones en *c-KIT* (34-35). En diferentes estudios se ha observado este patrón de tinción tanto en GISTs con mutaciones en *c-KIT* como *PDGFRA* y wild-type, indicando que este tipo de expresión no es mutuamente excluyente, desde el punto de vista mutacional. Algunos estudios describen asociación estadísticamente significativa con mutaciones en *c-KIT*, principalmente en el exón 11, pero también en el exón 9 (36).

Es importante que la técnica esté estandarizada, utilizando un anticuerpo y dilución constante, y empleando controles positivos y negativos, tanto externos como internos (fibroblastos y estroma peritumoral). Los mastocitos intratumorales son un buen control interno positivo.

Debido a la importancia de su implicación terapéutica, el estudio de c-kit debe hacerse de modo exhaustivo, especialmente en casos dudosos o negativos. Como la tinción se efectúa en cortes procedentes de tumores incluidos en parafina, se deben tener en cuenta ciertas circunstancias que pueden alterar el resultado, dando lugar a falsos negativos. Entre las causas más frecuentes hay que tener en cuenta:

- mala fijación del tumor con formol. Excesivo calor en la elaboración del bloque de parafina. Prolongado almacenamiento de los bloques de parafina.
- negatividad real debido a que se han producido mutaciones genéticas que bloquean la expresión de la proteína.
- error de muestreo (muestras muy pequeñas).

- negatividad real por falta de mutación en el gen *c-KIT*, pero con mutación de otra tirosinquinasa, relacionada con el receptor c-kit, como el receptor alfa del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (*PDGFRA*)

En estos casos excepcionales los tumores se deberían diagnosticar como “neoplasia estromal fusocelular (o epiteliode) compatible con GIST”, y sería recomendable hacer un estudio mutacional con técnicas de biología molecular. La positividad de c-kit es algo más débil en los GISTs de morfología epiteliode (25).

La mayoría de los GISTs (70-80%) son positivos para CD34, aunque este anticuerpo puede expresarse en una amplia variedad de tumores (**Tabla.3**).

**Tabla.3** Tumores CD34 positivos

---

*Tumores gastrointestinales*

- *GIST*

*Tumores de localización extragastrointestinal*

- *Tumores de músculo liso*
  - *Tumor fibroso solitario*
  - *Dermatofibrosarcoma protuberans*
  - *Sarcoma de Kaposi*
  - *Lipoma de células fusiformes*
  - *Neurofibroma*
  - *Tumores vasculares*
  - *Sarcoma epiteliode*
- 

La doble positividad de los GISTs para CD34 y c-kit, hace que su fenotipo sea superponible al de las CIC (4).

La tinción IHQ para otros marcadores es mucho más variable. El 80% de los casos expresan bcl-2, un 30-40% son positivos para actina músculo liso (SMA) y un 5-10% son positivos para proteína S-100. La desmina es positiva en 1-2% de los casos. También se ha observado positividad para marcadores neuroendocrinos, en aquellos casos que antes se consideraban GANT, especialmente cromogranina, sinaptofisina y enolasa neuronal específica.

En lo que refiere a la controversia sobre un posible origen miogénico, los marcadores musculares como actina músculo específica (HHF-35) y actina de músculo liso (SMA) pueden expresarse de forma focal; en cambio la desmina casi nunca se expresa. Estos hallazgos podrían sugerir una diferenciación

miode incompleta. Algunos de estos tumores expresan proteína S-100 y enolasa, indicando una diferenciación schwanniana/neural. Excepcionalmente, algún caso puede expresar tanto marcadores mioides como neuronales, en forma de diferenciación divergente y podría sugerir un origen a partir de células madre mesenquimales pluripotenciales.

Hay que tener en cuenta que hay otros tumores c-kit positivos que pueden afectar el TGI y ser confundidos con GISTs, como por ejemplo metástasis de melanoma, angiosarcoma, sarcoma de Kaposi, sarcoma de Ewing, mastocitoma, seminoma y carcinoma pulmonar de célula pequeña.

Se han descrito nuevos marcadores inmunohistoquímicos en los GISTs, algunos positivos también en las CIC, como PDGFRA, proteinquinasa C (PKC)-theta, nestina, o la forma embrionaria de la cadena pesada de la miosina muscular lisa. Además, se ha descrito positividad para DOG1 (discovered on GIST-1), CD99 y merlina, entre otros. DOG-1, también conocido como TMEM16A, es una proteína transmembrana que suele estar sobrerregulada en GISTs, y muestra mayor sensibilidad y especificidad que c-kit y CD34(37); aunque sólo es concluyente en un tercio de los GISTs que son negativos para c-kit, presentando dificultades en los dos tercios restantes para ser validados desde el punto de vista inmunohistoquímico (38). En la práctica, la coexpresión difusa de c-kit y DOG1 podría ser utilizada como característica diagnóstica de GIST. El resto de marcadores, aunque están comercializados, no muestran resultados reproducibles sobre material en parafina.

## **7. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL:**

El diagnóstico diferencial de los GISTs depende de la morfología que presenten. GISTs con morfología fusocelular se deben diferenciar principalmente de tumores de músculo liso, fibromatosis o tumor desmoide, schwannoma, tumor miofibroblástico inflamatorio, pólipo fibroide inflamatorio y tumor fibroso solitario (**Tabla.4**)(**Fig.2**). GISTs con morfología epitelioides se deben diferenciar de carcinomas, tumores neuroendocrinos y sarcomas de células claras.

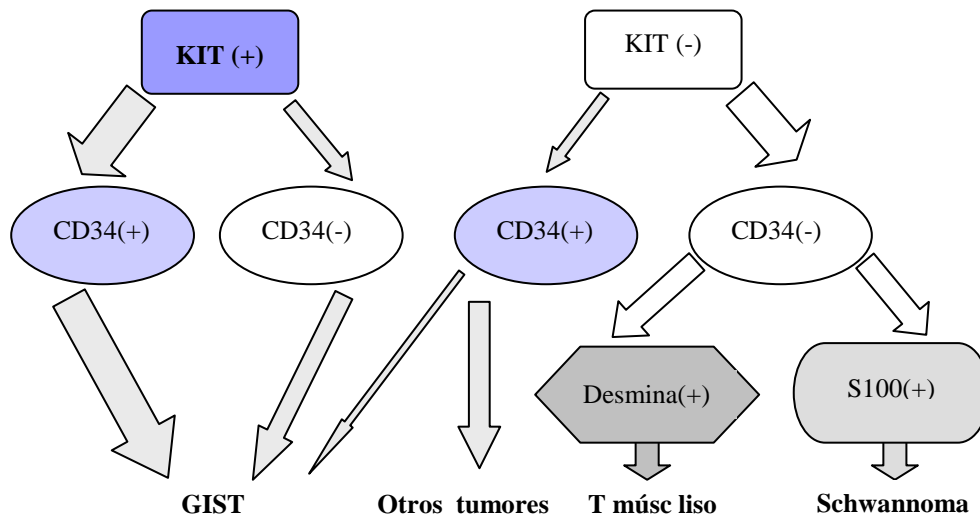


**Tabla.4** Algoritmo IHQ útil en el diagnóstico diferencial de tumores mesenquimales primarios del TGI

<b>Entidad histológica</b>	<b>Características morfológicas</b>	<b>Localización GI</b>	<b>Epidemiología</b>
Leiomioma (intramural)	Fusocelular. Positividad para marcadores de músculo liso y desmina. Negatividad para c-kit y CD34	Esófago	<i>Adultos jóvenes</i>
Leiomioma (de muscularis mucosa)	Lesiones polipoides pequeñas de la mucosa con las mismas características que el intramural. Pueden expresar receptores de estrógeno y progesterona	Colon y recto	<i>Adultos de mayor edad</i>
Leiomiosarcoma	Similar al leiomioma, pero con atipia citológica y actividad mitótica. Positividad para marcadores de músculo liso y desmina. Negatividad para c-kit y CD34	Colon	<i>Adultos de mayor edad</i>
Tumor glómico	Células redondeadas con citoplasma variable eosinófilo, patrón idéntico al de partes blandas. Positividad para actina específica de músculo liso y variable para CD34. Negatividad para c-kit	Estómago	<i>Adultos, mujeres</i>
Schwannoma	Células fusiformes formando microtrabéculas o microfascículos. Pequeño tamaño y circunscrito, de color amarillento. Positividad para S100 y GFAP. Negatividad para c-kit y CD34	Estómago, colon	<i>Adultos de mayor edad</i>
Tumor miofibroblástico inflamatorio	Células fusiformes, elongadas, con amplio citoplasma, en relación a abundantes linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos. Positividad para ALK y reordenamiento. Negatividad para c-kit y CD34	Cualquier segmento del TGI	<i>Niños y adultos jóvenes</i>
Pólipo fibroide inflamatorio	Células epitelioides o fusiformes en una matriz fibromixoide con abundantes capilares, células inflamatorias y eosinófilos. Positividad variable para CD34. Negatividad para c-kit	Intestino delgado, estómago	<i>Cualquier edad</i>
Tumor fibroso solitario	Células fusiformes con estroma colagenizado y patrón hemangiopericitoide. Positividad para CD34, bcl2 y CD99. Negatividad para c-kit	Superficies peritoneales, hígado	<i>Cualquier edad</i>
Fibromatosis	Células fusiformes, moderadamente celular con estroma colagenizado o mixoide. Positividad para B-catenina. Negatividad para c-kit	Estómago, intestino delgado	<i>Jóvenes</i>
Sarcoma sinovial	Células fusiformes, hiper celular. Positividad para queratina, CD99. Negatividad para c-kit	Estómago	<i>Cualquier edad</i>

Liposarcoma indiferenciado	Células fusiformes de morfología variable y componente de liposarcoma lipoma-like. Negatividad para c-kit	Intrabdominal , intestinal	Adultos jóvenes y de mayor edad
Melanoma metastático	Morfología variable. Positividad para c-kit y marcadores melanocíticos (HMB45, Melan-A). Negatividad para CD34	Cualquier segmento del TGI	Cualquier edad
Carcinoma, carcinoma neuroendocrino	Positividad para queratinas, +/- cromogranina y sinaptofisina. Negatividad para c-Kit y CD34	Cualquier segmento del TGI	Cualquier edad
Sarcoma de células claras	Positividad para S-100 y marcadores melanocíticos (HMB45, Melan-A). Negatividad para CD34		

**Fig.2.** Algoritmo IHQ para el diagnóstico diferencial de tumores mesenquimales del TGI



## 8. EVALUACIÓN DEL POTENCIAL MALIGNO:

De forma paralela a su histogénesis, la evaluación del potencial maligno de los GISTs se ha mantenido como tema de controversia durante décadas hasta la actualidad.

Las primeras sugerencias para clasificar los GISTs se remontan a la era pre-kit. Varios autores publicaron estudios sobre factores pronóstico (39-41) y consideraron varios parámetros como la morfología, histología, celularidad, atipia, necrosis, tamaño, número de mitosis e índice proliferativo, para dividir los GISTs en grupos de bajo y alto riesgo.

Entre el 10-30% de estos tumores tienen un comportamiento maligno con capacidad de recidivar y metastatizar, principalmente a nivel peritoneal y hepático. Aunque se han descrito criterios histopatológicos para identificar los tumores malignos (tamaño tumoral, localización, necrosis e índice mitótico) el único criterio absoluto de malignidad es el crecimiento a distancia. Sin embargo, dos son los parámetros estructurales que se consideran predictivos del comportamiento de estos tumores: el tamaño tumoral y el número de mitosis contadas en secciones histológicas (10 mm<sup>2</sup>), en 50 campos microscópicos de gran aumento, x400 (mitosis/50 CGA). El recuento de mitosis se debe realizar en las áreas con mayor índice mitótico. La mayoría son regulares y son excepcionales las mitosis atípicas. Se han establecido distintos grupos de riesgo en base a los dos criterios previamente citados, y se han relacionado con diferentes curvas de supervivencia.

La introducción de dianas terapéuticas, como el mesilato de imatinib, ha supuesto un mayor interés por conocer más sobre la biología y comportamiento de los GISTs.

#### **Criterios consenso Nacional Institutes of Health (NIH)/criterio Fletcher:**

La estratificación del riesgo de recurrencia es importante para planificar la estrategia terapéutica postcirugía. El primer esquema aceptado para predecir el riesgo de comportamiento clínico agresivo, basado en estudios previos, fue publicado en 2002 por Fletcher y colaboradores, después de un taller de consenso celebrado en el NIH. El esquema de evolución de riesgo propuesto (NIH-Fletcher 2001) se basa en dos parámetros estructurales bien reconocidos, el tamaño tumoral y el número de mitosis en 50 CGA; de esta forma se establecen los diferentes grupos de riesgo: muy bajo riesgo, bajo riesgo, riesgo intermedio y alto riesgo (1) (Tabla.5).

La aplicación de este esquema de riesgo a un grupo de 288 pacientes que nunca recibieron mesilato de imatinib mostró que el 50% de los que tenían un riesgo alto fallecía a los 2,5 años después del diagnóstico, el 68% de ellos a causa del tumor; el 50% de los casos con un tumor diseminado moría en

1,5 años (el 69% a causa del tumor). El resto de los grupos de riesgo tuvo una supervivencia semejante a la esperada en la población sana.

**Tabla.5** Grupos de riesgo en GIST según Fletcher

<b>Índice mitótico (50CGA)**</b>	<b>Tamaño*</b>	<b>Grupo de riesgo</b>
<5 mitosis	<2 cm	Muy bajo riesgo (MBR)
<5 mitosis	2-5 cm	Bajo riesgo (BR)
6-10 mitosis	<5 cm	Riesgo intermedio (RI)
<5 mitosis	5-10 cm	
>5 mitosis	>5 cm	Alto riesgo (AR)
Cualquier índice	>10 cm	
> 10 mitosis	Cualquier tamaño	

\*Tiene en cuenta la dimensión mayor. Se admite la variabilidad al medir el tumor antes o después de la fijación y la existente entre distintos observadores.

\*\*Idealmente se debería expresar el índice mitótico en relación con la superficie examinada a partir del tamaño de un CGA.

### **Crterios Armed Forces Institute of Pathology (AFIP)/criterios Miettinen:**

Entre 2005 y 2006 Miettinen y colaboradores realizan dos grandes estudios sobre GISTs de localización gástrica y GISTs de yeyuno/ileon con largos tiempos de seguimiento clínico (42-43), que proporcionaron una fuerte evidencia de que los GISTs gástricos tienen un comportamiento menos agresivo que los GISTs intestinales de yeyuno e ileon, con similar tamaño y actividad mitótica (44). En base a estos estudios, se considera la localización anatómica como un parámetro adicional para la evaluación del riesgo de los GISTs, según la actualización de las guías consenso de Nacional Comprehensive Cancer Network (NCCN) de 2007 (AFIP-Miettinen 2006) (Tabla.6). Según estas nuevas guías, un GIST de menos de 2 cm puede ser considerado como benigno. De esta manera se discriminan mejor las poblaciones de riesgo que con el índice de Fletcher, especialmente entre grupos de riesgo intermedio y bajo. El rango de riesgo para la recidiva varía desde un 2% en los tumores gástricos con menos de 5 mitosis/50 CGA y con un tamaño de 5 cm o menos y del 90% en GISTs intestinales de más de 10 cm y más de 5 mitosis/50 CGA.

Esta nueva clasificación supone un importante avance en la estratificación del pronóstico de los GIST, aunque tiene algunas limitaciones. Algunos subgrupos

(tumores duodenales inferiores a 2 cm con índice mitótico superior a 5 mitosis/50CGA) carecen o sólo tienen alguno de los parámetros utilizados como pronóstico en esta clasificación, de forma que no puede establecerse una categoría adecuada de riesgo. Otro factor limitante es que no incluye información sobre GISTs esofágicos, cólicos o extragastrointestinales, y sólo se puede hacer una extrapolación de su posible evolución clínica.

La ruptura tumoral espontánea o iatrogénica y la exéresis incompleta aumentan el riesgo de recurrencia.

**Tabla.6** Grupos de riesgo en GIST según Miettinen

<b>Índice mitótico (50 CGA)</b>	<b>Tamaño</b>	<b>Estómago</b>	<b>Intestino delgado</b>	<b>Intestino grueso</b>	<b>Otras localizaciones</b>
<b>≤ 5 mitosis</b>	<b>≤2 cm</b>	MBR	MBR	MBR	MBR
	<b>&gt;2 ≤5 cm</b>	MBR	BR	BR	BR
	<b>&gt;5 ≤10 cm</b>	BR	RI	RI	RI
	<b>&gt;10 cm</b>	RI	AR	AR	AR
<b>&gt;5 mitosis</b>	<b>≤2 cm</b>	BR	AR	AR	AR
	<b>&gt;2 ≤5 cm</b>	RI	AR	AR	AR
	<b>&gt;5 ≤10 cm</b>	AR	AR	AR	AR
	<b>&gt;10 cm</b>	AR	AR	AR	AR

**Sistema de estadiaje tumor-ganglios-metástasis (TNM):**

Los sistemas de estadiaje propuestos por la American Joint Committee on Cancer (AJCC) no son específicos para GIST, y se consideran una permutación de la clasificación de riesgo propuesta por la AFIP.

Define el estadiaje T en función del tamaño: T1, tumor ≤2 cm; T2, tumor > 2 cm <5 cm; T3, tumor >5 cm <10 cm; y T4, tumor >10 cm. Asigna un grado histológico en función del número de mitosis/50 CGA: “bajo grado histológico”

cuando el recuento es  $\leq 5$  mitosis/50 CGA; y “alto grado histológico” cuando el recuento es  $>5$  mitosis/50 CGA.

### **Nomograma Memorial Sloan-Ketering Cancer Center:**

Gold y colaboradores realizan un estudio en 2009 con 127 pacientes del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC), validado posteriormente con los pacientes del grupo español de investigación en sarcomas (GEIS) y con los de la Clínica Mayo de Rochester, que permite diseñar y validar un nomograma que es capaz de individualizar de una manera más concreta el riesgo de progresión de cada paciente.

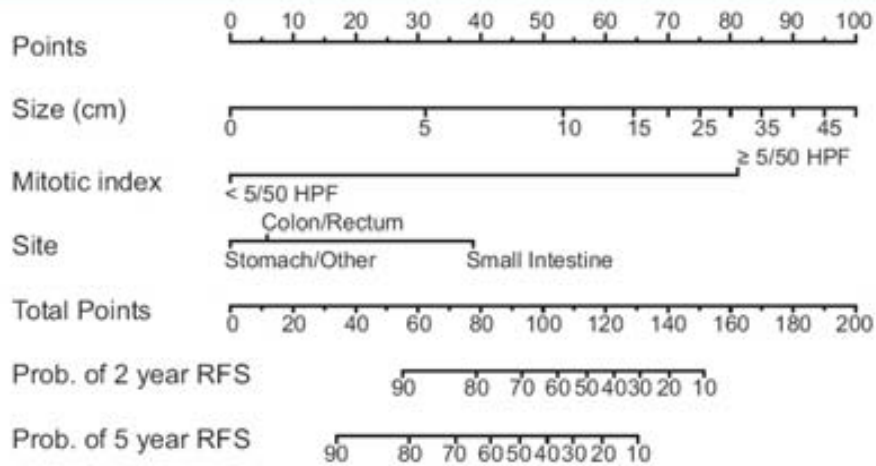
Un nomograma es una interfaz gráfica para un modelo estadístico con variables de importancia pronóstica para predecir con precisión la evolución de los pacientes de forma individual.

Este nomograma pronóstico predice la supervivencia libre de recurrencia (SLR) a los 2 y 5 años después de la cirugía, en GIST localizados, en ausencia de tratamiento (45) (**Tabla.7**). Tiene en cuenta los factores pronósticos independientes ya conocidos (tamaño, índice mitótico y localización), y asigna puntos según el tamaño del tumor (de forma continua, pero no lineal), la localización (estómago, intestino delgado, colon/recto o localizaciones extraintestinales) y el número de mitosis del tumor primario ( $<5$  o  $>5$  mitosis/50 CGA). La suma total de los puntos determina la probabilidad de SLR a los 2 y 5 años, expresado en forma de porcentaje (%) (**Fig.3**). El nomograma ha presentado mejor precisión predictiva en comparación con otros sistemas de evaluación del riesgo, como el propuesto con anterioridad por NIH-Fletcher 2001 (que no discrimina el riesgo de recurrencia de los grupos de muy bajo riesgo y bajo riesgo) y que la última modificación de AFIP-Miettinen de 2006, que sólo asigna pacientes a un amplio grupo de riesgo definido. Este nomograma pronóstico está calibrado con curvas de supervivencia de Kaplan-Meier observadas en supervivencia libre de recurrencia de los casos estudiados. Las predicciones del nomograma, basadas en modelos estadísticos, presentan mejor calibración sobre la SLR que las que aportan la clasificación de AFIP-Miettinen, y es capaz de calcular el riesgo de recurrencia

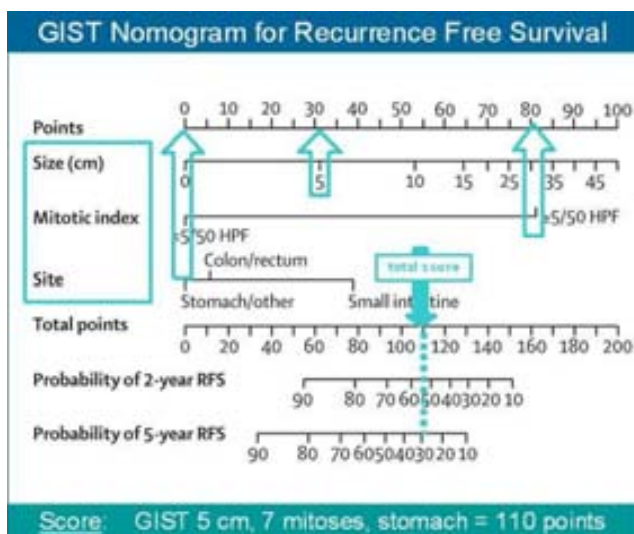
de forma individual, para cada paciente, y no para todo el grupo de riesgo. Sin embargo, se tiene que seguir analizando si el nomograma predeciría la SLR a largo plazo, en GIST de curso indolente y progresión lenta.

En los últimos años se han publicado diferentes estudios que analizan el impacto de distintos factores pronósticos clínicos, patológicos y moleculares sobre la SLR. El nomograma puede ser útil para el cuidado del paciente, la interpretación de los resultados de los ensayos clínicos, y la selección de pacientes para la terapia adyuvante con mesilato de imatinib.

**Tabla.7** Nomograma MSKCC (SLR en GIST)



Se asigna una puntuación en función del tamaño, índice mitótico y localización. La suma de estas tres puntuaciones corresponde a la predicción de SLR a 2 y 5 años.



**Fig.3** Ejemplo de asignación de puntos a cada categoría (tamaño, mitosis, localización) y score final que traduce la probabilidad de SLR a los 2 y 5 años.

### **Factores clínicos:**

La edad, raza y sexo, en principio no influyen en la SLR, pero sí la localización, pues tienen peor pronóstico los GISTs originados en intestino delgado y recto, que los originados en otras localizaciones (44).

La presencia de metástasis peritoneales o hepáticas en el momento del diagnóstico se considera un factor pronóstico adverso que comporta menor supervivencia según múltiples estudios clinicopatológicos (46). Pequeños tumores en la serosa, detectados de forma incidental, tienen un curso favorable (47).

### **Factores anatomopatológicos:**

El número de mitosis/50 CGA y el tamaño del tumor primario son los factores pronósticos más importantes y aceptados, como ya se ha mencionado, para predecir la SLR. Otros parámetros anatomopatológicos estudiados, como la presencia de necrosis, atipia nuclear, el subtipo histológico (epitelioide o fusocelular), la invasión mucosa, la invasión muscular, la densidad celular, fenotipo neural o muscular (48), diferenciación o grado histológico (definido en base a criterios propuestos para sarcomas de partes blandas por la Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer -FNCLCC-), han mostrado importancia pronóstica en el análisis univariable (49).

El marcador inmunohistoquímico Ki-67 es una proteína nuclear asociada a proliferación celular, que se expresa en las fases de crecimiento y síntesis del ciclo celular (G1, S, G2 y M), excepto en la fase G0. Este antígeno refleja la proporción de células activas en el ciclo celular, y según algunos autores muestra una alta correlación con el índice mitótico (50). Diferentes estudios han confirmado el valor pronóstico de Ki-67 en los GIST (51-52). Las diferencias entre los diferentes estudios publicados se encuentran en establecer el valor de corte del índice Ki-67, que varía entre 4,5% y 10%. Nakamura propone la utilidad del índice de proliferación Ki-67 en la predicción de la evolución clínica (53); mientras que para Wong la determinación del índice de proliferación nuclear Ki-67, con anticuerpo monoclonal MIB-1, es más fiable que el número de mitosis (54). Determinaciones  $\geq 10\%$  se asocian a peor pronóstico (55).



## 9. SIGNIFICADO DE C-KIT:

La proteína c-kit es un receptor tirosinquinasa transmembrana de tipo III, codificada por el protooncogen *c-KIT*, localizado en el cromosoma 4 (4q11-12), en una región de aproximadamente 70 kilobases (56) (Fig.4). El gen *c-KIT* es un homólogo celular del oncogen *v-KIT*, encontrado en el genoma del virus del sarcoma felino HZ4 en 1986 (57). La molécula de *c-KIT* tiene un peso molecular de 145 kDa y consiste en 976 aminoácidos, que constituyen 21 exones y consta de los siguientes dominios (Fig.5):

- dominio extracelular (EC domain) constituido por cinco regiones de tipo inmunoglobulina
- dominio transmembrana (TM domain)
- dominio yuxtamembrana (JM domain) con actividad reguladora en la dimerización de KIT
- dominio intracelular responsable de la actividad quinasa, y que se divide en dos por inserción de una quinasa (TK-I: región de unión a adenosina trifosfato o ATP y TK-II: región fosfotransferasa)

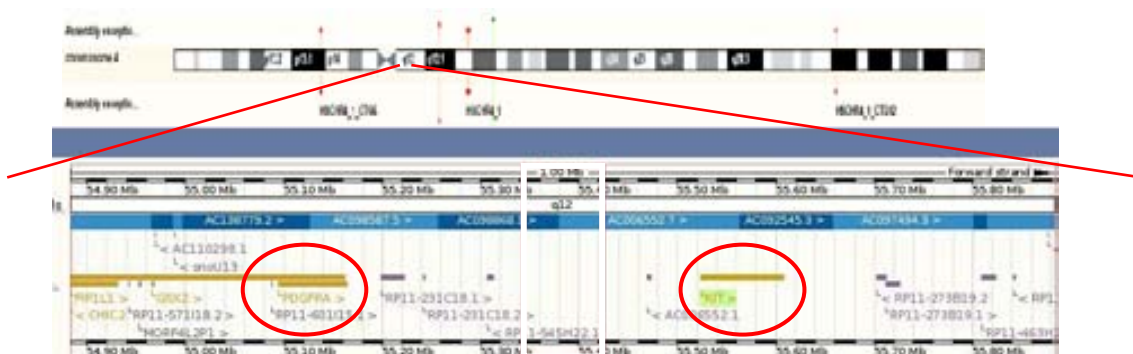
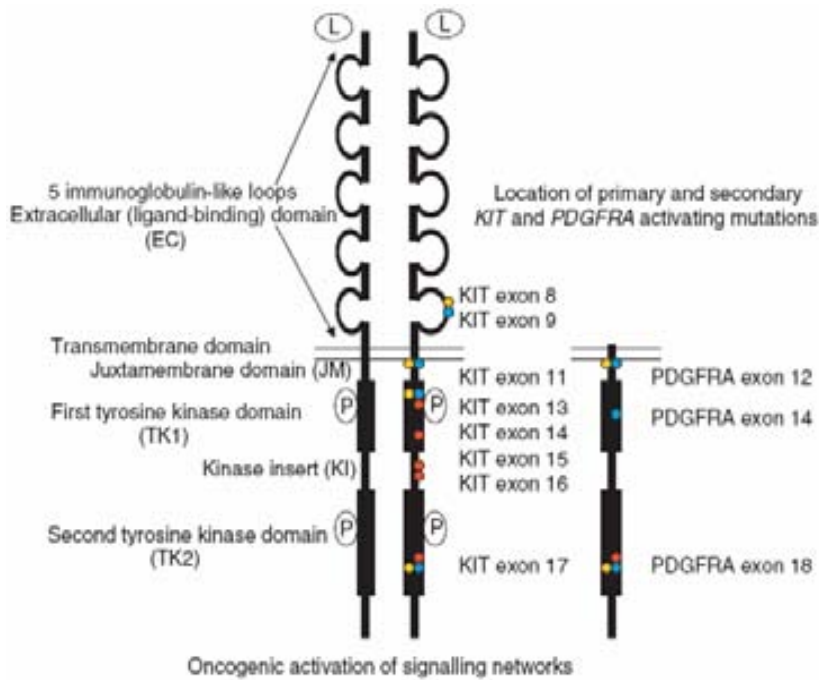


Fig.4 Gen *c-KIT*, localizado en 4q11-12, contiene 21 exones, codifica una proteína transmembrana, con 5 dominios. Peso 145kDa.



**Fig.5** Receptor transmembrana c-kit con 5 dominios: extracelular (EC), transmembrana (TM), yuxtamembrana (JM) e intracelular (TK1, TK2). Adyacente se encuentra el receptor PDGFRA.

Activación de los receptores c-kit y PDGFRA por mutaciones activadoras (gain-of-function) expresadas como puntos azules (mutaciones primarias esporádicas), amarillos (mutaciones primarias hereditarias) y rojos (mutaciones secundarias al tratamiento), independientes del ligando (L), que provocan dimerización del receptor, autofosforilación de tirosinas y activación de la vía de señalización celular. *Lasota & Miettinen. Clinical significance of oncogenic KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors. Histopathology 2008; 53 (3): 245-66.*

El receptor c-kit está íntimamente relacionado con otros receptores como son PDGFRA, PDGFRB y el receptor del factor estimulante de la formación de colonias de macrófagos (M-CSF). Todos ellos se caracterizan por secuencias homólogas en los dominios yuxtamembrana (JM) y tirosinquinasa (TK).

Las interacciones entre c-kit y su ligando, “stem cell factor” (SCF), que se une al receptor extracelular (58-59), son vitales para la supervivencia celular, proliferación y diferenciación.

La activación normal de c-kit se produce cuando dímeros bivalentes del ligando (SCF) interaccionan con el receptor produciendo su activación (autofosforilación). La autofosforilación de determinados residuos de tirosina antagoniza la conformación estructural autoinhibitoria y conduce a la activación de la función quinasa, que conlleva la fosforilación de c-kit. Estas tirosinas fosforiladas sirven como sitios de unión para una serie de proteínas de

señalización celular que desencadenan un intrincado de vías de transducción de señales, que controlan funciones celulares como la proliferación, adhesión, apoptosis y diferenciación (Fig.6-7).

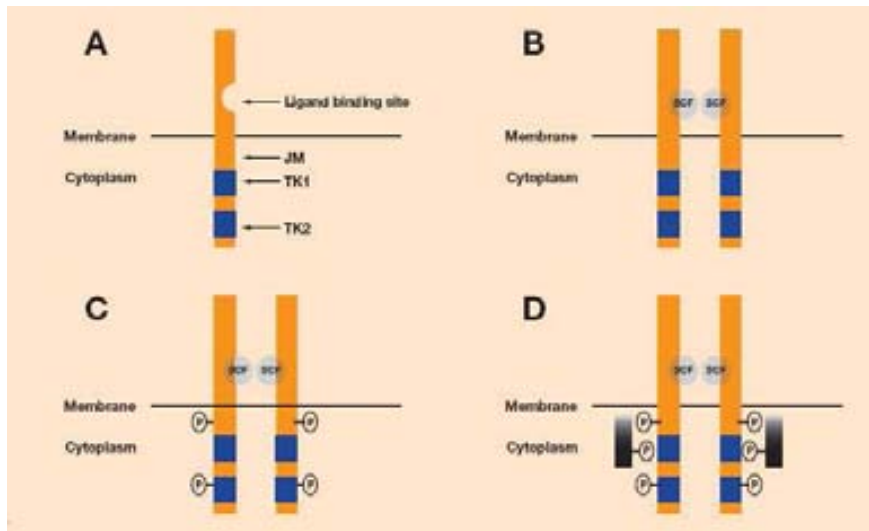
La proteína c-kit se expresa en una amplia variedad de tejido normal, actúa como receptor de factor de crecimiento de los mastocitos y tiene una función importante en la regulación de células madre como células hemopoyéticas, melanocitos, células germinales y CIC.

Las CIC son las únicas células del TGI que expresan c-kit en condiciones normales.

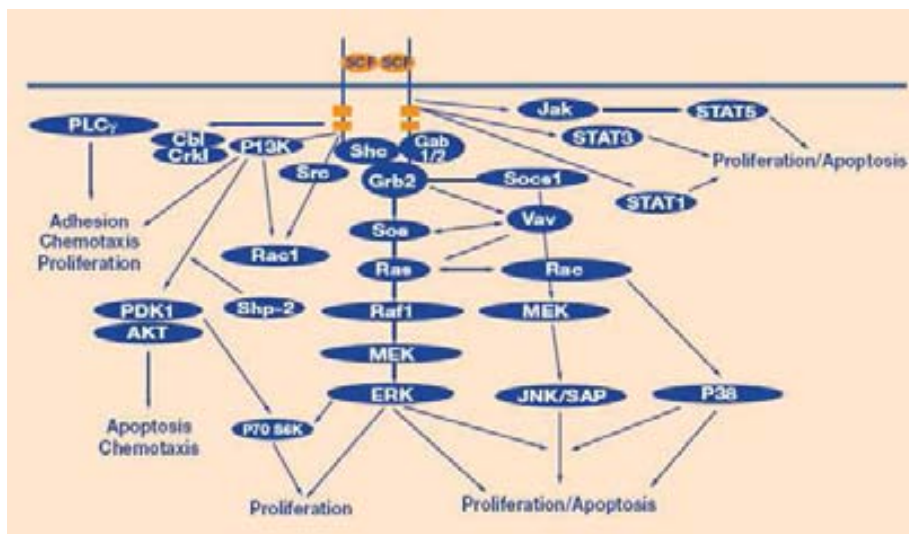
La ausencia de señal de la unión SCF-c-kit provoca ausencia de desarrollo y función de las CIC. Su significado funcional se hace aparente en base a estudios experimentales donde ratones con proteína c-kit deficiente presentaban alteraciones en la motilidad intestinal y morían a consecuencia de íleo paralítico (22).

La actividad quinasa de c-kit tiene múltiples niveles de control. La alteración en alguno de ellos puede provocar una activación quinasa aberrante y posterior oncogénesis. La actividad quinasa de c-kit puede estar controlada por mecanismos extrínsecos (presencia de ligando o substratos y moléculas fosfatasa) o intrínsecos: en ausencia de ligando, en condiciones normales c-kit se presenta como un monómero inactivo en el que la actividad enzimática está inhibida por componentes estructurales intrínsecos (60). La autoinhibición de c-kit previene la activación constitutiva y permite respuestas específicas frente a ligandos externos.

Los mecanismos de control de la actividad quinasa pueden verse alterados por mutaciones de c-KIT.



**Fig.6** (A) Activación inducida por el ligando de la actividad tirosinquinasa de c-kit. (B) La unión del ligando dimérico SCF provoca la dimerización de c-kit. (C) La dimerización activa los dominios tirosinquinasa citoplasmáticos, y provoca la autofosforilación (P) de residuos de tirosina seleccionados. (D) Los sustratos y las proteínas adaptadoras se unen a los residuos de tirosina fosforilados. *Heinrich et al. Hum Pathol 2002; 33: 484-495*



**Fig.7** Vías de transducción de señales intracelulares activadas por activación de c-kit. *Heinrich et al. Hum Pathol 2002; 33: 484-495*

## 10. MUTACIONES EN EL GEN C-KIT:

Se reconocen dos tipos de mutaciones en el gen *c-KIT*:

- mutaciones activadoras (“gain-of-function”): la actividad tirosinquinasa de c-kit aparece constitutivamente aumentada en ausencia de ligando, y participa de forma activa en la patogénesis de los GISTs.

- mutaciones inhibitoras (“loss-of-function”): se pierde la actividad tirosinquinasa de c-kit, y no participaría en la patogénesis de los GISTs.

Las mutaciones activadoras de *c-KIT* pueden ser de dos tipos (**Fig.6**):

- mutaciones de tipo regulador (dominio extracelular y yuxtamembrana): mutaciones que alteran la secuencia de aminoácidos de regiones reguladoras de la actividad quinasa de la proteína c-kit, concretamente regiones con función autoinhibidora (61).
- mutaciones del sitio enzimático (dominio TK1 y TK2) que afectan directamente estructuras primarias del sitio enzimático.

La distinción entre mutaciones reguladoras o enzimáticas tiene importancia clínica, dado que si los inhibidores terapéuticos se unen a los dominios con función reguladora mutados no serán efectivos.

Las mutaciones de tipo regulador se reconocen en la región intracelular yuxtamembrana, codificada por el exón 11, que ocasionan activación de la función c-kit (“gain-of-function”), en forma de activación constitutiva. El dominio extracelular de unión de ligando es otra región afectada por mutaciones. Las mutaciones en *c-KIT* también son altamente selectivas de la vía de señalización que activan.

El mayor avance clínico en los GISTs se produce al identificar el papel que juegan las mutaciones activadoras de *c-KIT* en la patogénesis de estos tumores.

Estas mutaciones tienen como resultado la activación ligando-independiente (fosforilación constitutiva) del receptor c-kit. Hirota et al. fueron los primeros en describir mutaciones activadoras en el exón 11 del gen *c-KIT*, que tiene un dominio interno, yuxtamembrana, con función reguladora (5). Las mutaciones en el dominio yuxtamembrana de *c-KIT* representan un grupo heterogéneo “in frame”, que incluye deleciones, mutaciones de cambio de sentido (“missense”), duplicaciones internas en tándem, en el extremo terminal 5’ entre Lys (550) y Glu (561) (62). Mutaciones en el extremo terminal 3’ son poco frecuentes, y son principalmente mutaciones puntuales afectando el codón 576 y duplicaciones (63).

Posteriormente Lux et al secuenciaron *c-KIT* en GIST y encontraron mutaciones en el dominio extracelular, exón 9, y en el dominio quinasa, exón

13 (64). Estas mutaciones consistieron en duplicación de seis nucleótidos, que codificaban *Ala502\_Tyr503* en el exón 9, asociada a peor evolución clínica y asociada a GISTs de localización intestinal (65); y una mutación de cambio de sentido, resultando la substitución de Glu por Lys642 en el exón 13.

Son muchos los estudios que se han dedicado a identificar las mutaciones de *c-KIT* en los GIST, y actualmente dependiendo de las series y de los procedimientos empleados, la incidencia de mutaciones es del 21-92%. Hasta el momento se han encontrado mutaciones de *c-KIT* en los exones 9, 11, 13 y 17. El 20-71% de los pacientes presentan mutaciones en el exón 11 (dominio yuxtamembrana); el 3-13% en el exón 9 (dominio extracelular); el 0-4% en el exón 13 (dominio intracelular con actividad tirosinquinasa) y son muy raras en el exón 17 (que codifica el asa de activación de la enzima). Las mutaciones de los exones 9, 11 y 13 activan el receptor en ausencia de ligando (activación constitutiva), a través de mecanismos que facilitan la dimerización del receptor, mientras que la mutación del exón 17 activaría el dominio tirosinquinasa. Como consecuencia queda activada la cascada de señales intracelulares que regula la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis, y confiere a las células características de malignidad.

El 35% de los GISTs en los que no se detectan mutaciones en *c-KIT*, las presentan en el exón 12 o 18 del gen *PDGFRA* (66).

Se considera que las mutaciones de *c-KIT* y *PDGFRA* son mecanismos oncogénicos alternativos y mutuamente excluyentes (67).

Las mutaciones pueden ser somáticas, como en los GISTs esporádicos, o aparecer en la línea germinal, como ocurre en los GISTs familiares.

Los mecanismos por los cuales las mutaciones de *c-KIT* conducen a la activación constitutiva del receptor no están claros todavía, aunque en algunos casos las proteínas *c-kit* mutadas presentan cambios estructurales que favorecen la oligomerización del receptor y la fosforilación cruzada, en ausencia de ligando.

Parece ser que los diferentes tipos de mutaciones confieren distintos grados de activación, que podrían traducirse en diferencias en cuanto a la agresividad del tumor.

### **Mutaciones en el exón 11 (dominio yuxtamembrana):**

El exón 11 codifica para el dominio yuxtamembrana de c-kit (dominio con actividad reguladora), que se encarga de inhibir la dimerización del receptor en ausencia de ligando (SCF). Las mutaciones en este exón originan una activación constitutiva del receptor y se consideran las más frecuentes.

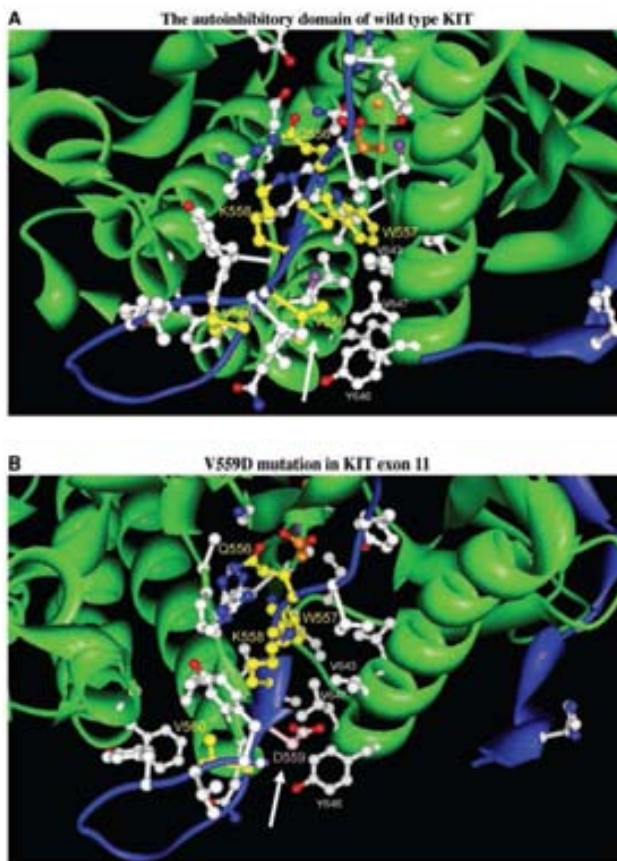
La frecuencia publicada de mutaciones en el exón 11 de *c-KIT* (codones 550-582) en GIST varía entre 20 y 92%, en estudios realizados a partir de DNA obtenido de tejido criopreservado. En estudios sobre material fijado en formol e incluido en parafina, la frecuencia ha sido menor (20-57%). Aunque la discrepancia de frecuencias puede reflejar diferencias en cuanto a las poblaciones de estudio, parece que los aspectos técnicos pueden ser los responsables. Sería recomendable llegar a un consenso, de la misma manera que con la IHQ, entre los procedimientos más convenientes para el análisis mutacional de *c-KIT*.

En el exón 11 de *c-KIT* podemos encontrar tres tipos de alteraciones:

- Deleciones/deleciones-inserciones (indel): ocasionan la pérdida de uno o varios aminoácidos, con ocasional inserción de uno o dos aminoácidos a nivel proteico. Suelen afectar la parte inicial del exón, región 5' (entre los codones 550-560), principalmente los codones 557-559 (región "hot spot"). A veces se extiende distalmente, afectando una gran parte del exón 11 y ocasionando la pérdida de dos tercios del dominio yuxtamembrana. p.W557\_K558del es la deleción simple más frecuente (68-69).
- Puntos de cambio de sentido ("missense points")/mutaciones puntuales (substituciones): es el segundo tipo de mutación más frecuente, y afecta a los codones 557, 559, 560 y 576 (68-69). Las mutaciones más frecuentes de este tipo se producen en el extremo 5' y son p.V559D, p.V560D y p.W557R, seguidas de p.V559A, p.V559G y p.L576P (extremo 3') (6).
- Duplicaciones (duplicaciones internas en tándem): representan el tercer tipo de mutaciones más frecuentes y afectan el extremo 3'. Su tamaño varía desde 1 a 18 codones.

- Inserciones e inversiones: son muy raras.

Los residuos aminoácidos 556-560 estabilizan la cadena  $\beta_6$  del lóbulo C-terminal, actuando como prevención para la formación de plegamiento  $\beta_6\beta_9$ , crucial en la activación de c-kit (Fig.8). Así pues, deleciones o mutaciones puntuales en esta región pueden afectar a la capacidad de la región yuxtamembrana para estabilizar la estructura quinasa inactiva (70).



**Fig.8** Análisis estructural y modelo proteico de mutaciones de c-KIT. (A) modelo de C-KIT wild-type KIT basado en estructura cristalina, donde puede verse como los aminoácidos 556-560 (amarillo) son parte del dominio autoinhibitorio. Señalado con flecha el residuo V559. (B) modelo de mutaciones en el exón 11, en V559D. Señalado con flecha el residuo mutado D559. El cambio conformacional se debe sólo a la mutación de este aminoácido. *Stromal Tumors: Therapeutic Implications through Protein Modeling Clin Cancer Res* 2005;11(10)May 15.

El *codón 558* se afecta por deleciones, inserciones y mutaciones complejas deleciones/inserciones (indel). Tumores con mutaciones que afectan el *codón 558* se asocian con más frecuencia a mujeres, localización intestinal y morfología fusocelular (71).

La mayoría de duplicaciones se encuentran en GIST gástricos (6, 72).

Las mutaciones puntuales o inserciones se han asociado a buen pronóstico (72), mientras que las deleciones afectando *codones Trp557 o Lys558* se han asociado a mal pronóstico (73). La presencia de deleciones/inserciones en GIST gástricos se ha asociado a mal pronóstico (42). Según el tipo morfológico,



las deleciones se observan en casos con fenotipo fusocelular, las substituciones a fenotipo mixto y las inserciones que afectan los *codones 557-558* a fenotipo epitelioide (74). En general, las mutaciones en el exón 11 se han asociado a GISTs fusocelulares (75).

Las mutaciones en el exón 11 son más frecuentes en GISTs malignos (62%) pero también se pueden ver en algunos tumores benignos (16%) (76).

La presencia de mutaciones en el exón 11 se ha asociado con criterios de malignidad como: edad avanzada, gran tamaño tumoral, elevado índice mitótico, presencia de necrosis tumoral y hemorragia intratumoral, y supervivencias reducidas a los 5 años (76-77).

La mayoría de mutaciones de *c-KIT* son heterocigotas. Sin embargo, en algunos casos, sólo se identifica el alelo mutante por secuenciación directa de los productos de amplificación de PCR. Hay varias posibles explicaciones para estos hallazgos:

- mutación homocigota verdadera: presencia de la misma mutación en ambos alelos
- alelo WT (mutación hemicigota): presencia de *c-KIT*-mutante (MT) y ausencia de *c-KIT*-(wild-type)
- amplificación selectiva del locus *c-KIT* mutante o polisomía del cromosoma con el alelo mutante (78).

En diversos estudios se ha descrito que el riesgo de progresión es mayor en GISTs gástricos y de intestino delgado con mutaciones homocigotas en el exón 11 de *c-KIT* (deleciones/deleciones-inserciones) que en tumores con mutaciones heterocigotas del mismo gen. Por tanto, la detección de mutaciones homocigotas en el exón 11 de *c-KIT*, tendría que considerarse como marcador de mal pronóstico en GISTs.

#### **Mutaciones en el exón 9 (dominio extracelular):**

También se describen mutaciones en el exón 9 con una frecuencia de 9-20%, dependiendo de los estudios. Se encuentra un tipo de mutación mayoritaria correspondiente a la inserción de 6 nucleótidos que tiene como resultado la

duplicación de los aminoácidos Ala501 y Tyr502, y que se encuentra en pacientes que carecen de mutaciones en el exón 11 de *c-KIT*.

Este tipo de mutaciones, según la literatura, se encuentran en GISTs de localización intestinal, de mayor potencial maligno, y se asocian a morfología fusocelular (65, 68).

### **Mutaciones en el exón 13 (dominio quinasa) y exón 17 (lazo de activación)**

Las mutaciones en el dominio tirosinquinasa (TK) se han identificado en el exón 13, que codifica parte del primer dominio tirosinquinasa (TK1), dominio de unión a adenosintrifosfato (ATP); y en el exón 17 que codifica parte del segundo dominio tirosinquinasa (TK2), bucle enzimático. Estas regiones de *c-KIT* se afectan principalmente de forma secundaria durante el tratamiento con mesilato de imatinib, siendo responsables de la aparición de resistencia al fármaco (67, 79).

La frecuencia de mutaciones en el exón 13 es baja, entre 0,8-4,1%. Sólo se han encontrado mutaciones puntuales, la más frecuente es la sustitución p.K642E (63).

Las mutaciones en el exón 17 son excepcionales (<1%). Entre ellas mutaciones puntuales que corresponden a las sustituciones p.N822K y p.N822H (63). Las mutaciones del exón 17 son frecuentes en los casos de resistencia adquirida al tratamiento con mesilato de imatinib.

### **11. MUTACIONES EN EL GEN *PDGFRA*:**

Aproximadamente el 5% de los GIST tiene mutaciones en *PDGFRA* (66, 80). *PDGFRA* es miembro de la misma familia de receptores tirosinquinasa que *c-KIT*, y presenta una estructura homóloga. Heinrich y cols. demostraron por primera vez que la expresión de *PDGFRA* está restringida a casos de GISTs con *c-Kit* normal, en los que la expresión de *c-kit* era débil o indetectable; por el contrario, el 70% de los casos en los que la expresión de *PDGFRA* era débil o indetectable presentaban mutación en *c-KIT*. Estos mismos autores evaluaron las mutaciones genómicas de *PDGFRA* en los exones 10, 12, 14 y 18, y

encontraron mutaciones de *PDGFRA* en los exones 12 y 18 en el 35% de los GIST c-kit negativos, y ninguna en los GIST con *c-KIT* mutado.

Estos resultados indican que las mutaciones activadoras de *c-KIT* o de *PDGFRA* son mutuamente excluyentes, pero con consecuencias biológicas similares en la patogénesis de los GISTs. Las mutaciones afectan a los exones 12, 14 y 18. Las mutaciones de *PDGFRA* también tienen como resultado la activación quinasa ligando-independiente, similar a c-kit que activa la señal de transducción en los GISTs.

En una reciente publicación Corless y cols. analizan más de 1000 casos de GISTs, y estiman que la frecuencia de mutaciones de *PDGFRA* es del 7,2%.

El exón 18 es el que se encuentra mutado con más frecuencia (6%). La mutación principal es la sustitución p.D842V, que es insensible a mesilato de imatinib. Mutaciones en el exón 18 se asocian a localización gástrica y morfología epitelioides.

También se han encontrado mutaciones en el exón 12 (1%), que se han asociado en algunos casos con respuesta clínica a mesilato de imatinib, y con menor frecuencia en el exón 14 (0,2%).

Mutaciones en el exón 18 y 14 representan mutaciones en el dominio regulador, mientras que mutaciones en el exón 12 corresponden a mutaciones del dominio enzimático.

Las mutaciones en *PDGFRA* ocurren principalmente en GISTs de origen gástrico o de omento, y se han asociado a morfología epitelioides o mixta, y bajo riesgo de malignidad (74, 81).

### **Relación de las mutaciones de c-KIT y PDGFRA con el comportamiento biológico de los GISTs:**

Las mutaciones activadoras en *c-KIT* y *PDGFRA* se han convertido en predictores de respuesta clínica al tratamiento con mesilato de imatinib. Sin embargo, el valor de las mutaciones para predecir la recurrencia después de la cirugía está todavía por determinar.

Parece que las mutaciones de *c-KIT* son más frecuentes en GISTs malignos y en GISTs de morfología fusocelular.

Singer y cols evalúan la relevancia pronóstica de las mutaciones de *c-KIT* y observan que pacientes con mutaciones puntuales en el exón 11 presentan un porcentaje libre de recurrencia a los 5 años superior a otros tipos de mutaciones. Además, la presencia de deleciones o inserciones intersticiales en el exón 11 podría constituir un factor indicador de recurrencia independiente. La deleción de los *codones Trp 557 y/o Lys 558* se ha encontrado con mayor frecuencia en GISTs metastásicos. El GEIS demostró que las deleciones que afectan a los *codones W557 y K558* de *c-KIT* constituyen un marcador predictivo independiente de la recurrencia en GIST, y debería ser un marcador molecular a tener en cuenta en el tratamiento adyuvante de pacientes con GISTs localizado.

## **12. GISTs wild-type:**

Aproximadamente en el 10% de los GIST no se detectan mutaciones en *c-KIT* o *PDGFRA*, y se denominan “wild-type” (WT). En estos casos sorprende que a pesar de no detectar mutaciones en *c-KIT*, la actividad tirosinquinasa está activada, pero se desconoce el mecanismo de activación (82). Los GIST-WT se localizan con más frecuencia en estómago y omento (83). En la práctica se denominan así aquellos GISTs que no muestran mutaciones, después de secuenciar de forma completa y realizar un análisis cuidadoso, en los cuatro exones de *c-KIT* ni en los tres de *PDGFRA*. Es importante tener identificados estos casos porque tienen una menor respuesta al tratamiento con mesilato de imatinib, y pueden ser tratados con fármacos de primera línea alternativos en el futuro.

Los GIST-WT representan un grupo heterogéneo en el que se han descrito varias mutaciones oncogénicas como *BRAF* y defectos en el complejo succinato deshidrogenasa (SDH) (84-86).

### **Mutaciones en BRAF (V600E):**

*BRAF* codifica una proteinquinasa-serina/treonina, que participa en la vía de señalización RAS-RAF-MEK-ERK y tiene un papel importante en la regulación del ciclo celular y modulación oncogénica de respuestas celulares a señales de crecimiento por la vía MAPK. Mutaciones en *BRAF* se detectan en diversas neoplasias, tanto benignas como malignas (nevus melanocítico, melanoma, carcinoma papilar de tiroides, adenoma/carcinoma colorectal entre otros). La región “hot-spot” se encuentra en el nucleótido 1799, en el exón 15 donde se produce la substitución de Valina por Glutámico en el codón 600 (p. V600E). Se ha detectado la presencia de mutaciones en *BRAF* en GIST wild-type en el 4% de los casos (102). Se asocia a GIST de inferiores a 5mm, con muy baja actividad mitótica y morfología fusocelular. La mutación de *BRAF* podría representar una alteración precoz alternativa en casos de GIST wild-type, aunque se necesitan series más largas para su validación (103).

### **13. FORMAS ESPECIALES DE GIST:**

#### **GIST familiar/asociado a síndromes:**

Aunque son muy poco frecuentes, existen varias circunstancias en las que los GISTs se asocian a síndromes familiares y/o presentan predisposición hereditaria. Se han descrito algunas familias con mutaciones germinales en *c-KIT* o *PDGFRA* (87). Hay una predisposición aumentada a presentar GIST en varios síndromes clínicos, como neurofibromatosis tipo 1 (NF-1) y síndrome de Carney. En general, los GISTs asociados a estos síndromes muestran genotipo WT y poca respuesta a tratamiento con mesilato de imatinib.

La NF-1 es un síndrome autosómico dominante, que tiene un riesgo estimado de presentar GISTs asociados 200 veces superior a la población general. Los GISTs que aparecen en este contexto tienen la particularidad de aparecer en grupos de edad más joven que los GISTs esporádicos, con tendencia a localizarse en intestino delgado, presentar múltiples tumores e hiperplasia de CIC asociada (88). En general su curso clínico es indolente.

El llamado síndrome de Carney (tríada) incluye, junto con GIST, generalmente de pequeño tamaño, paragangliomas y condromas pulmonares múltiples, con posibilidad de recidivas locales hasta en un 40% (89-90). En este contexto los GISTs tienen tendencia a presentarse a nivel gástrico, ser múltiples, de morfología epitelioide o mixta. Tienen tendencia a presentar metástasis, generalmente ganglionares, aunque estos pacientes a menudo presentan un curso indolente (91). Otra situación se produce en el síndrome de Carney-Stratakis (díada), autosómico dominante, que combina paraganglioma y GIST, asociado a la pérdida de la subunidad B de la proteína mitocondrial succinato deshidrogenasa.

También se han registrado familias portadoras de GISTs múltiples en forma de síndrome familiar hereditario, autosómico dominante con alta penetrancia, no relacionado con el síndrome de Carney o la NF-1, que mostraban hiperpigmentación de la piel y tumores de células cebadas (mastocitosis). El hallazgo interesante en todos ellos es la presencia de hiperplasia de CIC a lo largo del TGI, a partir de la que se desarrollan los GISTs múltiples, sobretudo en la segunda década de la vida.

Se han encontrado las siguientes mutaciones en GISTs familiares: delección de uno de los dos residuos de Valina consecutivos 559 ó 560 del exón 11, p.V559A (exón 11), p.W557R (exón 11), p.K642E (exón 13) y p.D820Y (exón 17).

### **GIST pediátrico:**

Los GISTs pediátricos son extremadamente raros, representan sólo el 1-2% de todos los GISTs. En general, se han observado con más frecuencia asociados a sexo femenino, localización gástrica y morfología epitelioide o mixta. Cuando se diagnostican presentan estadio avanzado y pueden presentar metástasis a distancia, frecuentemente ganglionares, aunque estos pacientes a menudo presentan una supervivencia prolongada (92). En general, muestran genotipo WT y poca respuesta a tratamiento con mesilato de imatinib.

### **GIST asociados a otras neoplasias:**

Se han descrito varias neoplasias asociadas a GISTs, que aparecen de manera sincrónica o metacrónica. Según la literatura la frecuencia de asociación a otras neoplasias malignas es del 13,4%, aunque varía según los diferentes estudios. La mitad de neoplasias malignas asociadas fueron diagnosticadas al mismo tiempo que los GISTs o durante el seguimiento de los GISTs, representando estos últimos casos el 31%.

Los GISTs gástricos coinciden con gran frecuencia con otras neoplasias gástricas malignas, y se descubren de forma intraoperatoria o incidentalmente durante el estudio histopatológico de la pieza de resección. Esta asociación predomina en casos de GISTs de muy bajo o bajo riesgo de malignidad, aunque algunos casos se dan en GISTs de grado intermedio o alto riesgo de malignidad (93).

### **14. ALTERACIONES CITOGENÉTICAS:**

Los GISTs presentan distintas alteraciones citogenéticas que aparecerían después de la mutación de *c-KIT*, que no afectan a todas las células, y podrían estar en relación con la progresión tumoral. El cromosoma 14 es el que se afecta con mayor frecuencia, y la alteración más frecuente es la monosomía 14 o pérdidas parciales de 14q. Es interesante señalar que estas anomalías en el cromosoma 14 se observan en GISTs con mutaciones tanto de *c-KIT* como de *PDGFRA* (66, 94). Basándose en estudios de pérdida de heterocigosidad y en estudios de hibridación genómica comparativa, hay dos regiones de este cromosoma, 14q11.1-q12 y 14q23-q24, que podrían contener genes de supresión tumoral con implicación en la patogénesis inicial de los GISTs (95-96). La pérdida del brazo largo del cromosoma 22 se observa en el 50% de los GISTs y se asocia con progresión de grado intermedio de malignidad a alto riesgo (66, 97). Son menos frecuentes deleciones en 1p, 9p, 11p (94, 98), que se relacionan con mayor malignidad y peor pronóstico, y ganancias en los cromosomas 8q y 17q, que se asocian con mayor riesgo de metástasis (97). De modo simplificado podríamos decir que los cambios genéticos que se observan en el desarrollo y progresión de los GISTs serían los siguientes:

mutaciones de *c-KIT* o *PDGFRA* → pérdida de 14q → pérdida de 22q → pérdida de 1p → ganancia de 8q → pérdida de 11p → pérdida de 9p → ganancia de 17q (94). Se trata de una generalización, no todos los GISTs adquieren deleciones sucesivas en este orden.

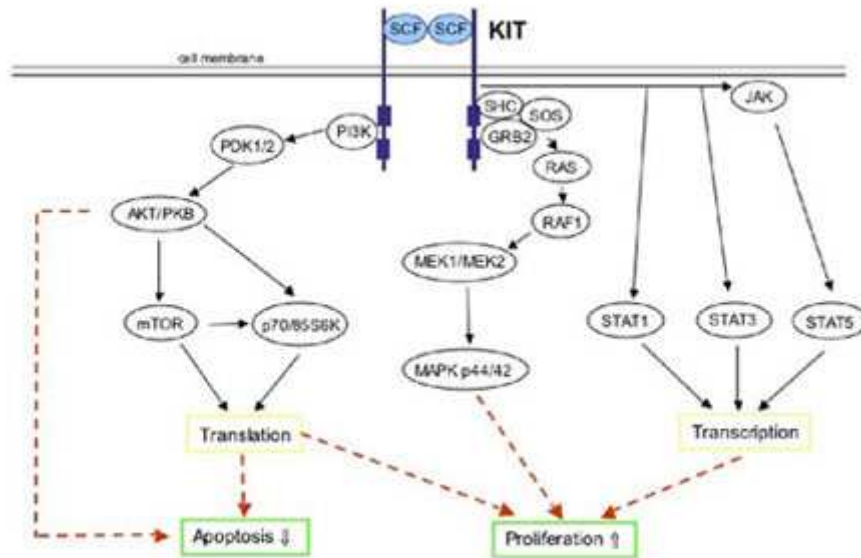
Las alteraciones oncogenéticas de los GISTs pueden llegar a ser complejas en algunos casos. A partir de estudios de hibridación genómica comparada (CGH) sobre 203 GISTs (99), se ha ideado un modelo oncogenético en árbol que identifica tres vías citogenéticas principales:

- pérdida 14q: se observa en GISTs gástricos, con cariotipos estables y evolución clínica favorable.
- pérdida 1p: se observa en GISTs intestinales, con complejidad citogenética y evolución clínica más agresiva.
- pérdida 22q: asociado con aumento de actividad mitótica y recurrencias (100)

## **15. EXPRESIÓN GENÉTICA Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN:**

La activación de *c-kit* y *PDGFRA* dependiente de ligando desencadena varias cascadas de señalización celular que regulan las funciones celulares cruciales en la tumorigénesis, como proliferación, adhesión, apoptosis y diferenciación. Entre las moléculas que intervienen en la vía de señalización destacan la proteína quinasa mitógeno-activada (MAPK), 3-quinasa fosfatidilinositol (PI3K), AKT, mTOR, p70/85S6K, STAT1 y STAT3 (63, 101). Ejemplos de efectores críticos de la cascada de señalización son AKT, MAPK (RAF, MEK, ERK), p42/p44, involucrada en la supervivencia celular (antiapoptótico), y señalización relacionada con la proliferación celular respectivamente (**Fig.9**). Miembros de la familia de señal de transducción y activadores de la transcripción (STAT) tienen un papel crítico en las vías de señalización. Los intermediarios de señalización pueden tener varios papeles biológicos, dependiendo de los mecanismos, sincronización y contexto celular de su activación. Por ejemplo, la activación de STAT1 tiene funciones oncogénicas en algunos cánceres mientras que en otros actúa como proapoptótico. El aumento de los conocimientos sobre las vías fundamentales de señalización celular activadas por *c-kit*, e implicadas en la patogenia de los GISTs, proporcionaría nuevas estrategias de tratamiento.





**Fig.9** Vías de señalización intracelular oncogénicas activadas por c-kit y PDGFRA: la cascada de señalización se origina a partir de la activación constitutiva de c-kit y PDGFRA mutados, que provocan la inhibición de la apoptosis y proliferación celular. PI3K y STAT3 son algunos de los mecanismos principales de la activación oncogénica.

## 16. MicroRNAs:

### Definición:

Los microRNA (miRNA) son pequeños RNA monocatenarios no codificantes (RNAs), de 19-22 nucleótidos, que tienen la capacidad de regular la expresión génica mediante inhibición translacional o por degradación de RNA mensajero (mRNA), dependiendo de la secuencia complementaria entre el miRNA y su gen diana específico. La expresión de miRNA se encuentra muy relacionada con el tipo de tejido y estado de desarrollo. Se han encontrado diferentes niveles de expresión de miRNA en diferentes tipos de cáncer, hecho que sugiere una posible función supresora tumoral u oncogénica. Aunque se han descrito 910 miRNA en humanos, sólo unos pocos han sido estudiados a nivel experimental (104).

Una gran proporción de genes codificadores de proteínas están regulados por miRNA. La desregulación de miRNA puede causar desequilibrios importantes en estas proteínas, y causar diversas enfermedades.

Los miRNA son moléculas de RNA transcritas a partir de genes de DNA, pero no son traducidos a proteínas. La secuencia de DNA de codificación es mucho más larga que el miRNA maduro. Los transcritos primarios (pri-miRNA) contienen una o más estructuras de tipo bucle de alrededor de 70 bases y están constituidos por una doble cadena de RNA, que consiste en una secuencia de nucleótidos que puede plegarse sobre sí misma para formar una doble hélice con una región de apareamiento de bases imperfecto, conformando un bucle abierto en un extremo. La enzima ribonucleasa Drosha, presente en el núcleo de la célula, corta la zona del bucle para formar el precursor miRNA (pre-miRNA). Este pre-miRNA es exportado desde el núcleo al citoplasma por la exportina 5. Una vez en el citoplasma se escinde por acción de la enzima ribonucleasa Dícer y genera un dúplex de RNA más corto. Este miRNA más corto con doble cadena, denominada miRNA:miRNA\* (cadena activa o madura: \*cadena inactiva o complementaria, respectivamente). La cadena madura se incorpora por complementariedad a su mRNA, mientras que la cadena inactiva complementaria es rápidamente degradada (**Fig.10**).

Los miRNA maduros son parcialmente complementarios de una parte de uno o más mRNA. En los animales los miRNA muestran una complementariedad imperfecta con la región 3' UTR ("untranslated region"). Para ser más efectivo el miRNA maduro forma un complejo denominado Complejo Silenciante Inducido por RNA (RISC). Este complejo RISC puede inhibir la traducción o directamente degradar el mRNA. El efecto de este proceso es la disminución del nivel de proteína de uno o diferentes genes.

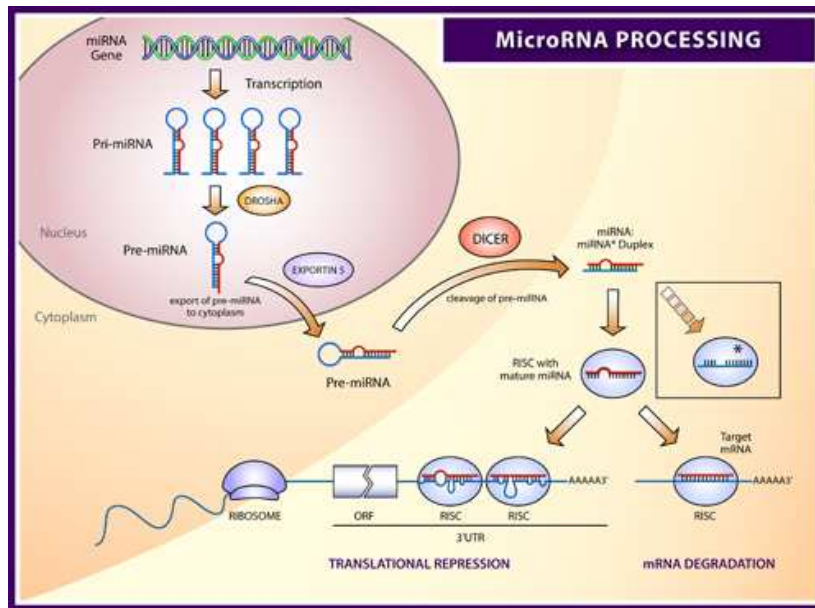


Fig.10 Mecanismo de formación y acción de los microRNA.

Los miRNA se perciben como un punto clave de control postranscripcional dentro de las redes de regulación genética. Se ha postulado que tienen un papel importante en diversos procesos celulares, como el desarrollo, diferenciación, proliferación y apoptosis. La desregulación de expresión de miRNA podría tener un papel importante en la carcinogénesis, aunque todavía se desconoce si la alteración en el perfil de expresión es la causa o la consecuencia de los procesos patológicos.

Debido al diferente perfil de expresión de los miRNAs según el tipo de tumor, se plantea su posible utilidad diagnóstica futura y su uso como diana terapéutica. Es importante tener en cuenta que su tamaño menor que el de mRNAs, le confieren mayor estabilidad y se plantean perspectivas futuras de estudio sobre material parafinado (105).

### **MicroRNA-221 y 222:**

En los GISTs, destaca la implicación de varios miRNA, detectados a partir de estudios previos mediante análisis de microarrays, en posibles mecanismos neoplásicos: miRNA-221 y miRNA-222 (104, 106-107), miRNA-494 (108) y

miRNA196a (109). Estos miRNA se unen al mRNA del gen *c-KIT* y su infraregulación implica un aumento de expresión proteica de c-kit.

Se ha encontrado mayor expresión de miRNA-221 y 222 en varias neoplasias como glioblastoma, carcinoma papilar de tiroides, hepatocarcinoma, adenocarcinoma de páncreas y de próstata. Sin embargo, en los GISTs se ha encontrado menor expresión de miRNA-221 y 222, comparado con el tejido no tumoral (110).

Koelz y colaboradores estudian miRNA-221 y miRNA-222 y observan los siguientes resultados (110):

- perfil de expresión disminuido de miRNA-221 y miRNA-222 en la mayoría de GIST, en comparación con otros tumores y tejido no tumoral.
- perfil de expresión marcadamente disminuido de miRNA-221 y miRNA-222 en GIST con marcada intensidad de tinción inmunohistoquímica para c-kit.
- perfil de expresión muy aumentado de miRNA-221 y miRNA-222 en GISTs con tinción inmunohistoquímica para c-kit focal o ausente.
- el perfil de expresión de miRNA-221 y miRNA-222 no se asocia con el riesgo tumoral, el estado mutacional o el índice de proliferación de los GISTs.

En su estudio Haller y colaboradores determinan la expresión de miRNA en GISTs, a partir análisis de microarrays, con respecto a su localización en el TGI y su estado mutacional (111). En este estudio observan:

- mayor expresión de miRNA-221 y miRNA-222 en GISTs intestinales que en gástricos.
- menor expresión de miRNA-221 y miRNA-222 en GISTs con mutaciones en *c-KIT* que en GIST-WT.
- mayor expresión de miRNA-221 y miRNA-222 en GISTs con elevado índice mitótico.

El grupo de Sahin y cols demuestran que existe más expresión de estos miRNAs en casos de GIST WT. Esto podría ser debido a que la activación del

proceso neoplásico puede depender de alguna otra molécula de las vías de señalización celular (por ej. BRAF).

Otros estudios recientes han demostrado diferencias significativas en la expresión de miRNAs en GISTs, en función de su localización (gástrica/intestinal), así como de sus mutaciones en *c-KIT* o *PDGFRA* (112).

### **MicroRNA-494:**

Como ya se ha comentado, las mutaciones en *c-KIT* y *PDGFRA* no pueden explicar por sí solas la diversidad biológica de los GISTs. Existen otras alteraciones genéticas adicionales que son importantes en la progresión de los GISTs, como deleciones cromosómicas en 14q, 22q y 1p. La pérdida del cromosoma 14q puede estar directamente relacionada con la progresión de GIST, pues en él se localizan múltiples miRNA, entre ellos miRNA-494.

Así pues, la alteración en la regulación de miRNA que se ha observado en GISTs, podría asociarse con la localización, estado mutacional, riesgo tumoral y alteraciones cromosómicas. Los perfiles de expresión de miRNA podrían ser un método complementario del diagnóstico convencional, o de confirmación en casos de duda diagnóstica (107). Dado que la activación proteica de *c-kit* y *PDGFRA* es el primer paso en la tumorigénesis de GIST, sería interesante conocer los efectos de la expresión de miRNAs sobre la regulación de *c-kit* o *PDGFRA* (108).

La sobreexpresión de *c-kit* es un hallazgo característico en los GIST, y la presencia de mutaciones en *c-KIT* provoca una intensa expresión de *c-kit* (113). Aunque las mutaciones de *c-KIT* están presentes en el 70% de GISTs, la sobreexpresión de *c-kit* está presente en el 90% de GISTs, hecho que sugiere la participación de otros mecanismos complementarios (29). La desregulación de miRNA podría ser un posible mecanismo. Kim y colaboradores realizan un estudio en el que comparan la expresión de *c-kit* y perfiles de expresión de miRNAs en GISTs. Identifican 5 posibles miRNA candidatos, en los que los perfiles de expresión son inversos a la expresión de *c-kit*. Proponen que miRNA-494 regula la expresión de *c-kit* en base a que:

- su expresión se correlaciona de forma inversa a la expresión de c-kit en tejido de GISTs.
- miRNA-494 exógeno induce la infraregulación de c-kit.
- la inhibición de miRNA-494 endógeno aumenta la expresión de c-kit (108).

Este estudio también demuestra como la infraregulación de *c-KIT* mutado inducido por miRNA-494 afecta la expresión de p-AKT y p-STAT3. Con estos hallazgos concluyen que miRNA-494 es un potente regulador de c-kit en los GISTs, y su utilización como terapia dirigida podría revertir la progresión tumoral.

### **Aplicación de miRNA en diagnóstico y tratamiento de GIST:**

Los miRNA son constantemente exportados de la célula y circulan por los fluidos corporales encapsulados en exosomas, que mejoran su estabilidad. Se han detectado en suero, plasma, saliva y orina, y este hallazgo plantea su utilidad como marcadores tumorales.

El uso terapéutico de miRNA como oncoproteínas diana está todavía sometida a estudio, pues la terapia basada en RNA muestra limitaciones. Los fármacos de RNA son inestables en sangre, pequeños RNAs tienen un gran tamaño molecular que dificulta la interacción con el tumor diana. Por otra parte, estos agentes terapéuticos pueden provocar respuestas inmunes inesperadas en sangre. Muchos de estos problemas podrían minimizarse con nuevos sistemas que permitan su interacción como modificaciones químicas/estructurales de RNA, aptámeros, nanopartículas y liposomas.

## **17. TRATAMIENTO:**

### **Aspectos generales. Mesilato de imatinib:**

Los GIST son tumores potencialmente agresivos que no responden a las terapias convencionales como radioterapia o quimioterapia, se necesita inmunoterapia basada en un anticuerpo específico capaz de neutralizar la

activación constitutiva de la mutación *c-KIT*, y una terapia genética para prevenir la transcripción del gen *c-KIT* de forma selectiva en las células tumorales (114).

Las mutaciones activadoras en el gen *c-KIT* son potencialmente dianas terapéuticas para los GIST. La posibilidad de un tratamiento diana específico basado en la patogénesis molecular de los GISTs es de gran importancia para diferenciarlos de otros tumores mesenquimales con vías moleculares diferentes y para poder evaluar la respuesta de estos tumores a las terapias convencionales.

En 1996, Druker describió la inhibición selectiva de la actividad tirosinquinasa ABL y su eficacia en pacientes con leucemia mieloide crónica por STI-571 (mesilato de imatinib, Glivec®, Gleevec®), un derivado de la 2-fenilpirimidina (Fig.11) (115-117). En 1998 se comprobó que los GISTs presentaban mutaciones en el protooncogén *c-KIT* de tipo activador, con ganancia de función de la actividad tirosinquinasa de c-kit, que sugería que esa activación desempeñaba un papel crítico en la patogénesis de GIST (5). Al observarse que el STI-571 inhibía también las tirosinquinasas c-kit y PDGFRA, se realizaron experimentos *in vitro* que demostraron la inhibición de c-kit, con interrupción del crecimiento y la entrada en apoptosis de células de los GIST con mutaciones en *c-KIT* (Fig.12). La aplicación clínica de este concepto de terapia dirigida contra una alteración genética concreta confirmó la validez del planteamiento y abrió nuevas perspectivas para los pacientes con GIST avanzado.

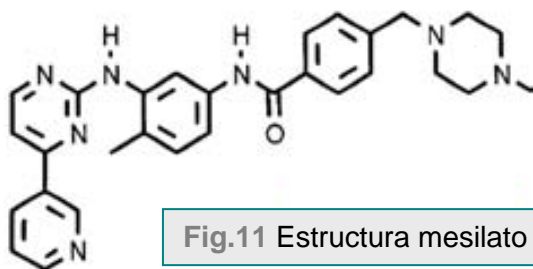
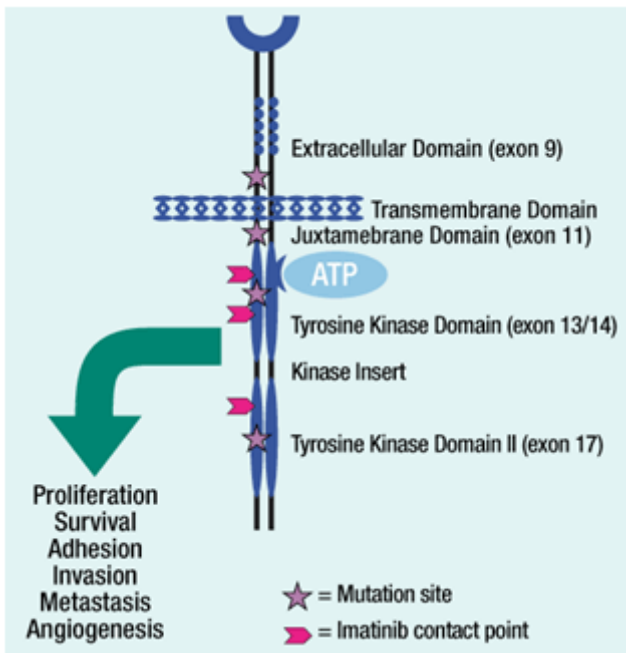


Fig.11 Estructura mesilato de imatinib (Glivec®)



**Fig.12** Mecanismo de acción de mesilato de imatinib: en condiciones normales la molécula de ATP se une a los sitios activos de c-kit o PDGFRA, donde cede un fosfato, y se produce la autoactivación, fosforilación de sustratos e inicio de la vía de señalización intracelular. Mesilato de imatinib (marcador en rojo) es un inhibidor competitivo, que se une a los mismos sitios que ATP, evitando la fosforilación y la activación de la vía de señalización celular, y por tanto inhibiendo la señalización de c-kit y PDGFRA.

Mesilato de imatinib ha mostrado ser un agente eficaz en el tratamiento de tumores irresecables o metastáticos (**Fig.12**), con un índice de respuesta sobre el 50% y de control de la enfermedad entre el 75-84%. Se asocia a supervivencia libre de progresión a los 2 años de entre el 44-52% y supervivencia global a los 2 años de entre 69-76%. Estos valores muestran un aumento claramente significativo de la supervivencia con respecto a los tratamientos previos con quimioterapia convencional.

En el año 2003 se observó que la respuesta al fármaco podía estar determinada por el tipo de mutación del tumor. Mutaciones en el exón 11 (yuxtamembrana) se asocian a un buen índice de respuesta a mesilato de imatinib, del 80%, con un aumento del tiempo libre de progresión y de la supervivencia global. Mutaciones en el exón 9 (extracelular) se asocian a un menor índice de respuesta a mesilato de imatinib, entorno al 40%.



La ausencia de mutación de *c-KIT*, casos wild-type, y la presencia de mutación p.D842V en el exón 18 de *PDGFR* se asocian a una peor evolución, con índice de respuesta a mesilato de imatinib inferior al 10%.

La duración media de respuesta a mesilato de imatinib es de 27 meses, con una supervivencia global de 58 meses.

En resumen, el 20% de los pacientes presentan resistencia primaria a mesilato de imatinib. La resistencia primaria es más común en GIST con mutación en exón 9 de *c-KIT*, exón 18 de *PDGFRA* o wild-type (**Tabla.8**).

En el resto de pacientes, pueden aparecer resistencias secundarias, especialmente a partir del segundo año. La resistencia secundaria se asocia con frecuencia al desarrollo de mutaciones adquiridas, que con frecuencia aparecen en GISTs con mutación pre-imatinib en el exón 11.

En general, surge una nueva mutación en *c-KIT* o *PDGFRA*, que se añade a la previa, y suele afectar el sitio de unión de adenosin trifosfato (ATP) o a otros puntos del dominio tirosinquinasa. En otras ocasiones hay amplificación genómica de *c-KIT* y una expresión aumentada de la proteína, sin que aparezcan nuevas mutaciones. Puede haber una modulación de la diana, con la activación de un receptor tirosinquinasa alternativo, que suele acompañarse de la pérdida de expresión de la oncoproteína c-kit. Finalmente, se ha descrito una resistencia funcional, con activación de c-kit o PDGFRA, en ausencia de nuevas mutaciones (118). Este es uno de los motivos que justifican la necesidad de incorporar otros fármacos alternativos para el tratamiento de los GISTs.

Sunitinib es un inhibidor multiselectivo de los receptores tirosinquinasa: c-kit, PDGFRA, VEGFR. En un ensayo fase III demostró un beneficio con respecto a placebo, en la supervivencia libre de progresión (6.3 meses vs. 1.5 meses). Lo más destacable es el beneficio en la supervivencia libre de progresión en los pacientes tratados con sunitinib que presentaban mutación en el exón 9 (19,4 meses) ó los pacientes wild type (20,9 meses), con respecto a los pacientes con mutación en el exón 11 (5.1 meses).

El estudio molecular nos ayudará a clasificar los GISTs según la mutación que presente en los diferentes exones conocidos. Esta clasificación nos tendría que ayudar a administrar el tratamiento correcto a los pacientes, dirigiendo la primera línea de tratamiento a aquel fármaco que tenga mayores garantías de

ser efectivo. Este punto aportará 2 beneficios importantes: 1.-no tener que esperar a la progresión de la enfermedad tras mesilato de imatinib en pacientes con mutaciones resistentes al fármaco; 2.-proporcionar un ahorro económico al reducir el gasto asistencial de una progresión precoz de la enfermedad.

**Tabla.8.** Clasificación molecular de GIST y respuesta a Imatinib

<b>Tipo de GIST</b>	<b>Comentarios</b>
GIST esporádicos	
Mutaciones en <i>c-KIT</i>	
Exón 11	Muy buena respuesta a Imatinib
Exón 9	Respuesta intermedia a Imatinib
Exón 13	Sensible a Imatinib in Vitro; ocasionales respuestas clínicas
Exón 17	Sensible a Imatinib in Vitro; ocasionales respuestas clínicas
Mutaciones en <i>PDGFRA</i>	
Exón12	Sensible a Imatinib in Vitro; ocasionales respuestas clínicas
Exón 18	D842V tiene muy poca respuesta a Imatinib; otras mutaciones son sensibles
Wild-type	Poca respuesta a Imatinib

### **Cirugía:**

El tratamiento de los GISTs primarios localizados es la cirugía, siempre que sea técnicamente posible, en casos sin evidencia de enfermedad metastásica y con una morbimortalidad aceptable. El resto de pacientes, especialmente aquellos que presenten GIST de gran tamaño en localizaciones específicas, como recto y esófago, donde una resección podría implicar una importante alteración funcional, deberían ser considerados como candidatos potenciales a tratamiento adyuvante.

Los GISTs que se pueden resecar deben tratarse con intención radical. Esta cirugía supone la exéresis tumoral completa (R0) tanto del tumor primario como de una recidiva, y se considera que el factor pronóstico más importante es el grado de radicalidad obtenido (119). Los pacientes expuestos a una cirugía de tipo R0 tienen una supervivencia global mayor a la de aquellos a quienes se practica una cirugía menos agresiva. La enucleación simple o resección endoscópica están contraindicadas, si bien hay algunas publicaciones que muestran supervivencias similares entre enucleación y resección amplia en

GIST de pequeño tamaño (<2 cm) y de bajo riesgo por ecoendoscopia. La rotura del tumor, espontánea o durante la cirugía, conlleva un mayor riesgo de implantes peritoneales, y empeoran la supervivencia. La contaminación del campo quirúrgico es un factor de riesgo de recaída peritoneal y de aparición de metástasis.

Las linfadenectomías regionales no han demostrado que mejore la supervivencia.

Los GISTs irreseccables y los que presentan enfermedad metastásica en el momento de su diagnóstico deben ser tratados con mesilato de imatinib.

Actualmente, no hay unas directrices establecidas sobre el estudio mutacional de rutina de *c-KIT* y *PDGFRA*. Independientemente de su estado mutacional, la mayoría de GISTs se tratan con mesilato de imatinib como primera línea de terapia, aunque esto puede cambiar en el futuro. La National Comprehensive Cancer Network (NCCN) y European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) sugieren realizar estudio mutacional en casos de GISTs irreseccables o metastásicos en el momento del diagnóstico, en pacientes jóvenes, morfología epitelioide y resistencia primaria a mesilato de imatinib (120). Datos recientes obtenidos de ensayos clínicos prospectivos muestran que pacientes con mutación en el exón 9 de *c-KIT* responden peor, a dosis de 400 mg/día de Imatinib, que los que tienen mutación en el exón 11. Esta diferencia de respuesta al tratamiento mejora cuando los pacientes con mutación en el exón 9 reciben dosis de 800 mg/día de mesilato de imatinib. Esta dosis mayor no mejora la respuesta estándar en casos sensibles a mesilato de imatinib con mutación en el exón 11 (121). Este tipo de resultados argumenta la importancia de realizar estudio mutacional de cara a una buena selección terapéutica.

### **Tratamiento adyuvante:**

Tanto las conclusiones del panel de expertos reunidos en Lugano (Suiza) en 2004 (122) como las guías elaboradas por la NCCN consideran que la administración de mesilato de imatinib con intención adyuvante de la cirugía no es un tratamiento con eficacia demostrada. El objetivo primario de estos estudios debe ser demostrar una mejora en la supervivencia global, no en la

supervivencia libre de progresión (SLP). Datos obtenidos a partir de diferentes ensayos clínicos establecen como consenso administrar mesilato de imatinib adyuvante durante 3 años a pacientes con GIST de alto riesgo. No se recomienda en pacientes con GIST de bajo riesgo. No hay datos suficientes que justifiquen el tratamiento adyuvante en pacientes con GIST de riesgo intermedio. Hay controversia en el caso de pacientes con GIST de localización no gástrica que presentan entre 5-10 mitosis. Se consideran situaciones especiales (**Tabla.9**):

- Rotura de la cápsula tumoral: estos pacientes se deben considerar igual que el grupo con enfermedad diseminada, pues en todas las series publicadas, prácticamente el 100% de los casos presentan progresión peritoneal. Se acepta administrar mesilato de imatinib durante más de 3 años, como en pacientes con enfermedad avanzada.
- Genotipos especiales: no se recomienda tratamiento adyuvante en pacientes con mutación p.D842V en el exón 18 del gen *PDGFRA*, por su resistencia demostrada. En portadores de mutación en el exón 9 del gen *c-KIT*, no hay acuerdo en la administración de dosis superiores a 400 mg/día. Pacientes con GIST wild-type deben ser tratados según criterios de riesgo.
- Pacientes con márgenes de resección afectos (R1): no se ha demostrado que pacientes con GIST de bajo riesgo con afectación microscópica de los márgenes se beneficien del tratamiento adyuvante. En estos casos se debe considerar la posibilidad de reintervención, si la morbilidad lo permite (119).

**Tabla. 9** . Recomendaciones de tratamiento adyuvante según criterios de riesgo

<b>Grupo de riesgo</b>	<b>Recomendación</b>
Alto riesgo	Tratamiento adyuvante con mesilato de imatinib 400 mg/d x 3 años
Riesgo intermedio	Sin evidencias suficientes. Considerar en GIST no gástricos, de cualquier tamaño, con mitosis entre 6-10
Bajo riesgo	No tratamiento adyuvante
Rotura cápsula quirúrgica	Tratamiento como en casos de enfermedad avanzada

### **Tratamiento neoadyuvante:**

Un tratamiento administrado antes de la resección del tumor primario pretende proporcionar un beneficio a los pacientes con un tumor no extirpable inicialmente, debido a su gran tamaño, localización específica que ocasione importante pérdida funcional o un alto riesgo de recidiva.

La dosis convencional de 400 mg/día se estableció en base a dos ensayos clínicos randomizados Fase III en pacientes con GIST metastáticos c-Kit positivos (EORTC-ISG-AGITG y NASG-S0033), que comparaba 400 vs. 800 mg/día, sin encontrar diferencias en la supervivencia global (SG), y con perfiles de toxicidad aceptables para dosis de 400 mg/día.

En meta-análisis que incluyen datos de ambos estudios de Fase III muestran que los genotipos en GIST representan un factor pronóstico independiente del SLR y SG. De hecho, pacientes con mutación en el exón 11 de *c-KIT* tienen mejor SLR y SG que los GIST con mutación en el exón 9 o wild-type. Este meta-análisis también confirmó que GIST con mutación en el exón 9 era un factor predictivo dosis-dependiente, que consigue mayor SLR si se trata con dosis de Imatinib de 400 mg/ 2 veces día.

Teniendo todo esto en cuenta se establecieron las siguientes recomendaciones:

- Iniciar el tratamiento con 400 mg/día
- En pacientes con mutación del exón 9 se recomienda empezar a dosis de 800 mg/día
- La duración del tratamiento debe ser indefinida según demuestran estudios de Frech Sarcoma Group. En pacientes con enfermedad avanzada con cirugía de las lesiones metastásicas, debería mantenerse el tratamiento para evitar la rápida progresión.
- Monitorización de la respuesta al tratamiento para evitar el riesgo de resistencia secundaria
- Como tratamiento de primera línea en casos de progresión 400 mg/día, con posibilidad de aumentar la dosis a 800 mg/día, monitorizando los posibles efectos adversos.

La toxicidad de Imatinib a dosis de 400 mg/día es baja o moderada. Los efectos adversos más frecuentes son edema (70%), especialmente periorbitario,

náuseas (50%), diarrea (45%), mialgia (40%), fatiga (35%), dermatitis o eritema (30%), dolor de cabeza (25%) y dolor abdominal (25%). Sólo el 20% presenta efectos adversos graves.

Pacientes con GIST avanzado que progresan a pesar del tratamiento con Imatinib a 800 mg/día, pueden tratarse con Sunitinib 50 mg/día durante 4 semanas, cada 6 semanas o 37,5 mg/día sin interrupción. Pacientes con mutación del exón 9 y wild-type también podrían beneficiarse del tratamiento con Sunitinib (119).

En estos casos se requiere una biopsia tru-cut con intención de confirmar el diagnóstico y estudio mutacional previo al tratamiento. Es de utilidad realizar estudio con tomografía por emisión de positrones (PET) después de un mes de haber iniciado el tratamiento para valorar la respuesta inicial. Se recomienda mantener el tratamiento hasta conseguir la máxima respuesta, entre 6-12 meses, antes de realizar la cirugía radical, para evitar el riesgo de progresión debido al desarrollo de mutaciones secundarias.

### **Monitorización:**

Se recomienda realizar estudios clínicos y analíticas de seguimiento cada 1-3 meses durante el período de terapia adyuvante. Se recomienda seguimiento radiológico con TC o RM cada 3-6 meses durante la fase de tratamiento. Una vez finalizado, seguimiento cada 3 meses durante los 2 primeros años (cuando el riesgo de recaída se considera mayor) y posteriormente cada 6 meses hasta el 5º año, a partir del cual puede ser anual.

### **Otras terapias inhibidoras tirosinquinasa:**

Como alternativa a respuestas limitadas o resistencias secundarias a Imatinib existen otras alternativas de tratamiento: Sunitinib (agente antiangiogénico que actúa sobre múltiples tirosinquinasas, incluyendo receptor del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR) y PDGFRA), Sorafenib, Nilotinib y Dasatinib.

**Nuevas moléculas en investigación:**

Los GIST se han convertido en el perfecto paradigma molecular y son un modelo para las terapias dirigidas contra quinasas en oncología médica. Durante los últimos años se han identificado otras moléculas, a parte de c-kit y PDGFRA, sobre las que puedan actuar potenciales nuevos fármacos diana. Para obviar los mecanismos de resistencia se están investigando fármacos que actúen sobre las vías de transducción de señales dependientes de la activación de c-kit, como las quinasas Src (inhibidor SU6656), la familia de las quinasas lipídicas PI3K, las quinasas Janus (JAK), las proteínas STAT, la vía Ras/MAPK o la proteincinasa C (123). También se están estudiando combinaciones de mesilato de imatinib con inhibidores de la quinasa mTOR (everolimus) (124).





## **HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS**



## **HIPÓTESIS DE TRABAJO:**

A partir de los datos expuestos en la introducción se plantean las siguientes hipótesis de trabajo:

- Existe relación entre un cierto número de parámetros clínico-patológicos clásicos e inmunohistoquímicos y el comportamiento biológico de los GISTs.
- En los GISTs, el estado mutacional de c-KIT o PDGFRA se relaciona con parámetros clínico-patológicos y tiene influencia en el pronóstico y en la respuesta al tratamiento adyuvante con Imatinib.
- En los GISTs, la expresión de determinados miRNAs se relacionan con parámetros morfológicos y el estatus mutacional de c-KIT o PDGFRA. La determinación de los niveles de expresión de estos miRNAs puede ser útil como parámetro predictivo.
- El nomograma propuesto recientemente por el Sloan-Kettering Cancer Center es reproducible al aplicarlo en la serie de GISTs recogidos en la Corporació Parc Taulí.



## **OBJETIVOS:**

Los objetivos planteados en este estudio son los siguientes:

- 1- Determinar la asociación entre los parámetros clínico-patológicos recogidos, estudio inmunohistoquímico e índice de proliferación celular en función de la expresión de Ki-67.
- 2- Determinar las diferentes mutaciones de los genes *c-KIT* y *PDGFRA* en la serie de GISTs y correlacionar con los grupos de riesgo pronóstico definidos (criterios consenso AFIP-Miettinen 2006), parámetros clínico-patológicos e inmunohistoquímicos.
- 3- Determinar los niveles de expresión de miRNA-221, miRNA-222 y miRNA-494 y correlacionar con los grupos de riesgo definidos, parámetros clínico-patológicos e inmunohistoquímicos.
- 4- Correlacionar las diferentes mutaciones de los genes *c-KIT* y *PDGFRA* y los niveles de expresión de miRNA-221, miRNA-222 y miRNA-494 con el grupo de GISTs metastásico y no metastásico.
- 5- Correlacionar las diferentes mutaciones de los genes *c-KIT* y *PDGFR-A* y los niveles de expresión de miRNA-221, miRNA-222 y miRNA-494 con la progresión tumoral en el grupo de GISTs con tratamiento adyuvante.
- 6- Correlacionar las diferentes mutaciones de los genes *c-KIT* y *PDGFRA* y los niveles de expresión de miRNA-221, miRNA-222 y miRNA-494 en los grupos de riesgo pronóstico definidos con la supervivencia global y supervivencia libre de recurrencia.
- 7- Establecer un patrón molecular diferencial entre los GISTs de muy bajo riesgo, bajo riesgo, riesgo intermedio y alto riesgo.

- 8- Aplicar y determinar el “nomograma” del SKCC en la serie de GISTs para predecir la probabilidad de supervivencia libre de recurrencia a los 2 años (SLR2) y a los 5 años (SLR5), y comparar las probabilidades esperadas con las observadas.

## **MATERIAL Y MÉTODO**





## **1. MATERIAL DE ESTUDIO:**

Estudio descriptivo con datos retrospectivos, de ámbito hospitalario, de una serie de 100 casos consecutivos diagnosticados de GIST, procedentes de pacientes intervenidos en la Corporació Sanitària Parc Taulí de Sabadell, entre los años 1989 y 2011.

Casos esporádicos de tumores no-GIST (2) definidos según criterios histopatológicos estándar, procedentes de pacientes intervenidos en la misma institución, como cohorte de análisis de expresión de miRNA.

### Criterios de inclusión:

Selección de pacientes con diagnóstico de GIST, según criterios clínicos, histopatológicos e inmunohistoquímicos establecidos, sin tratamiento previo a la cirugía, con muestras almacenadas en bloques de parafina en el archivo del Servicio de Patología de UDIAT-Corporació Sanitària Parc Taulí.

### Criterios de exclusión:

Ausencia de material adecuado para realizar el estudio mutacional.

Ausencia de tejido no tumoral para realizar el estudio de expresión de miRNA.

Casos que sean recidivas de GIST previamente diagnosticados.

Aplicados los criterios de exclusión el estudio se centra sobre 87 casos.

## **2. RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS Y PARÁMETROS HISTOLÓGICOS:**

### **Revisión de informes de patología y de los datos histológicos:**

A partir del archivo documental del Servicio de Patología de UDIAT-Corporació Sanitària Parc Taulí, y la historia clínica (documentos clásicos en papel e historia informatizada).

Se revisan las secciones histológicas de hematoxilina-eosina de cada caso (una media de 4 laminillas por caso), para homogenizar los parámetros histológicos que se valoran. En todos los casos se comprueba el diagnóstico histológico y se realizan tinciones inmunohistoquímicas para CD34 y c-kit, en aquellos casos con diagnóstico previo a la aplicación de estos anticuerpos para el diagnóstico. Se cuenta la presencia de mitosis en 50 campos microscópicos de gran aumento en las áreas en las que se identifica mayor actividad mitótica.

Se clasificaron los tumores según el tipo de celularidad predominante, tras ser estudiados con el microscopio óptico, según los siguientes subtipos morfológicos: fusocelulares, epitelioides y mixtos.

Se recogen otros datos adicionales reflejados en la **Tabla.10**

**Creación de base de datos:**

Identificación numérica y anónima de los casos seleccionados, incluyendo las variables de estudio y de resultado.

Se obtuvieron distintas variables clínico-patológicas que se resumen en la siguiente tabla:

**Tabla.10:** Características de las variables recogidas.

<b>VARIABLES DE ESTUDIO</b>	
<b>CLÍNICO-PATOLÓGICAS</b>	
<i>Edad</i>	- Variable cuantitativa continua (referida al momento del diagnóstico).
<i>Sexo</i>	- Variable cualitativa nominal.
<i>Síntoma</i>	- Variable cualitativa nominal.
<i>Fecha de diagnóstico</i>	- Variable cuantitativa discreta
<i>Localización</i>	- Variable cualitativa nominal. - Las localizaciones se han simplificado a: esófago, estómago, intestino delgado, Intestino grueso (incluyendo a colon y recto) y extragastrointestinales (epiplón, retroperitoneo,...).
<i>Tamaño</i>	- Variable cuantitativa continua.
<i>Nº mitosis</i>	- Variable cuantitativa discreta. - Se ha calculado contando el número de mitosis/50 CGA.
<i>Riesgo pronóstico</i>	- Variable cualitativa ordinal. - Todos los tumores se ha clasificado según los criterios de riesgo pronóstico de Fletcher (2001), Miettinen (2006) en riesgo muy bajo/bajo, intermedio y alto.
<i>Nomograma</i>	- Variable cuantitativa - Recoge un valor numérico resultante de la suma del "score" atribuido al tamaño tumoral, nº mitosis/50CGA y la localización
<i>SLR2</i>	- Variable cuantitativa discreta - Porcentaje de probabilidad de supervivencia libre de enfermedad a

	los 2 años del diagnóstico, calculado en base al valor final del nomograma del MSKCC
<i>SLR5</i>	- Variable cuantitativa discreta - Porcentaje de probabilidad de supervivencia libre de enfermedad a los 5 años del diagnóstico, calculado en base al valor final del nomograma del MSKCC
<i>Ulceración mucosa</i>	- Variable cualitativa dicotómica
<i>Necrosis</i>	- Variable cualitativa dicotómica
<i>Quistificación</i>	- Variable cualitativa dicotómica
<i>Matriz mixoide</i>	- Variable cualitativa dicotómica
<i>Vacuolización citoplasmática</i>	- Variable cualitativa dicotómica
<i>Fibras esquenoides</i>	- Variable cualitativa dicotómica
<i>Empalizadas</i>	- Variable cualitativa dicotómica
<i>Vascularización</i>	- Variable cualitativa dicotómica
<i>Atipia</i>	- Variable cualitativa dicotómica
<i>Tipo histológico</i>	- Variable cualitativa nominal. - Se recoge como: fusocelular, epitelioides y mixto
<i>Positividad para c-kit</i>	- Variable cualitativa dicotómica
<i>Intensidad c-kit</i>	- Variable semicuantitativa - Se recoge como: débil, moderada, intensa
<i>Patrón c-kit Golgi</i>	- Variable cualitativa dicotómica
<i>Intensidad c-kit Golgi</i>	- Variable cualitativa ordinal (semicuantitativa) - Se recoge como: focal débil, focal intenso, difuso débil, difuso intenso
<i>Positividad para CD34</i>	- Variable cualitativa dicotómica
<i>Índice Ki-67</i>	- Variable cuantitativa discreta - Se recoge en forma de porcentaje (%)
<b>ESTUDIO MUTACIONAL</b>	
<i>Mutación exón 11 de c-KIT</i>	- Variable cualitativa nominal - Se recoge como: expresión según la nomenclatura proteica
<i>Tipo mutación del exón 11</i>	- Variable cualitativa nominal. - Se recoge como: delección/indel, mutación puntual, duplicación, inserción/inversión
<i>Mutación exón 9 de c-KIT</i>	- Variable cualitativa nominal. - Se recoge como: expresión según la nomenclatura proteica

<i>Mutación exón 12 de PDGFRA</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Variable cualitativa nominal.</li> <li>- Se recoge como: expresión según la nomenclatura proteica</li> </ul>
<i>Mutación exón 18 de PDGFRA</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Variable cualitativa nominal.</li> <li>- Se recoge como: expresión según la nomenclatura proteica</li> </ul>
<i>Mutación BRAF</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Variable cualitativa nominal.</li> <li>- Se recoge como: expresión según la nomenclatura proteica</li> </ul>
<i>Wild-type</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Variable cualitativa nominal.</li> <li>- Casos con ausencia de mutaciones en los exones 11 y 9 de <i>c-KIT</i>, 12 y 18 de <i>PDGFRA</i> y <i>BRAF</i></li> </ul>
<b>ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE miRNAs</b>	
<i>miRNA221</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Variable cuantitativa continua</li> <li>- Identificación del nivel de expresión en el tejido tumoral respecto al tejido normal</li> </ul>
<i>miRNA222</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Variable cuantitativa continua</li> <li>- Identificación del nivel de expresión en el tejido tumoral respecto al tejido normal</li> </ul>
<i>miRNA494</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Variable cuantitativa continua</li> <li>- Identificación del nivel de expresión en el tejido tumoral respecto al tejido normal</li> </ul>
<b>SEGUIMIENTO CLÍNICO</b>	
<i>Tratamiento con Gleevec</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Variable cualitativa dicotómica</li> </ul>
<i>Otros fármacos</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Variable cualitativa nominal</li> </ul>
<i>Fecha de último seguimiento</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Variable cuantitativa discreta</li> </ul>
<i>Seguimiento</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Variable cualitativa nominal</li> <li>- Se recogen otras enfermedades que aparecen entre el diagnóstico y el último seguimiento</li> </ul>
<i>Otras neoplasias</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Variable cualitativa nominal</li> <li>- Se recogen otras neoplasia a parte de GIST y se valora si son sincrónicas o metacrónicas</li> </ul>
<i>Metástasis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Variable cualitativa nominal</li> <li>- Se recoge como: casos con metástasis en el momento del diagnóstico (GISTs metastásicos), o que aparecen 3 meses después del diagnóstico o sin metástasis</li> </ul>
<i>Fecha de metástasis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Variable cuantitativa discreta</li> </ul>

<i>Localización de metástasis</i>	- Variable cualitativa categórica.
<i>Éxito</i>	- Variable cualitativa dicotómica
<i>Fecha de éxito</i>	- Variable cuantitativa discreta
<b>VARIABLES DE RESULTADO</b>	
<i>Estado</i>	- Variable cualitativa nominal. - Se recoge el evento resultado (estado del paciente en el último control: vivo sin enfermedad (VSE), vivo con enfermedad (VCE), muerto sin enfermedad (MSE), muerto con enfermedad (MCE)
<i>Supervivencia global</i>	- Variable cuantitativa - Fecha del último control (o de éxito) menos fecha de diagnóstico (en meses)
<i>Supervivencia libre de recurrencia</i>	- Variable cuantitativa - Fecha del último control (o de recidiva, o de metástasis o de éxito) menos fecha de diagnóstico (en meses)
<i>Supervivencia</i>	- Se ha valorado el tiempo de evolución desde que el paciente fue diagnosticado hasta la fecha de recogida de datos. - Variable cualitativa.

### **Grupos de riesgo en función del tamaño y mitosis:**

Los casos se clasifican/reclasifican (casos en los que el diagnóstico fue anterior a la descripción de los criterios consensuados) según los criterios de NIH-Fletcher 2001 (tamaño y mitosis/50CGA) y según criterios NCCN-Miettinen 2006 (tamaño, mitosis/50 CGA y localización).

Además se aplica el nomograma propuesto por el MSKCC para calcular la probabilidad de supervivencia libre de recurrencia a los 2 y 5 años (SLR2 y SLR5) utilizando la aplicación disponible en su web:

<http://nomograms.mskcc.org/GastroIntestinal/GastroIntestinalStromalTumor.aspx>

### **3. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO:**

Las técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) permiten la identificación, sobre

muestras tisulares o citológicas, de antígenos característicos de distintas líneas de diferenciación y funcionalismo celular, mediante su unión con anticuerpos específicos. La reacción antígeno-anticuerpo se visualiza añadiendo al final de la reacción una sustancia cromógena (diaminobencidina, -DAB-), que da lugar a un precipitado insoluble y coloreado.

En los casos de GIST diagnosticados hasta diciembre de 2007 se utiliza el método estreptavidina-biotina (**BioGenex, supersensitive Kit**) con revelado de diaminobencidina (DAB) (**Fig.13**). El estudio IHQ se realizará sobre material fijado en formol e incluido en parafina en secciones de 3 micras sobre portaobjetos pretratados.

A continuación se detalla el procedimiento seguido:

- Las muestras se desparafinan con xilenos y alcoholes a gradación decreciente, se rehidratan con agua bidestilada y se realizan varios lavados con PBS.
- Desenmascaramiento antigénico: la finalidad es descubrir los antígenos que quedan atrapados durante el proceso de fijación con formaldehído, debido a la formación de uniones cruzadas de tipo metil entre proteínas. Se utiliza el método inducido por calor y solución tamponada con citrato sódico (20 minutos a 98° C en baño para pH9 y 4 minutos en olla para pH6). Se finaliza con un lavado en agua destilada y tres baños con PBS.
- Bloqueo de la actividad de la peroxidasa endógena: mediante este paso se evita la aparición de falsos positivos producidos por la visualización de dicha actividad celular fisiológica. Para ello, se sumergieron las laminillas en una solución de Peróxido de Hidrógeno al 3% durante 30 minutos. Seguido de lavado con tres baños consecutivos de PBS, 5 minutos cada uno.
- Bloqueo de las uniones inespecíficas de los anticuerpos: Los anticuerpos son moléculas cargadas que pueden unirse a componentes tisulares que llevan cargas recíprocas (como la colágena), dando falsos positivos o "background" (fondo positivo). Para evitarlo, el tejido puede tratarse con un suero no inmune del animal de la misma especie a la utilizada en el proceso de detección (anticuerpo secundario).

- Bloqueo de las uniones inespecíficas biotina endógena: Con la misma finalidad que los dos pasos anteriores se procedió a eliminar las uniones inespecíficas que la estreptavidina administrada como método de detección podría constituir con moléculas de biotina celulares. Se utilizó un sistema de bloqueo de las uniones de Avidina-Biotina comercial.

- Incubación con el anticuerpo primario: Las laminillas se incubaron con el anticuerpo en cámara húmeda a una temperatura de +37° C durante toda la noche (“overnight”). Al día siguiente, se sacaron y se dejaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se lavaron en tres baños consecutivos con PBS, 5 minutos cada uno. En la **Tabla.11** se detallan los anticuerpos primarios y sus características.

Se realizó concomitantemente un control negativo del caso que se escogió como control positivo.

- Incubación con el anticuerpo secundario: Para la detección del anticuerpo primario se utilizó un anticuerpo biotinilado antiratón o anticonejo (Super Sensitive Link). Seguidamente se incubaron con estreptavidina marcada con peroxidasa, comercial, prediluida (Super Sensitive Label) durante 40 minutos a temperatura ambiente. Después se procedió a lavar las laminillas en tres baños consecutivos de PBS, 5 minutos cada uno.

- Revelado: El cromógeno que se utilizó para detectar la unión específica antígeno-anticuerpo fue la diaminobenzidina (DAB).

- Se contrastan las secciones con hematoxilina de Harris durante 30 segundos, se deshidratan los cortes con alcoholes crecientes (70%-90%-100%) y finalmente se realizan varios pasos en xileno y se montan los cubreobjetos de forma permanente para su estudio en el microscópico óptico.

En los casos de GIST diagnosticados a partir de 2008 se utiliza el método **Envision™ FLEX+ (DAKO)** con revelado de diaminobencidina (**Fig.14**). El estudio IHQ se realizará sobre material fijado en formol e incluido en parafina

en secciones de 3 micras sobre portaobjetos pretratados (“FLEX IHC Microscope Slides”).

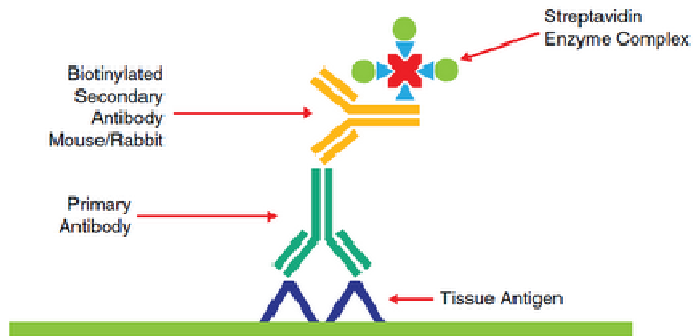
A continuación se detalla el procedimiento seguido:

- Las muestras se desparafinan con xilenos y alcoholes a gradación decreciente y rehidratación con agua bidestilada y PBS.
- Desenmascaramiento antigénico con PTLINK DAKO a diferente pH, 6 ó 9 (a 95° C durante 20 minutos y atemperar hasta 65° C).
- Procedimiento de técnica de IHQ en autostainer Link48:
  - lavado con buffer
  - Peroxidase-Blocking Reagent: incubación de 5 minutos
  - incubación anticuerpo primario: 20 minutos
  - labelled Polymer-Envision FLEX/HRP: 20 minutos
  - Flex DAB+ chromogen: 10 minutos
- Se contrastan las secciones con hematoxilina de Harris durante 7 minutos, se deshidratan los cortes con alcoholes crecientes (70%-96%-100%) y finalmente se realizan varios pasos en xileno y se montan los cubreobjetos de forma permanente para su estudio en el microscópico óptico.

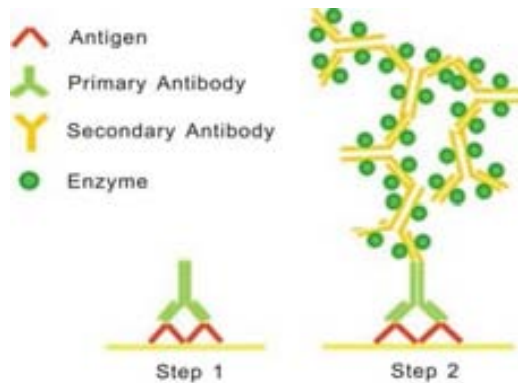
**Tabla.11:** Resumen de los anticuerpos utilizados

ANTICUERPO	CLONALIDAD	CLON	DILUCIÓN	pH	LOCALIZACIÓN AG	CASA COMERCIAL
<b>c-Kit</b>	Rabbit	Polyclonal	1/100	6	Citoplasma, membrana	DAKO
<b>CD34</b>	Mouse	QBEnd 10	Prediluido	9	Citoplasma	DAKO
<b>S100</b>	Rabbit	Polyclonal	Prediluido	9	Citoplasma	DAKO
<b>Enolasa</b>	Mouse	BBS/NC/ V1-H14	Prediluido	9	Citoplasma	DAKO
<b>Actina</b>	Mouse	HHF35	Prediluido	9	Citoplasma	DAKO
<b>Desmina</b>	Mouse	D33	prediluido	9	Citoplasma	DAKO
<b>Ki67</b>	mouse	MM-1	1/100	6	Nuclear	NOVOCASTRA





**Fig.13** Detección antigénica con el método estreptavidina-biotina (BioGenex, supersensitive Kit) con revelado de diaminobencidina: (1) desenmascaramiento antigénico, (2) bloqueo de la peroxidasa endógena, (3) bloqueo de las uniones inespecíficas de los anticuerpos, (4) bloqueo de las uniones inespecíficas a biotina, (5) detección del antígeno.



**Fig.14** Detección antigénica con el método Envision™ FLEX+ (DAKO) con revelado de diaminobencidina (two-step polymer method EnVision®)

### **Valoración del índice de proliferación celular Ki-67:**

Se realiza la cuantificación del porcentaje de actividad proliferativa en cada caso mediante la determinación inmunohistoquímica de la tinción nuclear para Ki67 (MM-1).

El conteo se realiza de forma cuantitativa, expresando el porcentaje de núcleos positivos, valorados en áreas de mayor expresión.

#### **4. ANÁLISIS DE MUTACIONES:**

##### **Estrategia de estudio mutacional:**

En el estudio de los exones de *C-KIT* y *PDGFRA* nos basamos en la frecuencia con la que se describen las mutaciones, y en que las mutaciones son excluyentes, por tanto una vez que identificamos una mutación (siguiendo el orden de frecuencia), el caso se da por estudiado.

Según la bibliografía, la frecuencia de las mutaciones que estudiamos se describe siguiendo este orden:

exón 11 (*C-KIT*) → exón 9 (*C-KIT*) → exones 12 y 18 (*PDGFRA*)

Si no detectamos mutaciones en estos exones consideramos el caso como “wild-type” (WT), para los exones estudiados.

Se ha decidido no estudiar los exones 13 y 17 de *C-KIT* ni el exón 14 de *PDGFRA* por dos razones: por su baja frecuencia (menor al 1%) y porque la mayoría son mutaciones secundarias al tratamiento.

##### **Selección del material:**

El material para el estudio se obtiene a partir de bloques de parafina que incluyen secciones tumorales representativas, de material procedente de intervención quirúrgica, fijado previamente en formalina (formol tamponado al 4%) y posterior inclusión en parafina.

El material se selecciona a partir de secciones histológicas teñidas con hematoxilina-eosina, en las que se identifican áreas tumorales representativas.

Se excluye el tejido tumoral necrótico y no tumoral.

Se realizan secciones de 5-10 µm de grosor, hasta un total de 50µm (dependiendo del área tumoral), que se depositan en tubos de Eppendorf estériles de 1,5 ml.

##### **Extracción de DNA:**

###### **a) Desparafinado.**

Se realizan lavados con xileno (xilol) y etanol. El número de lavados puede variar en cada caso, dependiendo de la cantidad de parafina que contenga el tejido.

El volumen añadido, tanto de xileno como de etanol, en cada lavado es de 1 ml. Se centrifuga durante 1 minuto a 14000 revoluciones por minuto (rpm), y se descarta el sobrenadante.

b) DNA FFPE Tissue Kit.

La extracción adecuada y reproducible se realiza con el kit **QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit**, automatizada con **QIACube®** (ambas de QIAgen®).

Se realiza digestión enzimática con Proteinasa K que se incubaba toda la noche a 56° C, con un posterior paso de 1 hora a 90° C (una vez observado que la digestión tisular es completa), que revierte el efecto de entrecruzamiento de la parafina sobre los ácidos nucleicos con las proteínas.

Los pasos siguientes a la digestión son:

-unión específica del DNA a una membrana de sílica que contiene carga neta positiva, que permite la unión de DNA y otros posibles componentes, con diferente fuerza iónica.

-dos lavados para eliminar los componentes que no sean DNA, dependiendo de la fuerza de su unión a la membrana.

-elución (con flexibilidad en el volumen de 20-100µl). Las soluciones que se utilizan neutralizan la unión debida a las cargas, por tanto se eluyen los componentes que quedan unidos a la membrana.

c) Cuantificación del DNA.

La cuantificación del DNA eluído (1-2 µl) se realiza mediante la lectura del espectrofotómetro **BioSpec-nano (SHIMADZU®)**.

Las lecturas de DNA de doble cadena (dsDNA) se realizan teniendo en cuenta la absorbancia recogida a diferentes longitudes de onda que son características de la muestra que analizamos (**Fig.15**).

En el caso del DNA, la absorbancia a 260nm es la que determina la cantidad de DNA presente en la muestra. Los ratios  $A_{260/280}$  y  $A_{230/260}$  son las que determinan la calidad de la extracción.

Nucleic Acid Conc : 135.98 ng/ $\mu$ L

OD260/280 : 2.00

OD260/230 : 1.73

Item	Result
OD260	2.773
OD280	1.413
OD230	1.625
OD320	0.054
Pathlength (mm)	0.685
Dilution	1.000

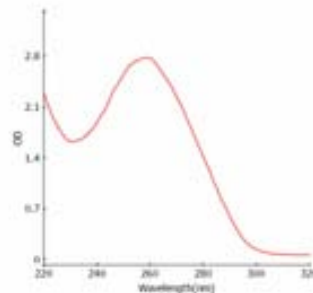


Fig.15 Ejemplo de lectura de extracción de DNA

### **Amplificación de secuencias de estudio (técnica de PCR):**

Los primers utilizados son los descritos en la bibliografía (70):

#### **Exón 11 del gen *C-KIT* (codones 550-591)**

##### **Primer**

##### **Secuencia**

Exón 11 forward 5'-CCA GAG TGC TCT AAT GAC TGA GAC-3'

Exón 11 reverse 5'-AGC CCC TGT TTC ATA CTG ACC-3'

Producto de amplificación resultante: fragmento de 236 pares de bases.

#### **Exón 9 del gen *C-KIT* (codones 450-513)**

##### **Primer**

##### **Secuencia**

Exón 9 forward 5'-TTC CTA GAG TAA GCC AGG GCT TT-3'

Exón 9 reverse 5'-TGG TAG ACA GAG CCT AAA CAT CC-3'

Producto de amplificación resultante: fragmento de 285 pares de bases

#### **Exón 18 del gen *PDGFRA* (codones 814-849)**

##### **Primer**

##### **Secuencia**

Exón 18 forward 5'-GCC ACC ATG GAT CAG CCA GT-3'

Exón 18 reverse 5'-AGT GAA GGA GGA TGA GCC TGA CC-3'

Producto de amplificación resultante: fragmento de 256 pares de bases

#### **Exón 12 del gen *PDGFRA* (codones 552-595)**

##### **Primer**

##### **Secuencia**

Exón 12 forward 5'-CTG GTG CAC TGG GAC TTT GGT AAT-3'

Exón 12 reverse 5'-GTG TGC AAG GGA GGA AAA GGG AGT CT-3'

Producto de amplificación resultante: fragmento de 235 pares de bases.

Se comprueba la idoneidad de los primers seleccionados con diferentes programas:

PCR test: [http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr\\_products.html](http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_products.html)

Primer 3: <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>

Estos programas simulan una amplificación a partir de los parámetros que le introducimos: las secuencias de DNA que contiene la región del gen a estudio, secuencias de los primers y condiciones de la reacción.

Se comprueba que el producto simulado de amplificación de PCR contiene la región de interés, obteniéndose información sobre si existe o no realmente amplificación, la longitud de la secuencia amplificada, la composición de las bases de la región amplificada, la temperatura idónea de amplificación (temperatura de melting o  $T_m$ ), si los primers tienen algún problema en la secuencia, etc.

El tratamiento de los primers comerciales se realiza según las especificaciones del fabricante (**OPERON®**), obteniendo soluciones de trabajo de 10 $\mu$ M.

Se prepara el programa de amplificación de cada exón en el termociclador (**FlexCycler AnalytikJena®**), que lleva a cabo la PCR (**Tabla.12**):

**Tabla.12** Amplificación de secuencias

Pasos (tiempo)	T <sup>a</sup> (°C)	Ciclos
1- Activación de la polimerasa (15 min)	95°C	
2- Desnaturalización del DNA (1 min)	94°C	35
3- Hibridación de los primers (1 min 30seg)	60°C*	35
4- Extensión de la cadena para la polimerasa (1 min 30seg)	72°C	35
5- Extensión final (10 min)	72°C	

\* La temperatura de hibridación de los diferentes primers utilizados es la misma excepto en la amplificación del exón 9 de *C-KIT* donde es de 59°C.

Los pasos 2 a 4 consisten en los ciclos de la PCR que se repetirán hasta 35 veces.

El protocolo de reacción de nuestra PCR utilizado es:

1. Introducimos 12.5 $\mu$ l de HotStart Master Mix (QIAGEN®).

2. Introducimos 1  $\mu\text{l}$  de cada primer (Forward y Reverse) desde la solución madre a 10  $\mu\text{M}$ . La concentración final es de 0.4  $\mu\text{M}$ .
3. Introducimos 9.5  $\mu\text{l}$  de agua bidestilada.
4. Añadimos 1  $\mu\text{l}$  de nuestra muestra, teniendo en cuenta que nuestra reacción NO permite exceder los 500ng de DNA, pues se pueden producir problemas de saturación de la reacción.

Para cada PCR utilizamos un control negativo o blanco, en el que introducimos una reacción de PCR sin muestra. En el caso de que esta reacción de control negativo amplifique, se considerará que se ha producido contaminación durante la manipulación y se descartan los productos de amplificación de las muestras procesadas al mismo tiempo que el control blanco.

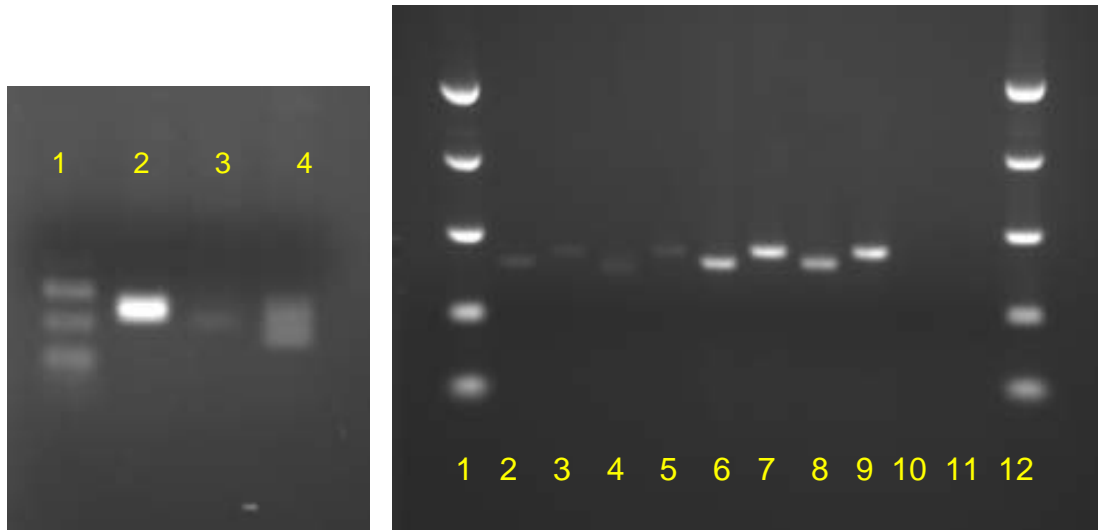
#### **Controles de calidad del producto de amplificación de PCR:**

Una vez finalizada la PCR, se analiza mediante un gel de agarosa. Este proceso consiste en obtener una matriz que contiene agarosa (polisacárido) y que permite separar moléculas (en nuestro caso el DNA) debido a la porosidad de dicho componente.

Los componentes se separan debido a que se emite una carga a través de dicho gel que provoca el desplazamiento de las moléculas en función de su peso molecular.

Dependiendo de la densidad de agarosa que introduzcamos a cada gel, se puede conseguir mayor resolución (cuanto más polímero, mayor es la densidad, más resistencia al avance y mayor resolución) aunque se considera que el límite de los geles de agarosa son 10pb.

En cada gel introducimos un marcador de peso molecular, que actúa como referencia, para determinar la longitud de los productos de PCR. Dicho marcador contiene una serie de fragmentos de diferentes pesos moleculares (por ejemplo de 50pb, 100pb, 150pb, etc.) que servirán como referencia a la hora de comprobar la longitud específica de nuestro fragmento amplificado (Fig.16).



**Fig.16 Geles de agarosa al 3%. Gel de imagen izquierda.** Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: PCR de exón 9 de caso mutado (duplicación 6pb), Carril 3: PCR de exón 11 de caso con mutaciones puntuales. Carril 4: PCR de exón 11 de caso con delección de 54pb (se observa smear por la presencia en el producto de PCR de los dos alelos, el wt y el delecionado).

**Gel de imagen derecha.** PCRs de exones 18 y 12 de *PDGFRA*. Carriles 1 y 12: Marcadores de peso molecular. Carriles 2, 4, 6, 8 y 10: PCRs de exón 12 (carril 10, blanco). Carriles 3, 5, 7, 9 y 11 (carril 11, blanco).

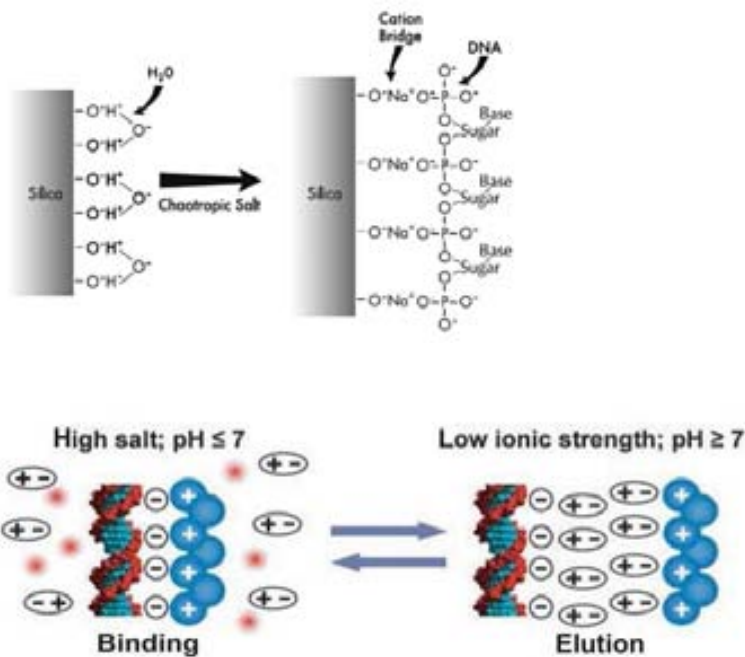
Si se obtiene más de una banda (o producto de amplificación) o una banda que difiera en gran medida al tamaño esperado, se revisan los primers en busca de un posible error metodológico.

### **Secuenciación:**

#### **a) Purificación de los productos amplificados (MinElute PCR Purification Kit®).**

Este kit utiliza un sistema de membranas de sílica que produce un DNA purificado altamente concentrado y con una purificación directa de los dsDNA (de doble cadena) entre 70pb-4kb. Este sistema garantiza la eliminación de las enzimas presentes en la reacción y de los productos de hasta 40 pb (*primers*, etc). La eficiencia de recuperación del DNA es del 80%.

La columna de sílica permite la unión al DNA a altas concentraciones de sales mientras que el resto de componentes se eluyen y se eliminan. Para asegurar la correcta unión del DNA a la columna, ésta contiene una alta concentración de sales (que modifica la estructura del agua) y un pH adecuado (<7.5) (Fig.17).



**Fig.17 Imagen superior:** Unión de DNA a membrana. **Imagen inferior:** Al cambiar el pH en el paso de elución, se separan los componentes de la membrana y se recogen para su análisis.

### b) Reacción de secuenciación (BigDye Terminator v1.1®)

La reacción de secuenciación consiste en hibridar los *primers* con el DNA amplificado, cada *primer* (forward -F- y reverse -R-) por separado.

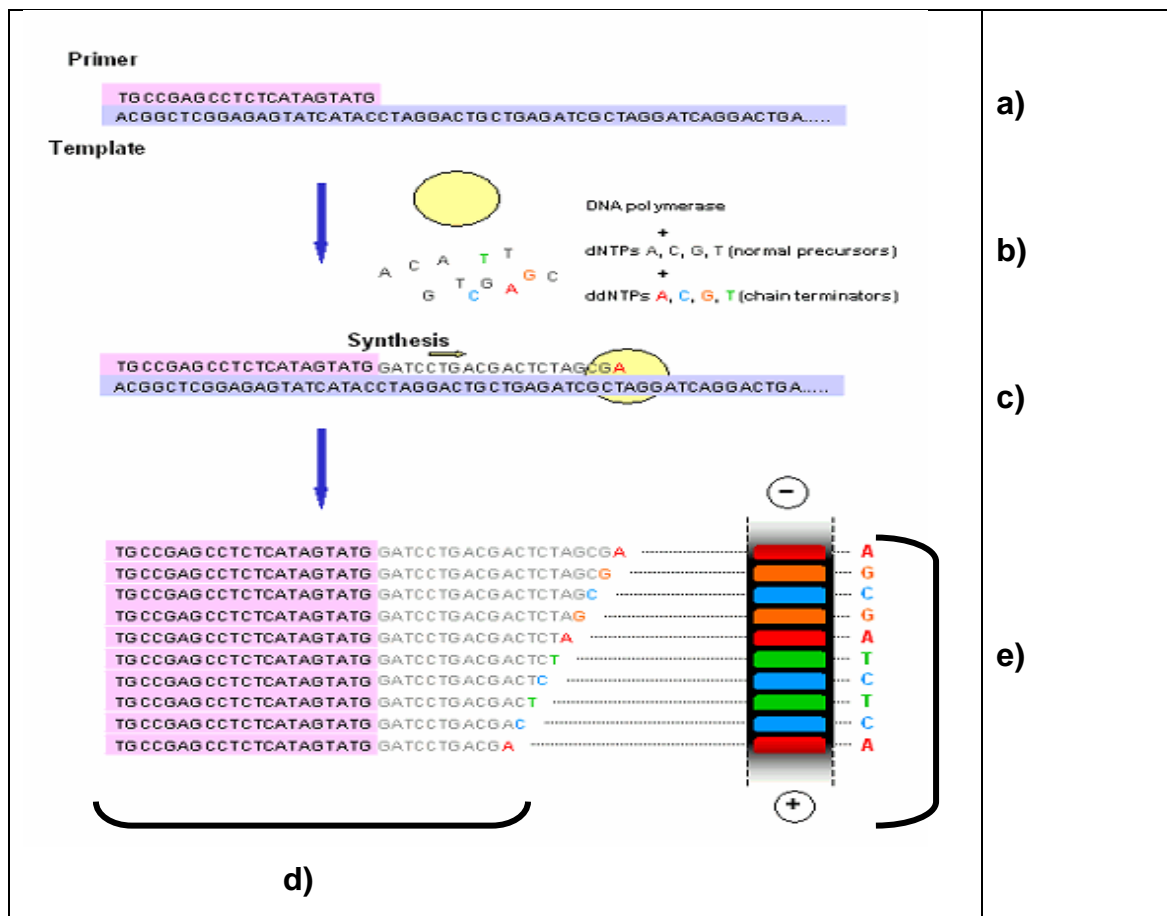
De esta manera generaremos lecturas de cada estudio en ambas cadenas de DNA y se validan SÓLO los casos que presentan mutaciones en ambas cadenas.

En cada reacción que preparamos tendremos:

- 1 sólo primer. De cada caso a estudio se realizan DOS secuenciaciones para confirmar los resultados.
- DNA polimerasa.
- Buffer de reacción.
- nucleótidos que se incorporan normalmente a la cadena de nueva síntesis (dNTPs) y nucleótidos modificados que impiden la polimerización de las bases, provocando que se pare la reacción. Cada uno de estos nucleótidos está marcado con un fluorocromo diferente según sea A, T, C o G (ddNTPs).



Mientras la polimerasa incorpora dNTPs, la cadena se va extendiendo pero cuando incorpora ddNTPs, se para la polimerización en esa base y queda marcado el extremo 3' con el fluorocromo correspondiente. El resultado de la PCR de secuenciación es un continuo de cadenas de diferente longitud, cada una marcada con el fluorocromo de la última base incorporada. Este "pool" de secuencias es el producto de la secuenciación y es el que dará la pauta de bases que corresponden a la región que estudiamos (Fig.18).



**Fig. 18** Esquema de reacción de secuenciación de terminación.

- a)** El *primer* que analizamos se hibrida al DNA.
- b)** Añadimos DNA polimerasa y un mix de nucleótidos -dNTPs- (sintetiza cadena) y las bases que impiden la síntesis (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP)
- c)** La polimerasa extiende la síntesis de la cadena, incorporando bases complementarias a la secuencia del DNA. Cuando se incorpora una base ddNTP, el proceso se detiene.
- d)** Durante un ciclo de secuenciación se generan múltiples cadenas nuevas, cada una se detiene en una base específica y queda marcada con uno de los 4 fluorocromos. Las secuencias empiezan en un mismo punto, varían de longitud dependiendo del punto de terminación. Las cadenas se separan en base a su tamaño y según su movilidad electroforética relativa a través de una matriz, pasando antes los fragmentos cortos.
- e)** La secuencia se lee automáticamente en cuanto el DNA pasa por el punto de detección o lectura en el gel o matriz. El orden de los colores de los fragmentos revela la secuencia.

La purificación del producto de secuenciación se realiza mediante las columnas **illustra AutoSeq G-50 (GE Healthcare®)**.

Estas columnas contienen una resina especial que permite la eliminación de los reactivos de secuenciación (bases nitrogenadas o dNTPs no incorporados, etc), preservando el producto de secuenciación.

El protocolo de columnas utilizado, **AutoSeq G-50 Dye Terminator Removal Kit®**, ha sido diseñado para la purificación de reacciones de secuenciación con kits **BigDye de Applied Biosystems®**.

d) Lectura de las muestras en el secuenciador.

La lectura de las muestras se realiza en un secuenciador automático **3130 Genetic Analyzer** de cuatro capilares de **Applied Biosystems®**.

Una vez obtenido el producto de secuenciación, las muestras tienen que seguir un proceso para su lectura:

- Incubar las muestras en un medio desnaturizante (Formamida de alta densidad o **Hi-Di formamide®**). Introducimos 5µl de muestra y 5µl de formamida para la lectura.
- Desnaturizar a altas temperaturas (95° C unos 5 minutos).
- Mantenimiento de las muestras a 4° C hasta su lectura.
- Introducción de las muestras en placas de secuenciación de 96 pocillos y lectura en el secuenciador con pre-programación específica de secuencias (identificando también el kit utilizado en la reacción).

Una vez que la muestra se ha pasado por el secuenciador se recogen los resultados para un primer análisis, que se realiza mediante el programa **Sequencing Analyser v5.2®** y posteriormente se pueden re-analizar con otros softwares como el **Sequence Scanner v1.0® (Fig.19)**.

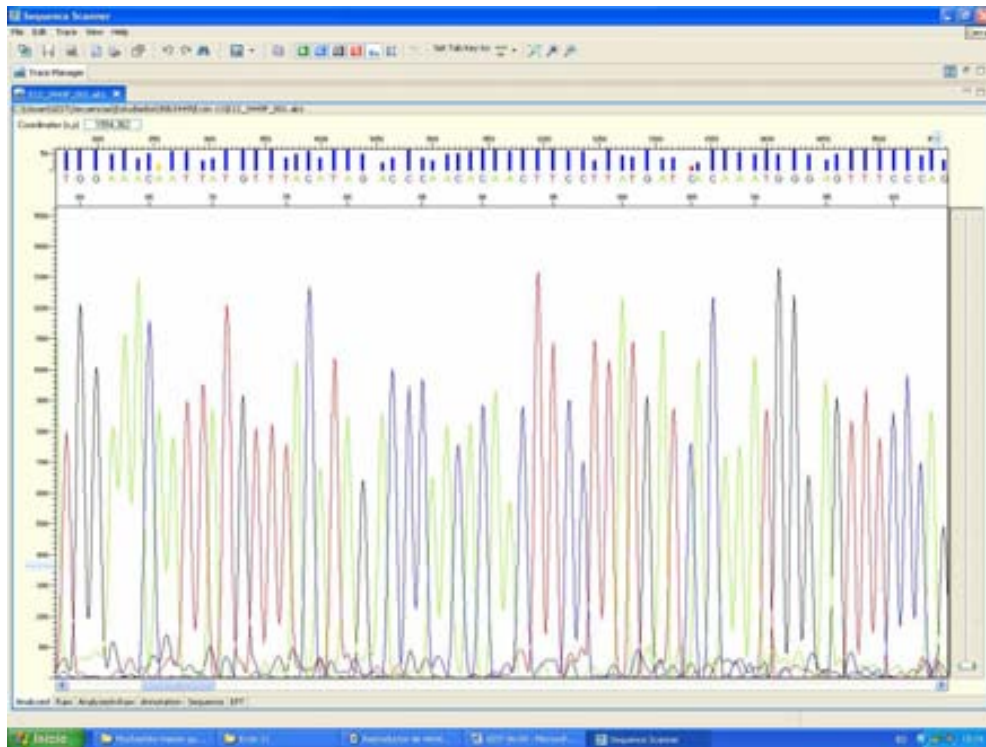


Fig. 19 Pantalla del Sequence Scanner con la secuencia a analizar.

**Interpretación de las secuencias (valoración de resultados):**

Por cada caso estudiado se obtienen las lecturas de las dos cadenas, que se interpretarán según la cadena de DNA de la secuencia original (no mutada).

Se pueden detectar los siguientes tipos de mutaciones:

→ mutaciones puntuales: el cambio de base puede llevar a un cambio en la pauta de lectura (missense, nonsense) o no provocar ningún cambio (silent). En éste último si la frecuencia del cambio en la base en la población es >1% (definido por estudios poblacionales), se habla de Polimorfismos de base única (SNPs).

→ Deleciones.

→ Inserción.

→ Deleciones-Inserciones (descritas como In-del).

→ Duplicaciones.

Una vez se detecta un cambio en la secuencia se debe confirmar en la cadena complementaria (si es posible, estudiar la mutación por duplicado con una segunda PCR).

Todas las mutaciones detectadas en nuestra serie han sido confirmadas en las dos cadenas, excepto en los casos del exón 18 de *PDGFRA*.

Una vez definimos la mutación, la expresamos según la nomenclatura de la *Human Genome Variation Society (HGVS)*, que se utiliza como sistema internacional. De esta manera describimos la mutación a nivel del DNA genómico o a nivel proteico.

### **Análisis de mutaciones en el gen BRAF:**

En los casos en los que no se detectaron mutaciones en los exones estudiados de los genes *c-KIT* y *PDGFRA* se estudia las mutaciones en el gen *BRAF*, principalmente la p.V600E.

El estudio de las mutaciones en *BRAF* se realiza mediante la metodología de pirosecuenciación.

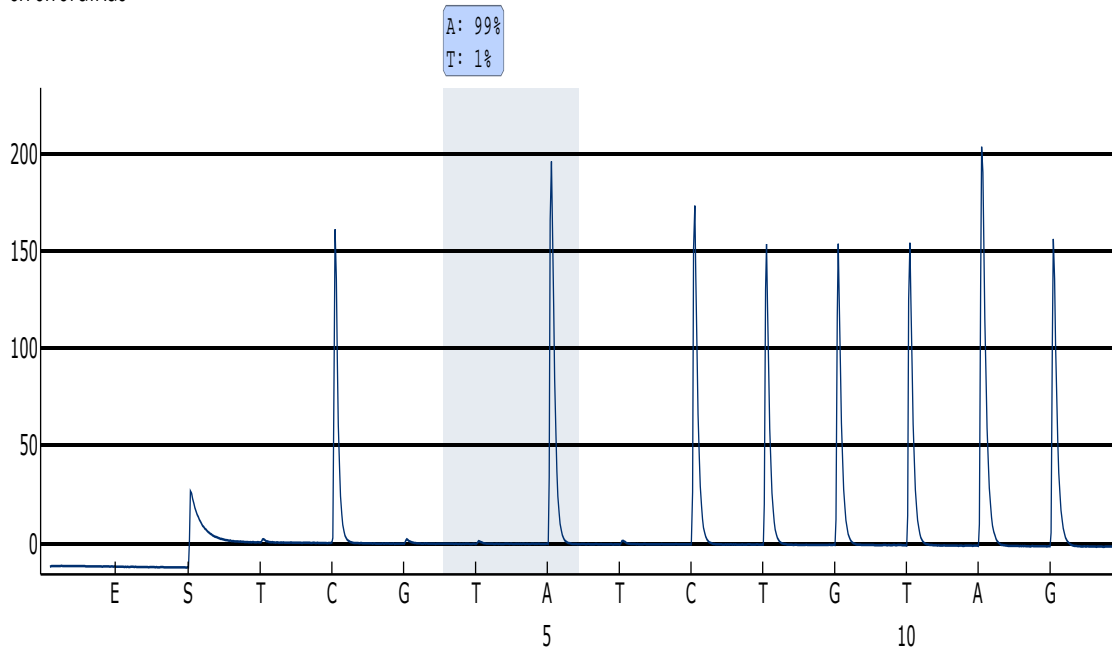
La pirosecuenciación es una técnica de secuenciación a tiempo real, con detección por luminiscencia de la síntesis de la cadena de DNA. Es una tecnología libre de electroforesis, donde se realiza una primera PCR para amplificar el fragmento a estudiar y una segunda reacción (la pirosecuenciación en sí) en la que se analiza propiamente los codones (o aminoácidos) de interés.

Las condiciones de las diferentes reacciones son las determinadas por el propio kit de pirosecuenciación ***therascreen BRAF Pyro Kit (QIAgen)***®.

En dicho estudio además del codón V600 (secuencia de DNA: GTG) se realiza el análisis de los codones *Gly464*, *Gly466* y *Gly469* (todos ellos con secuencia GGA que codifican para Glicinas) (Fig.20, 21).

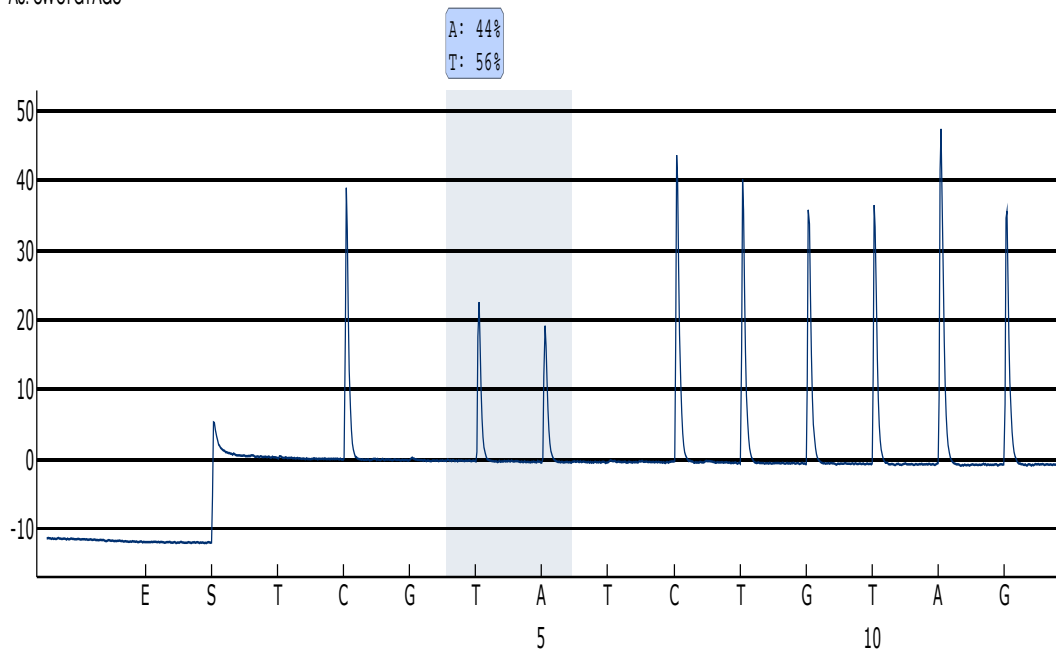
El estudio de la secuencia está preparado para la lectura de una sola cadena, en este caso la cadena REVERSE (en todos los codones estudiados).

C7: CWCTGTAGC



**Fig. 20** Pirograma caso con DNA wt (secuencia wild-type cadena forward CTACAGTG, cadena reverse CACTGTAG).

A8: CWCTGTAGC



**Fig. 21** Pirograma caso con presencia de mutación p.V600E.

## 5. ANÁLISIS DE NIVELES DE EXPRESIÓN DE **microRNAs**:

### **Extracción de miRNAs:**

Revisión de la serie de tumores GISTs para identificar aquellos casos en los que NO se disponía de tejido normal (no tumoral) o se disponía de escaso material, factor limitante para realizar el estudio de expresión de miRNAs.

Estas premisas llevan a descartar del estudio 22 casos.

En los casos en los que se dispone de tejido tumoral y tejido sano se revisan las secciones histológicas y se selecciona mediante macrodissección el material más adecuado.

El sistema empleado para la extracción de miRNAs es el kit **miRNeasy FFPE kit**. Este kit permite aislar o purificar el RNA total (incluidos los miRNAs) presente en las muestras tisulares fijadas en formol e incluidas en parafina (Formalin Fixed Paraffin Embedded -FFPE-).

Antes de realizar las extracciones de miRNA, se tuvieron en cuenta los siguientes requisitos para garantizar una calidad óptima de las muestras:

1- Para minimizar la degradación de los RNAs presentes en el material, se limpia la superficie del microtomo con el que se realizan las secciones, dos veces, con una solución protectora (**RNAse Killer**®, 5 Prime), que se deja actuar unos minutos y seguidamente se lava con agua purificada. Esta solución elimina completamente RNAsas y DNAsas de las superficies (además de inactivarlas), ya que la presencia de estas enzimas puede interferir en posteriores reacciones enzimáticas.

2- Se realizan un máximo de dos secciones a 10µm, por caso, para no sobrecargar las columnas de extracción (<20 µm).

El problema de estudios de microRNA en muestras fijadas en formol e incluidas en parafina (FFPE) es que este tipo de procesamiento degrada, modifica químicamente y provoca entrecruzamientos entre ácidos nucleicos y proteínas. Este hecho dificulta la recuperación adecuada del material para estudio. El kit miRNeasy FFPE incorpora modificaciones para revertir al máximo estos efectos y recuperar el material más óptimo.

El protocolo incluye diferentes pasos (**Fig.22**):

→ desparafinado. Lavados con solución xileno y posterior eliminación del mismo con lavados con solución de etanol.

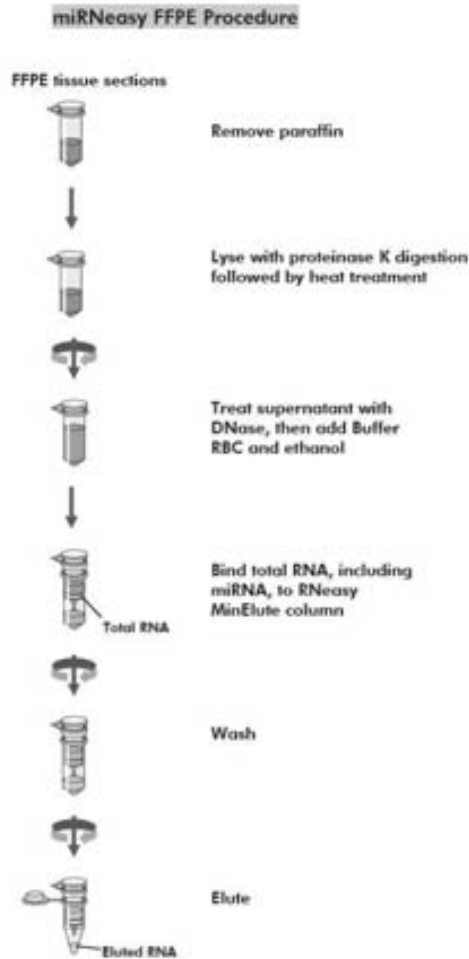
→ digestión con proteinasa K. Este paso es crítico, pues además de la propia digestión del material, en este momento se revierten parcialmente los entrecruzamientos entre moléculas, mejorando tanto la calidad como la cantidad del RNA recuperado, así como los resultados de las posteriores técnicas utilizadas para su análisis.

→ digestión con DNasa I. Este paso elimina el DNA presente en la muestra, tanto el de alto peso molecular como los pequeños fragmentos presentes en las muestras FFPE, que pueden interferir en procesos posteriores.

→ unión del RNA (total y miRNA) a las columnas. Este proceso se acompaña de diferentes buffers/soluciones salinas adecuadas para la unión de la muestra a la columna y para los diferentes lavados que eliminan las moléculas no específicas que pueden interferir en la reacción.

→ elución del RNA. El último paso de la extracción consiste en separar las moléculas unidas a la membrana. Se lavan las columnas con un buffer que neutraliza las uniones y de esta manera se recuperan las moléculas de RNA para su posterior análisis.

Los diferentes pasos del protocolo, en los que es posible, se realizan con el sistema QIAcube (columnas de sílica, unión y lavados).



**Fig. 22** Esquema de los diferentes pasos seguidos con el sistema de extracción del kit miRNeasy FFPE.

### **Quantificación de RNA:**

La técnica de PCR consiste en múltiples ciclos de reacciones enzimáticas y es especialmente sensible a la presencia de sustancias que puedan interferir en la reacción, como proteínas, fenoles, sales, etc. Por eso se realizan las extracciones de RNA con los kits más adecuados en función de las características del material sobre el que se quiere realizar el estudio

**(miRNeasy FFPE kit).**

Una vez obtenemos nuestro eluido de RNA se realiza la cuantificación de RNA con un espectrofotómetro (**BioSpec-Nano, Shimadzu©**) (**Fig.23**).



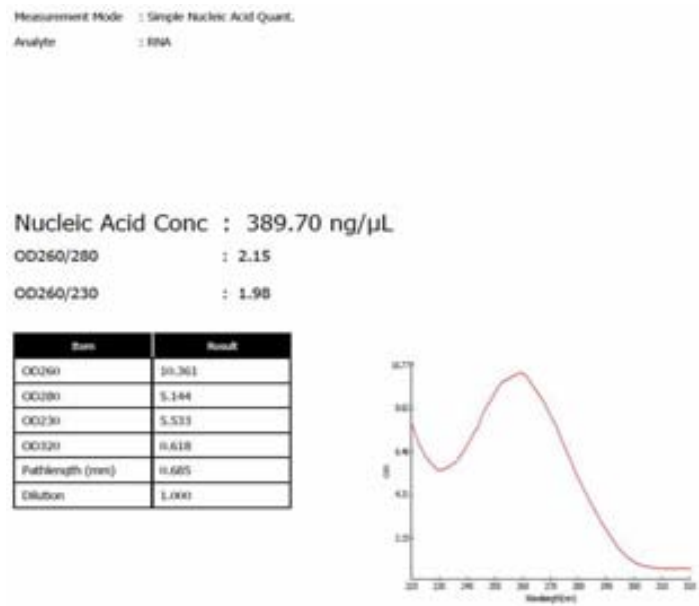


Fig. 23 Perfil de lectura de espectrofotometría de una extracción de RNA.

El espectrofotómetro permite la cuantificación del RNA según los siguientes parámetros:

-En el espectrofotómetro dispensamos una determinada cantidad de la muestra a analizar. Para realizar las lecturas el sistema emite una luz a determinadas longitudes de onda y en cada emisión se registra la absorbancia específica de cada muestra. Cada molécula registra un máximo de absorbancia a una longitud de onda determinada. En el caso de los RNAs/DNAs este máximo se registra a 260nm.

- La lectura de cada muestra a 260nm ( $A_{260}$ ) nos permite cuantificar los RNAs presentes en la muestra, convirtiendo los valores de absorbancia en cantidad de material.

- El cálculo de la concentración de la muestra se determina en función del coeficiente de absorbancia. En el caso de los RNAs a  $A_{260}$  de valor 1 corresponde a una concentración de 40ng/μl RNA (un valor de lectura a  $A_{260}$  de 1 correspondería a una muestra que dispone de una concentración de 40 ng/μl).

- La lectura de la muestra se realiza previa calibración, a partir de una lectura “blanco” sobre agua bidestilada, libre de RNAsas.

Es importante tener en cuenta que las lecturas a 260nm ( $A_{260}$ ) no discriminan entre RNAs y DNAs, por tanto, hay que obtener la mínima contaminación posible con DNA después del proceso de extracción, dado que se pueden obtener valores erróneos en la lectura del espectrofotómetro.

Para valorar la calidad de la extracción se calcula la ratio entre  $A_{260}$  y  $A_{280}$ . Se toma el valor  $A_{280}$  como el máximo de absorbancia para las proteínas. La ratio  $A_{260}/A_{280}$  de un RNA puro se encuentra entre valores de 1.9-2.1. Valores menores indican contaminación proteica de la muestra.

Una vez obtenidas las muestras de RNAs se procede al análisis de los miRNAs, según el protocolo **miScript PCR System (QIAGEN®)**, que se realiza en dos pasos:

- Retrotranscripción (paso de RNA a DNA complementario -cDNA-)
- Real-Time PCR (RT-PCR).

**Retrotranscripción:**

Se realiza una retrotranscripción para pasar los microRNAs de la muestra a cDNA (DNA complementario). Nuestra reacción contiene una poli(A) polimerasa que incorpora una cola de adeninas en el extremo 3' de los microRNAs (que en condiciones fisiológicas no tienen) y una transcriptasa reversa que sintetiza un cDNA a partir de nuestra muestra de RNA (Fig.24).

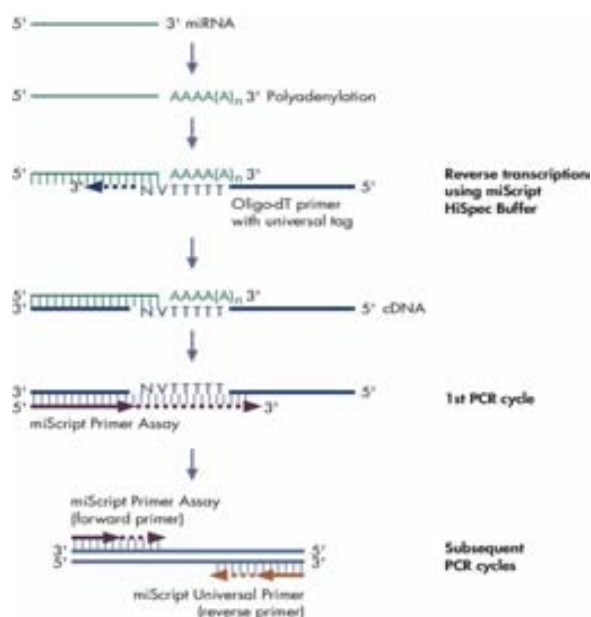


Fig. 24 Proceso de retrotranscripción con el kit miScript RT II Kit.

Para realizar la retrotranscripción se han utilizado 500ng de muestra del RNA (el margen de muestra que permite el kit es entre 10pg a 1µg).

El protocolo de la reacción de retrotranscripción utilizado con el kit **miScript RT II Kit** es el siguiente:

Component	Volume/reaction
miScript RT Buffer, 5x*	4 µl
RNase-free water	Variable
miScript Reverse Transcriptase Mix	1 µl
Template RNA	Variable (up to 1 µg)
<b>Total volume</b>	<b>20 µl</b>

\* Includes Mg<sup>2+</sup>, dNTPs, and primers.

La cantidad de RNA puede variar en función de la concentración obtenida en cada una de las extracciones y del rendimiento posterior que obtengamos en nuestra PCR. En todos los casos hemos utilizado la misma cantidad de muestra, con el fin de homogenizar los resultados.

Una vez realizada la retrotranscripción, el producto resultante (cDNA de tejido tumoral y normal) se congela a -20° C.

### **Real Time- PCR:**

#### a) Cuantificación relativa con método $\Delta\Delta Ct$ .

El estudio de expresión de los microRNAs se realiza mediante el estudio  $\Delta\Delta Ct$ .  $\Delta\Delta Ct$  se define como un método de cuantificación relativa, y se utiliza para obtener la magnitud de los cambios de expresión fisiológicos de un gen diana (en nuestro caso miRNAs 221, 222 y 494) respecto a la expresión de un gen de control endógeno (RNU6B, gen de expresión ubicua, con expresión constante entre tejido sano y tejido a estudiar tumoral).

En los estudios de RealTime PCR se cuantifica cada amplificación según el valor de “Crossing point” (Ct) de cada PCR en cada muestra. Este valor de Ct es el ciclo de amplificación en el que se detecta un aumento significativo de la fluorescencia, coincidiendo con el valor “threshold” previamente establecido,

según el tipo de experimento. Este valor puede ser una fracción (p. ej. Ct=25.6) y es a partir del que se realizarán los posteriores análisis.

Para poder realizar el estudio por el método  $\Delta\Delta Ct$  se necesita el resultado del estudio de amplificaciones de los diferentes RNAs a estudio (determinación de eficiencias de amplificación).

b) Determinación de eficiencias de amplificación.

Esta determinación es un requisito indispensable para la determinación de  $\Delta\Delta Ct$ , ya que tenemos que comprobar antes del análisis que los diferentes RNAs a estudio tienen una amplificación similar a diferentes concentraciones de la muestra. Si los diferentes RNAs no tienen unas eficiencias de amplificación comparables este método no es óptimo para este tipo de estudio, pues introduciría un error al estimar muestras con diferentes concentraciones.

A partir de un cDNA obtenido desde una Retrotranscripción de un caso propio, se realiza una serie de 5 diluciones con agua bidestilada 1:2 (partiendo de 500mg de RNA utilizado para la Retrotranscripción) (Fig.25). Por protocolo se realiza la PCR por triplicado para cada uno de los cuatro RNAs a determinar.

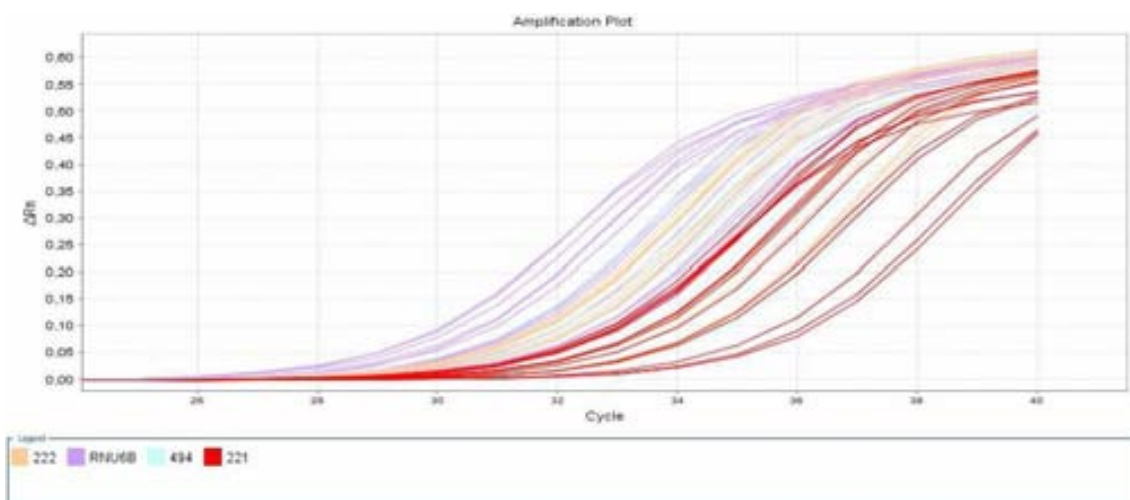


Fig. 25 RealTime-PCR de los 4 RNAs a estudio partiendo de una dilución de cDNA.

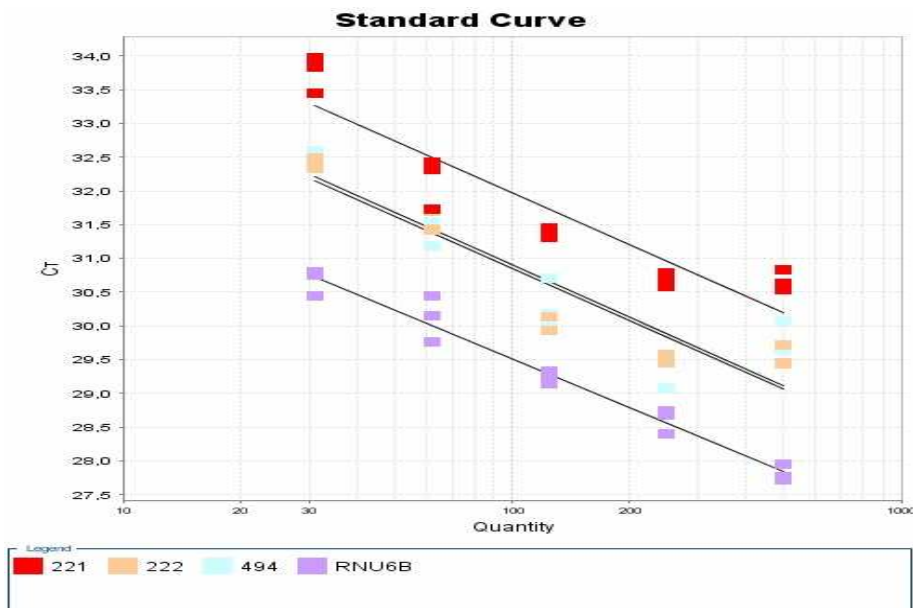


Fig. 26 Curvas estándar resultantes de la RealTime-PCR.

Una vez realizada esta RT-PCR se comparan las eficiencias de amplificación de los diferentes RNAs de la siguiente manera: restando los valores de Ct entre cada RNA a estudio y el RNA de control endógeno (p. ej.: restamos los valores de Ct de miRNA-221 de los de RNU6B) a diferentes concentraciones.

A partir de estos valores, se traza una recta relacionando cada comparación de Ct (Ct de 221 versus RNU6B) con la cantidad de muestra presente en cada PCR (expresado en logaritmos, p. ej. 500ng en valor logarítmico corresponde a 2.69). Con estos valores se construye una recta y la pendiente (“slope”) resultante tiene que ser  $<0.1$  para poder realizar la comparación estadística  $\Delta\Delta Ct$  (Fig.26).

En todos los casos se comprueba que la pendiente fue inferior a 0.1, de modo que se consideran óptimos para realizar el estudio con el sistema  $\Delta\Delta Ct$ .

c) Casos control pre-estudio de serie de GIST.

A partir de los resultados publicados por el grupo de Koelz, que describen en los GISTs menor expresión de miRNA-221 y 222, comparado con el tejido no tumoral y otras neoplasias, se realiza estudio de control de expresión de microRNA en 2 casos de GISTs de nuestra serie y dos casos control de

tumores no-GIST (Fig.27). Se determina sólo la expresión de miRNA-221 y miRNA-222, pues en ese momento no se disponía de primers del miRNA-494. Los casos control son un carcinoma papilar de tiroides (N1) y un adenocarcinoma de próstata (N3).

**- Caso GIST 1 (G1)**

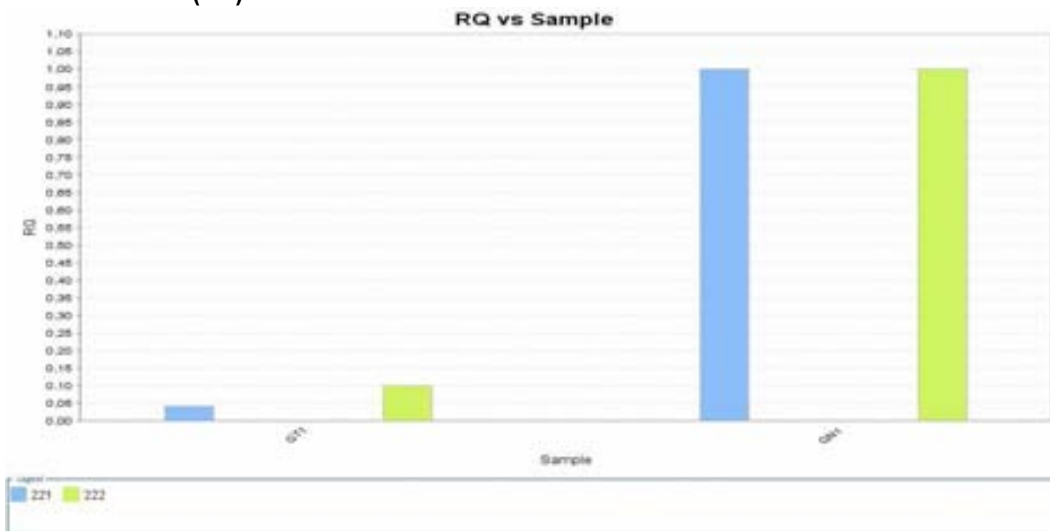


Fig. 27A La gráfica muestra la comparación de los dos miRNAs: *disminución* de la expresión en el tejido tumoral respecto al tejido sano de 0.04256 en el miRNA-221 y de 0.09915 en el miRNA222.

**- Caso GIST 2 (G3)**

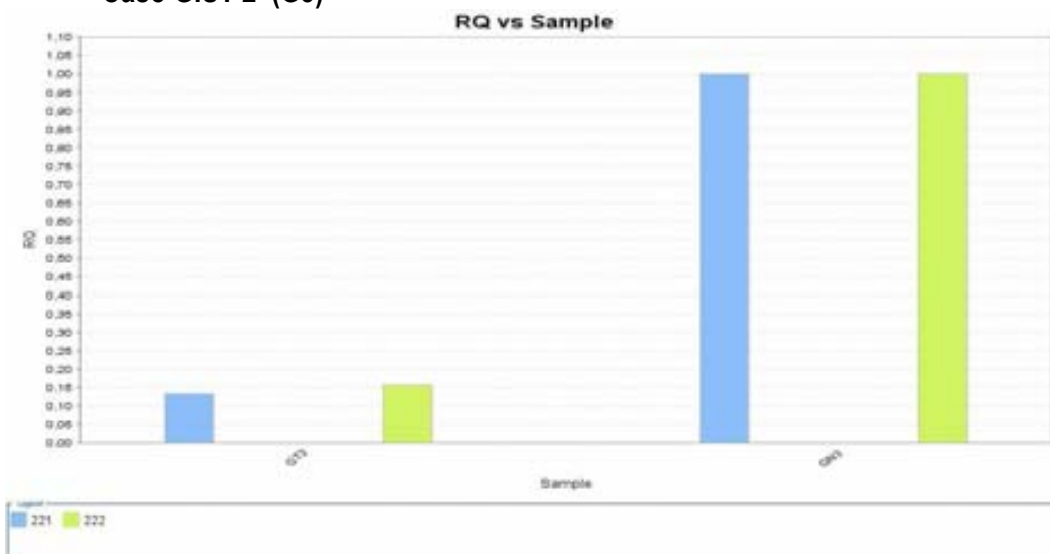


Fig. 27B La gráfica muestra la comparación de los dos miRNAs: *disminución* de la expresión en el tejido tumoral respecto al tejido sano de 0.13381 en el miRNA-221 y de 0.15871 en el miRNA222.

- Caso NO GIST 1 (N1)

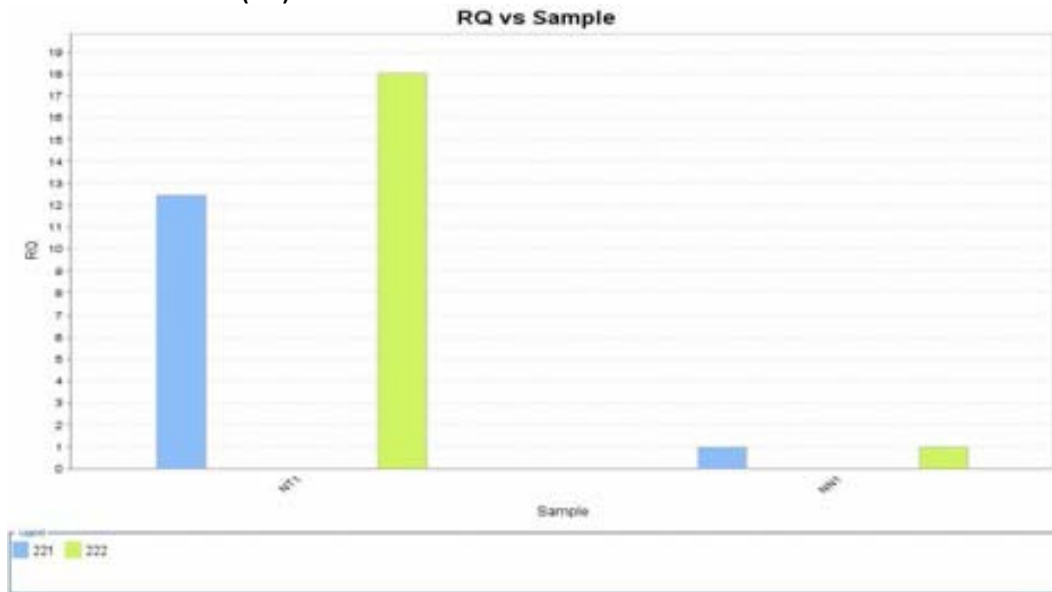


Fig. 27C La gráfica muestra la comparación de los dos miRNAs: *aumento* de la expresión en el tejido tumoral respecto al tejido sano de 12.4423 en el miRNA-221 y de 18.0253 en el miRNA-222. El aumento de expresión en estos tumores es notable respecto al tejido sano (más de 10 veces el nivel normal).

- Caso NO GIST 2 (N3)

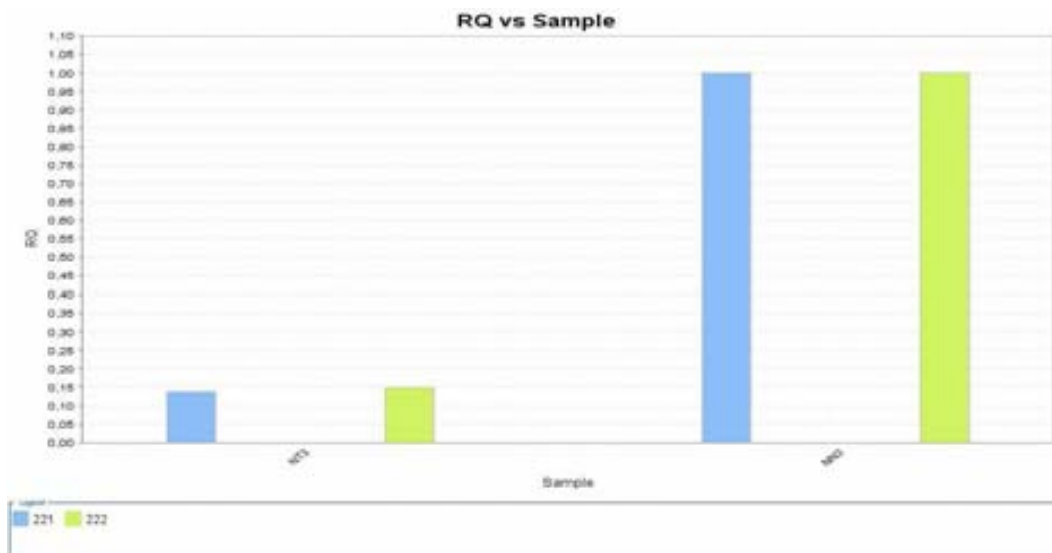


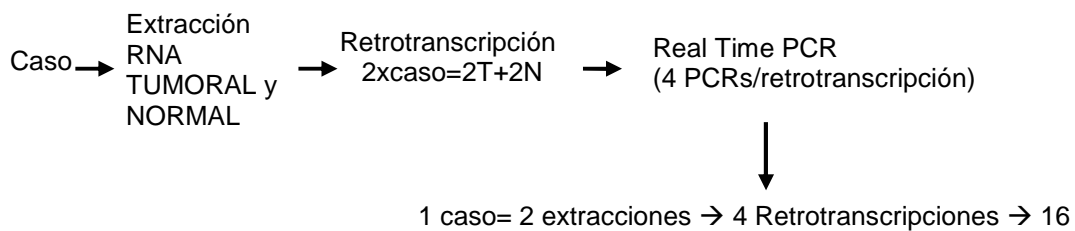
Fig. 27D La gráfica muestra la comparación de los dos miRNAs: *disminución* de la expresión en el tejido tumoral respecto al tejido sano de 0.1383 en el miRNA-221 y de 0.1494 en el miRNA-222.

Los casos se seleccionaron según descripciones de la bibliografía con la intención de confirmar un cambio en el patrón de expresión de los miRNAs: disminución en casos de GIST respecto aumento en casos tumorales no-GIST. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que en los dos casos de GIST se produce una disminución de la expresión en tejido tumoral respecto al tejido sano (105-107). En los casos control, en el carcinoma papilar de tiroides se ha observado un aumento de expresión en tejido tumoral respecto al tejido sano de 12 y 18 veces, de miRNA-221 y miRNA-222, respectivamente. Este aumento se corresponde con el descrito en la bibliografía para este tumor (125).

En cambio, el estudio de expresión en el caso de adenocarcinoma de próstata demuestra una disminución de la expresión en tejido tumoral respecto al tejido sano (126-127).

d) Diseño del estudio de RealTime-PCR.

Para cada caso de nuestra serie tenemos que realizar una RT-PCR de cada uno de los miRNAs (221, 222, 494 y RNU6B) en el tejido tumoral y en el tejido sano. Además, para validar los resultados se realizaron retrotranscripciones independientes por duplicado, de cada caso a analizar.



Teniendo en cuenta estos parámetros, en cada placa de RT-PCR se pudieron estudiar 16 casos (Fig.28):



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	2471 miR-221	2471 miR-222	2471 miR-494	2471 miR-221	2472 miR-221	2472 miR-222	2472 miR-494	2472 miR-221	2472 miR-222	2481 miR-221	2481 miR-222	2481 miR-494	2481 miR-221
B	2482 miR-221	2482 miR-222	2482 miR-494	2482 miR-221	2471 miR-221	2471 miR-222	2471 miR-494	2471 miR-221	2471 miR-222	2472 miR-221	2472 miR-222	2472 miR-494	2472 miR-221
C	2481 miR-221	2481 miR-222	2481 miR-494	2481 miR-221	2482 miR-221	2482 miR-222	2482 miR-494	2482 miR-221	2482 miR-222	2471 miR-221	2471 miR-222	2471 miR-494	2471 miR-221
D	2472 miR-221	2472 miR-222	2472 miR-494	2472 miR-221	2481 miR-221	2481 miR-222	2481 miR-494	2481 miR-221	2481 miR-222	2482 miR-221	2482 miR-222	2482 miR-494	2482 miR-221
E	2471 miR-221	2471 miR-222	2471 miR-494	2471 miR-221	2472 miR-221	2472 miR-222	2472 miR-494	2472 miR-221	2472 miR-222	2481 miR-221	2481 miR-222	2481 miR-494	2481 miR-221
F	2482 miR-221	2482 miR-222	2482 miR-494	2482 miR-221	2471 miR-221	2471 miR-222	2471 miR-494	2471 miR-221	2471 miR-222	2472 miR-221	2472 miR-222	2472 miR-494	2472 miR-221
G	2481 miR-221	2481 miR-222	2481 miR-494	2481 miR-221	2482 miR-221	2482 miR-222	2482 miR-494	2482 miR-221	2482 miR-222	2471 miR-221	2471 miR-222	2471 miR-494	2471 miR-221
H	2472 miR-221	2472 miR-222	2472 miR-494	2472 miR-221	2481 miR-221	2481 miR-222	2481 miR-494	2481 miR-221	2481 miR-222	2482 miR-221	2482 miR-222	2482 miR-494	2482 miR-221

Fig. 28 Plantilla de estudio de placa de 96 pocillos, donde se indica el número de caso, tipo de tejido y el miRNA a estudiar. Podemos observar que por cada placa se pueden estudiar 6 casos completos (1 caso=16 pocillos utilizados).

Se seleccionan los primers para el estudio de cada miRNA diana (según el sistema miScript Primer Assay). En todos los casos, se seleccionan primers para detectar la forma madura de los microRNAs (miScript Primer Assay, Operon, QIAGEN®).

→ **miRNA-221 (Hs\_miR-221\_1; hsa\_miR-221-3p)**. Secuencia del miRNA:  
agcuacauugucugcuggguuc

→ **miRNA-222 (Hs\_miR-222\_2; hsa\_miR222-3p)**. Secuencia del miRNA:  
agcuacaucuggcuacugggu

→ **miRNA-494 (hsa\_miR-494)**. Secuencia del miRNA:  
ugaaacauacacgggaaaccuc

→ **miRNA-RNU6B (Hs\_RNU6B-2\_1)**. Control incluido en el kit de casa comercial miScript Primer Assay, Operon, QIAGEN©. Se utilizan controles que amplifiquen snRNAs o snoRNAs (small nuclear o nucleolar, respectivamente). Se trata de RNAs no codificantes constituidos por 60-300 nucleótidos y que se encuentran altamente expresados. En nuestro caso, RNU6B (snRNU-6 o small nuclear RNU6), es la unidad U6 del spliceosoma, la maquinaria molecular implicada en el splicing del mRNA, y se considera uno de los más idóneos para el estudio de cuantificación de miRNAs a partir de muestras parafinadas (128-129).

Este estudio se realiza con el **kit miScript PCR System**, teniendo en cuenta diferentes parámetros:

→ estudio de expresión con el sistema  $\Delta\Delta Ct$ , que necesita la comprobación de las eficiencias de amplificación de los primers de los diferentes miRNAs a estudio.

→ primers específicos para la amplificación de cada miRNA (221, 222, 494 y el RNA control).

→ fluorocromo **SYBR Green**. Este fluorocromo se incorpora intercalándose en la doble cadena de DNA que se sintetiza en la PCR, y por tanto NO es específico de cada producto (a diferencia de las sondas TaqMan, que sí lo son).

Por este motivo, es necesario añadir un paso a la PCR de Temperatura de Melting ( $T_m$ ), que utilizamos como control de especificidad. Este paso consiste en que al acabar la PCR, se desnaturaliza y renaturaliza el producto de cada PCR, que provoca una curva de disociación y rehibridación de cada producto con una temperatura de melting específica para cada molécula (**Fig.29**). La  $T_m$  de los miRNAs se sitúan típicamente entre 74-77° C, de modo que permite detectar si se amplifica más de un producto o existen amplificaciones inespecíficas.

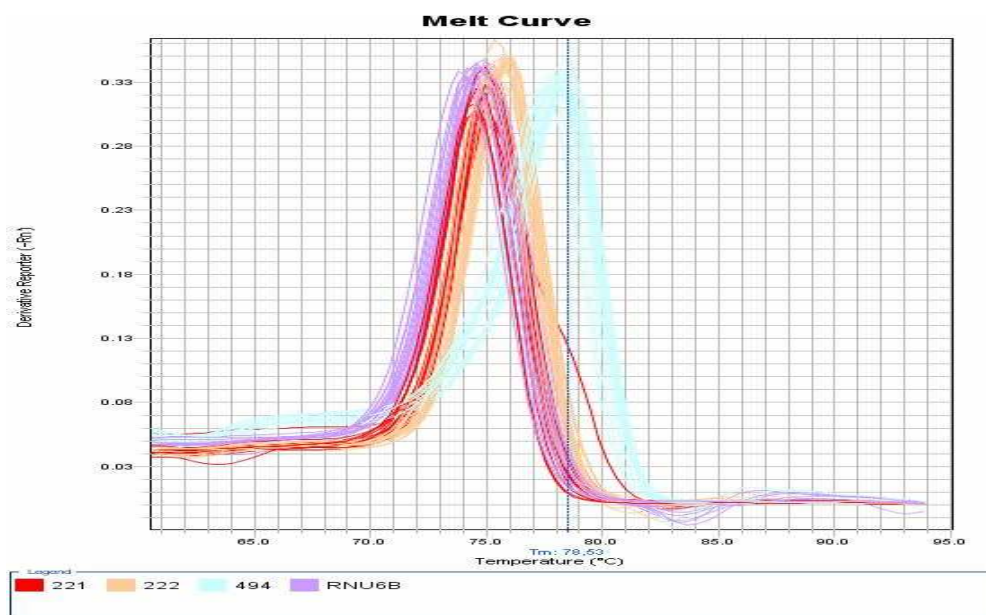


Fig. 29 Curvas de melting de la PCR .

A continuación se realiza el estudio de cada caso por RT-PCR. El aparato de Real-Time PCR donde se cargan las muestras es un **Applied BioSystems 7500**. Se analizan las muestras según los parámetros indicados por el fabricante (miScript PCR System, QIAGEN).

**Tabla.13** Para cada muestra se prepara la PCR según las condiciones del sistema:

Component	Volume/reaction (96-well)	Final conc.
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix*	25 $\mu$ l	1x
10x miScript Universal Primer	5 $\mu$ l	1x
10x miScript Primer Assay	5 $\mu$ l	1x
RNase-free water	Variable	-
Template cDNA (added at step 3) <sup>†</sup>	$\leq$ 5 $\mu$ l	1-3 ng/ reaction
<b>Total volume</b>	<b>50 <math>\mu</math>l</b>	-

En la reacción de PCR el **Primer Universal** es el que hibridará sobre la región 3' del RNA (es común a todos los miRNAs, debido a que en la retrotranscripción hemos añadido con la cola poliA una secuencia conocida

como **Universal tag**, que hibridará con el Primer Universal (**Tabla.17**) y por tanto, el primer es válido para todas las secuencias a analizar.

El otro primer utilizado (**Primer Assay**) es el específico de cada miRNA a amplificar.

En cada placa es necesario realizar PCRs con controles negativos (PCRs con RNAs sin retrotranscribir) y blancos (PCRs sin muestra) para comprobar la no amplificación de productos no eliminados en la extracción de miRNAs (pueden interferir en la PCR) y la no contaminación al preparar la PCR, respectivamente.

e) Interpretación de los resultados de RealTime-PCR.

Una vez realizadas las reacciones en el aparato **Applied BioSystems 7500**, se recogen los resultados y se analizan con el software **7500 Software v2.0.4**. En cada caso, después de programar en el software (Plate Set-up) cada muestra en su coordenada o pocillo de la placa correspondiente, obtenemos un Ct o crossing point.

En este momento hay que programar el software (Ct settings y Relative Quantitative Settings) para conseguir que en cada caso, realice el análisis  $\Delta\Delta Ct$  obteniendo el valor  $\Delta\Delta Ct$ , y a nivel de expresión, el valor RQ ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) que expresa el valor de expresión del RNA diana normalizado a la muestra.

A nivel de fórmulas, el cálculo que se realiza en las muestras es:

$$\Delta Ct = Ct(\text{miRNA diana}) - Ct(\text{RNA control endógeno})$$

El valor  $\Delta Ct$  determina la diferencia entre el valor Ct del RNA diana y el valor Ct del RNA control endógeno. A partir de estos valores se calcula el valor  $\Delta\Delta Ct$ :

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{tejido tumoral}) - \Delta Ct (\text{tejido sano})$$

El valor  $\Delta\Delta Ct$  normalizado se calcula como  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (valor RQ). Este es el valor que nos indica el cambio de expresión de nuestro miRNA. Por ejemplo, un RQ (también expresado como “fold change”) de 0.15 en una muestra indicaría una expresión de 0.15 en nuestro tejido a estudio (tumor)

versus la expresión control (tejido sano) o, expresado como un descenso de expresión del 85%.

## **6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO:**

Para evaluar la veracidad de las hipótesis de trabajo, los datos obtenidos se han analizado con el software estadístico SPSS (IBM-SPSS-Statistics, versión v.21).

Se realiza:

- estadística descriptiva de variables cuantitativas continuas, determinando la media, mediana, desviación estándar y rango de cada una de ellas, representadas en forma de histogramas. Análisis de frecuencias de las variables cualitativas estudiadas.
- estadística inferencial. Se han utilizado pruebas paramétricas para la comparación de variables cuantitativas, cuando los datos estudiados siguen una distribución normal y la muestra estudiada es grande ( $n > 30$ ); y pruebas no paramétricas para el estudio de variables cuantitativas y cualitativas ordinales o nominales, cuando los datos estudiados no cumplen criterios para aplicar pruebas paramétricas. Se han considerado diferencias estadísticamente significativas las que muestran un valor de  $p < 0,05$ .

Las pruebas estadísticas aplicadas han sido las siguientes:

Pruebas paramétricas:

- Test  $t$  de Student para comparar las medias de dos variables cuantitativas y decidir si la diferencia entre éstos parámetros es estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) o si sólo son diferencias aleatorias.
- Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) de Pearson como prueba de asociación o dependencia entre dos variables cualitativas.
- Test exacto de Fisher: permite analizar si dos variables dicotómicas están asociadas cuando la muestra a analizar no cumple las condiciones adecuadas para aplicar el test Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) de Pearson.

- Análisis de la varianza ANOVA: utilizada para comparar medias de una variable con tres o más niveles.

Pruebas no paramétricas:

- Prueba  $U$  de Mann-Whitney para comparar las medias de dos variables cuantitativas independientes
- Kruskal-Wallis: cuando no se cumplen las condiciones de aplicación de ANOVA.

Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier: para los eventos éxitos por cualquier causa (supervivencia global), éxitos asociado a la enfermedad (supervivencia específica) y metástasis (supervivencia libre de recurrencia). Se ha usado la prueba del log-rango para las comparaciones entre grupos.

Este trabajo tiene la aceptación del Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC), de la Corporació Sanitària Parc Taulí.

## **RESULTADOS**





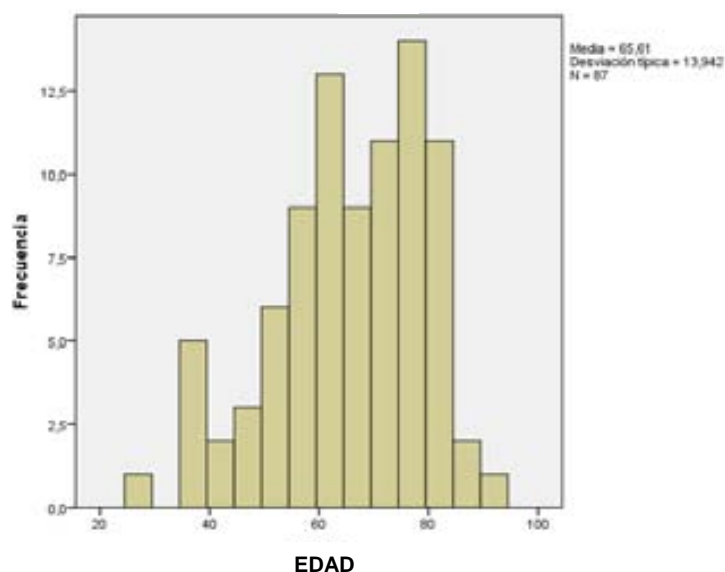
## 1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE DATOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS:

### Sexo:

De los 87 GISTs estudiados, 40 casos se presentan en mujeres (46%) y 47 casos en hombres (54%).

### Edad:

El rango de edad se encuentra entre los 27 y 90 años, con una media de 65,61 años (DE= 13,942) y mediana de 67, tal y como refleja el histograma.



Los GIST, en nuestra serie, se distribuyen con más frecuencia en el intervalo comprendido entre los 51 y los 80 años (**Tabla.14**).

**Tabla. 14:** Distribución por grupos de edad

Edad (años)	Nº Casos	Porcentaje %
20-30	1	1,14
31-40	5	5,74
41-50	7	8,04
51-60	16	18,39
61-70	21	24,13
71-80	24	27,58
81-90	13	14,94

### **Síntomas de presentación:**

Se conocen los síntomas de presentación en 70 casos. Fue un hallazgo incidental en 16 casos (22,9%). El síntoma más frecuente de debut fue hemorragia digestiva (incluyendo melenas, hemorragia digestiva alta y rectorragia) en 23 casos (32,9%), dolor abdominal o epigastralgia en 11 casos (15,7%) y clínica de suboclusión intestinal en 5 casos (7,1%) (Fig.30). Entre los síntomas menos frecuentes destacan: síndrome tóxico (1), tenesmo (1), abdomen agudo (1), isquemia intestinal (1) y hemoperitoneo (1).

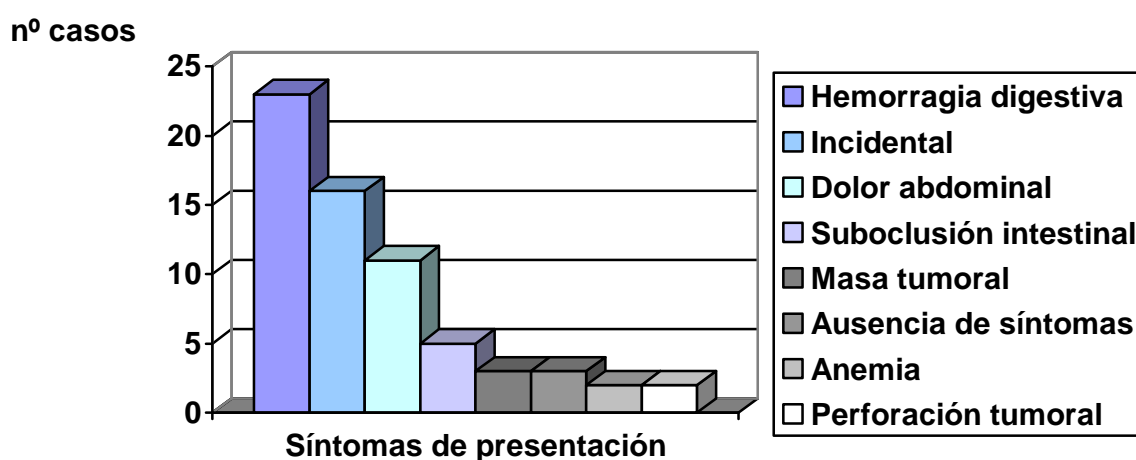


Fig. 30 Gráfico de distribución de los síntomas de presentación.

### **Localización tumoral:**

De los 87 casos de GIST, 40 casos se localizaron en intestino delgado (46%), 37 casos en estómago (42,5%), 5 casos a nivel colorectal (5,74%), y 5 casos fueron extragastrointestinales (5,74%), concretamente localizados en retroperitoneo (3), epiplón (1) y pelvis (1) (Fig.31).

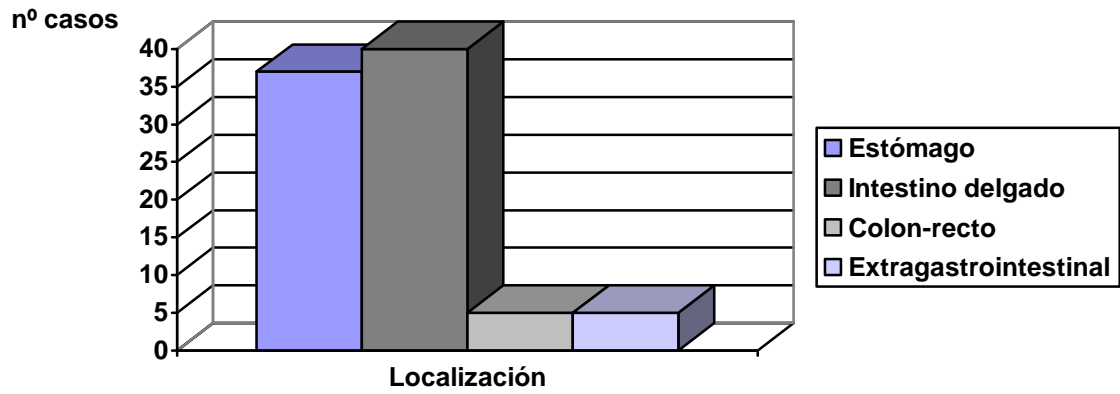
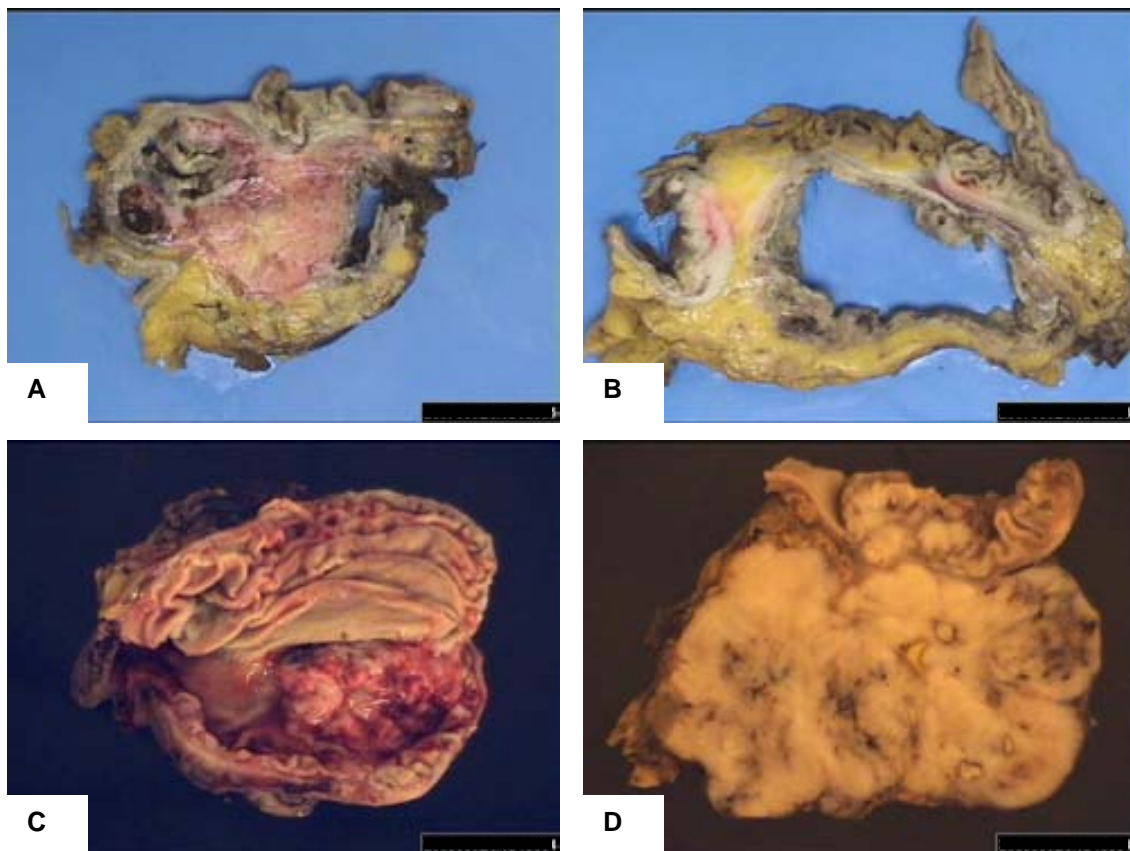
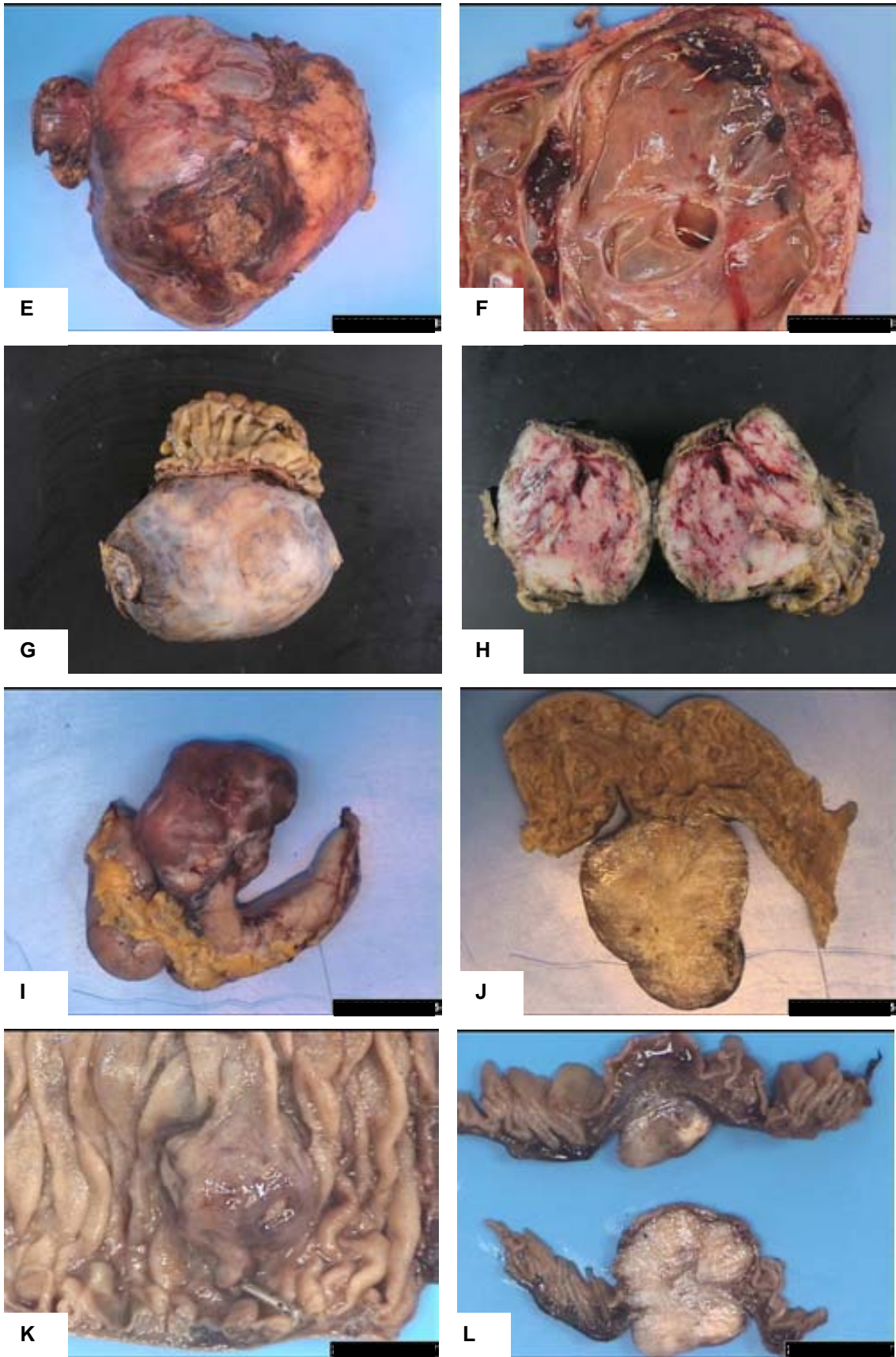


Fig. 31. Gráfico de distribución según la localización tumoral.

A continuación mostramos fotografías macroscópicas de algunos de los casos de nuestra serie (Fig.32):

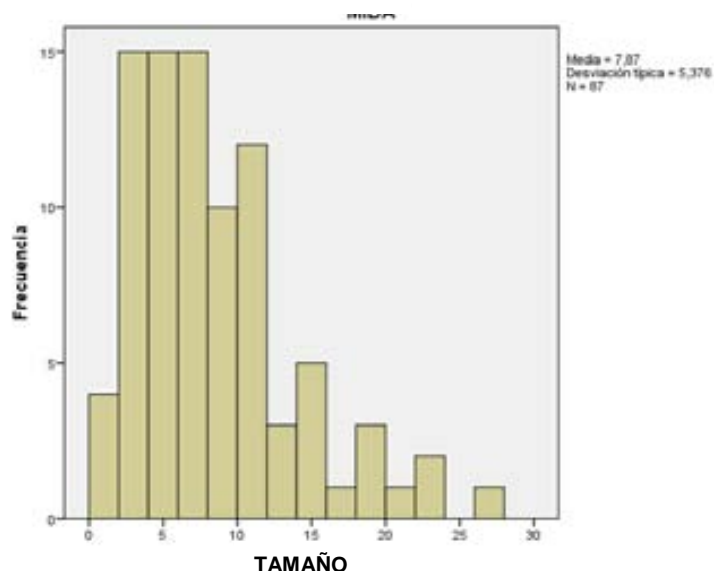




**Fig. 32.** Macrofotografías de los GISTs de nuestra serie: (A-B) GIST con adenocarcinoma de colon sincrónico; (C-D) tumor con crecimiento en “reloj de arena” que ulcera extensamente la mucosa; (E-J) tumores con crecimiento mural; (K-L) tumor que ulcera focalmente la mucosa, con crecimiento en “reloj de arena”.

### **Tamaño tumoral:**

El tamaño, junto con el número de mitosis y la localización, es un parámetro importante para valorar y establecer el riesgo pronóstico. En nuestra serie, el rango de tamaño tumoral se encuentra entre 1 y 26 cm, con una media de 7,87 cm (DE=5,376) y mediana de 6 cm., tal y como refleja el histograma.



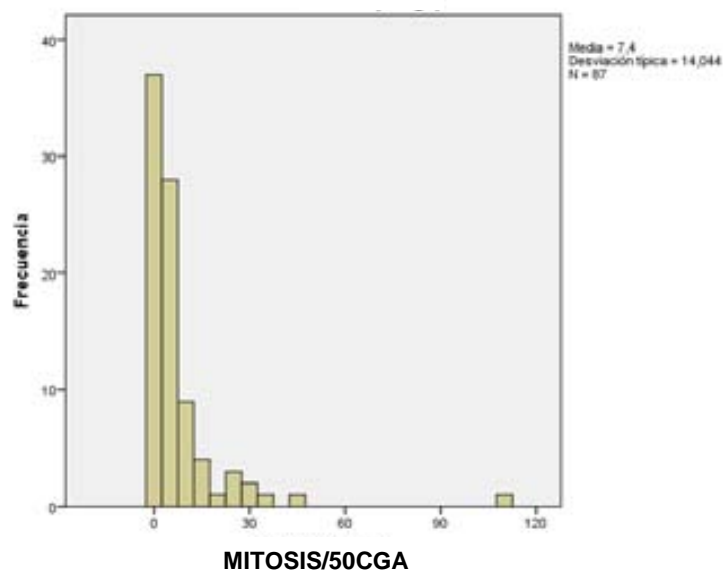
Siguiendo la clasificación de Miettinen, en función del tamaño, los GISTs, en nuestra serie, se distribuyen con más frecuencia en el intervalo comprendido entre  $>5 \leq 10$  cm (Tabla.15).

**Tabla. 15:** Distribución por grupos de tamaño

Tamaño(cm)	Nº Casos	Porcentaje %
$\leq 2$	10	11,5
$>2 \leq 5$	24	27,5
$> 5 \leq 10$	32	36,7
$> 10$	21	23,8

### **Recuento mitótico:**

En el recuento de mitosis en 50 campos microscópicos de gran aumento se obtuvo una media de 7,40 mitosis/50CGA, una mediana de 3, y un rango de 0-110 mitosis/50CGA, tal y como refleja el histograma.



Siguiendo la clasificación de Miettinen, en función del número de mitosis/50 CGA, los GISTs, en nuestra serie, se distribuyen con más frecuencia en el intervalo  $\leq 5$ /CGA (Tabla.16).

**Tabla. 16:** Distribución por grupos de recuento mitótico.

Mitosis (50 CGA)	Nº Casos	Porcentaje %
$\leq 5$	60	68,9
$> 5$	27	30,4

**Grupos de riesgo pronóstico:**

Todos los casos incluidos en la serie se han clasificado según los criterios de NIH-Fletcher 2001 y NCCN-Miettinen 2006.

Siguiendo los criterios de Fletcher nuestros casos se distribuyen de la siguiente manera (Tabla.17): 5 casos cumplen criterios de Muy Bajo Riesgo (5,7%), 23 casos de Bajo Riesgo (26,4%), 24 casos de Riesgo Intermedio (27,6%) y 35 casos de Alto Riesgo (40,2%).

**Tabla.17** Clasificación grupos de riesgo según criterios Fletcher

Índice mitótico (50CGA)**	Tamaño*	Grupo de riesgo: n (%)
<5 mitosis	<2 cm	MBR: 5 (5,7%)
<5 mitosis	2-5 cm	BR: 23 (26,4%)
6-10 mitosis	<5 cm	RI: 24 (27,6%)
<5 mitosis	5-10 cm	
>5 mitosis	>5 cm	AR: 35 (40,2%)
Cualquier índice	>10 cm	
> 10 mitosis	Cualquier tamaño	

Siguiendo los criterios de Miettinen nuestros casos se distribuyen de la siguiente manera (**Tabla.18**): 15 casos cumplen criterios de Muy Bajo Riesgo (18,3%), 19 casos de Bajo Riesgo (23,2%), 19 casos de Riesgo Intermedio (23,2%) y 29 casos de Alto Riesgo (35,4%). Al grupo de Alto Riesgo hay que añadir los 5 casos con localizaciones extraintestinales (5,7%), en los que la localización no modifica su riesgo, calculado en función del tamaño y número de mitosis.

**Tabla.18** Clasificación grupos de riesgo según criterios Miettinen.

Índice mitótico (50 CGA)	Tamaño	Estómago	Intestino delgado	Intestino grueso	Otras localizaciones
≤ 5 mitosis	≤2 cm	MBR: 15 (18,3%)			
	>2 ≤5 cm	MBR	BR: 19 (23,2%)		
	>5 ≤10 cm	BR	RI: 19 (23,2%)		
	>10 cm	RI	AR		
>5 mitosis	≤2 cm	BR	AR	AR	AR
	>2 ≤5 cm	RI	AR	AR	AR
	>5 ≤10 cm	AR: 29 (35,4%)			
	>10 cm				

Cuando comparamos la distribución de los casos de nuestra serie, según se apliquen los criterios de Fletcher o Miettinen, observamos que al clasificar utilizando los criterios de Miettinen aumentan los casos en el grupo de Muy Bajo Riesgo, a expensas de la reclasificación que se produce en el resto de grupos de riesgo, condicionada por la localización (Fig.33).

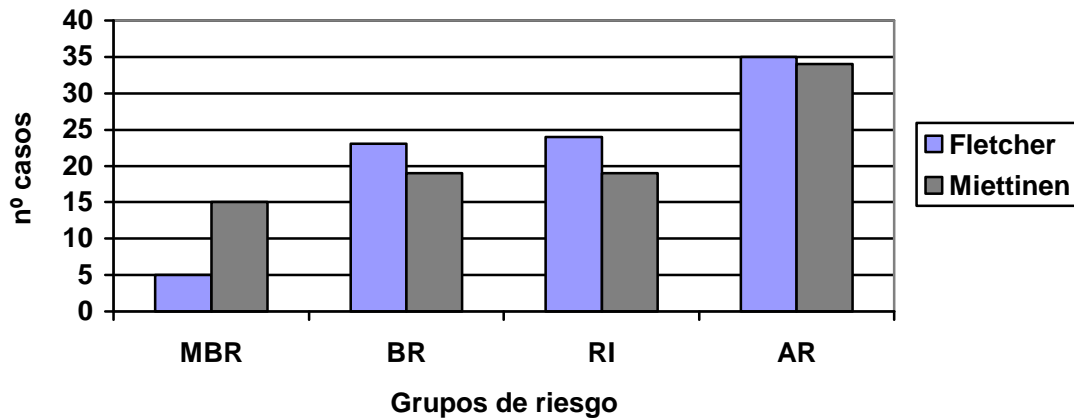
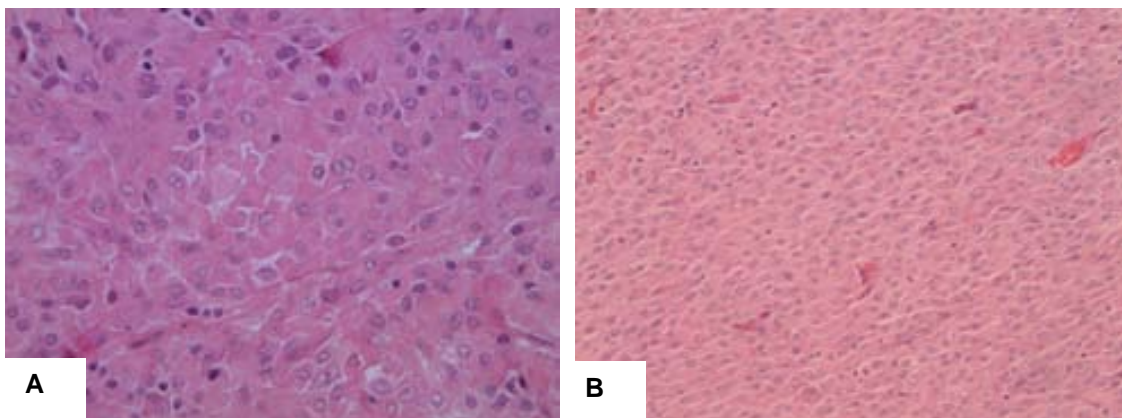


Fig. 33 Gráfico comparativo de la distribución de los grupos de riesgo según criterios de Fletcher y Miettinen (incluidos los 5 casos de localización extraintestinal).

**Tipo histológico:**

Según el aspecto morfológico en nuestra serie predomina el tipo fusocelular, observado en 42 GISTs (48,3%), seguido del tipo mixto en 28 casos (32,2%) y del tipo epitelioide en 17 casos (19,5%) (Fig.34).





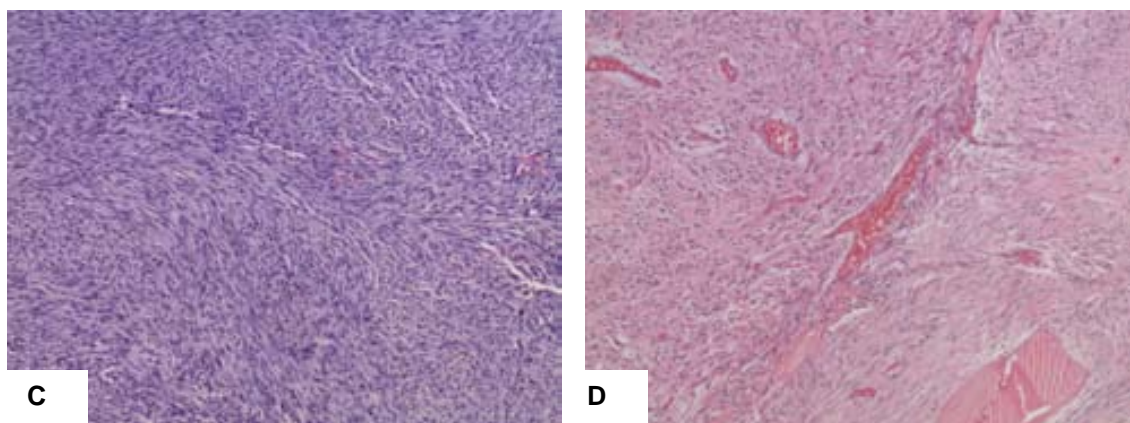


Fig. 34. Diferentes tipos morfológicos (HE): (A y B) epitelioides, (C) fusocelular, (D) mixto

Si representamos en gráfica de barras como se distribuyen los casos, observamos (Fig.35):

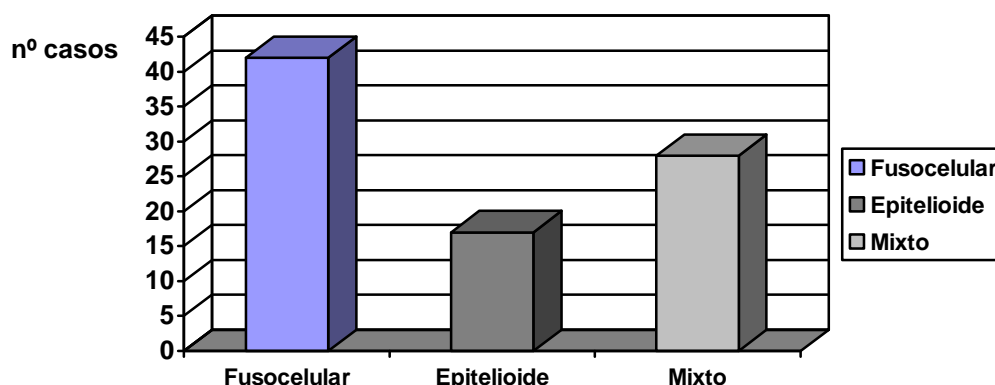


Fig. 35. Gráfico de distribución según los tipos morfológicos.

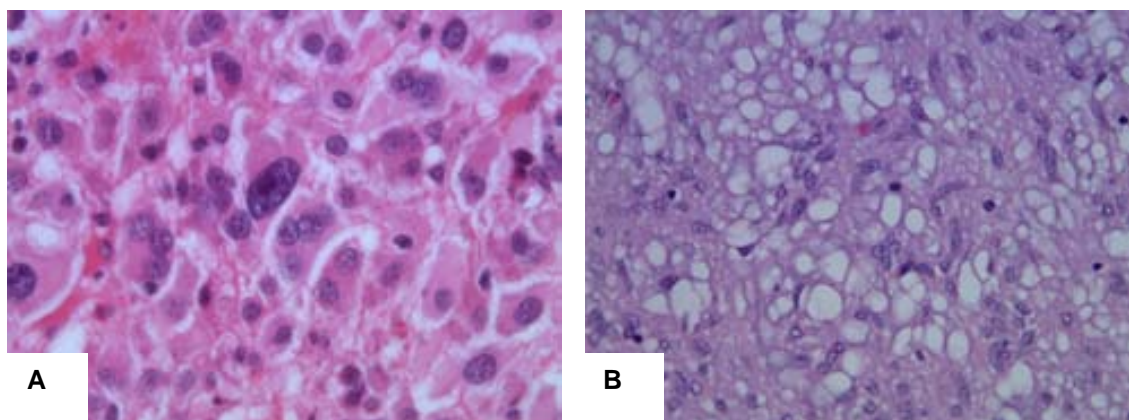
**Otros parámetros histológicos:**

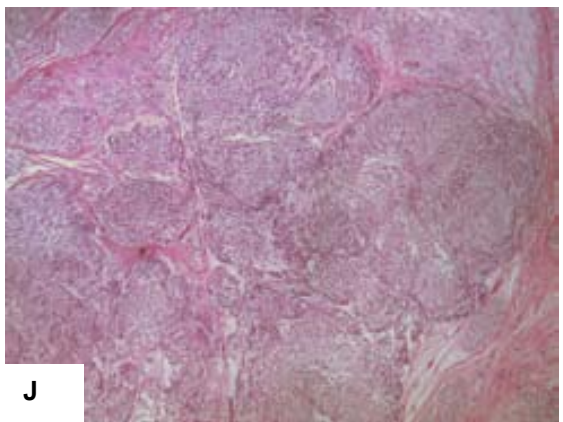
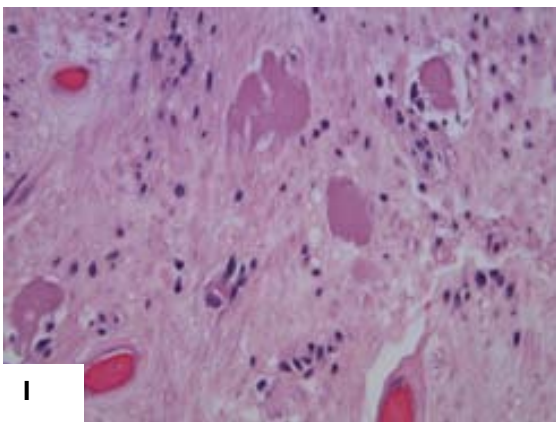
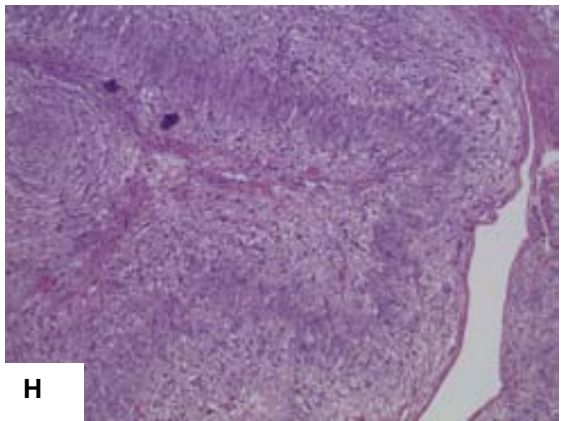
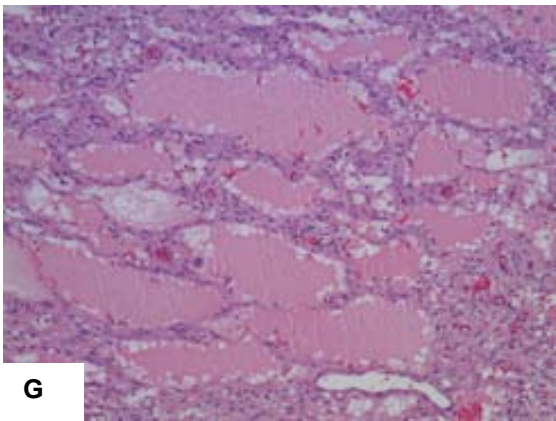
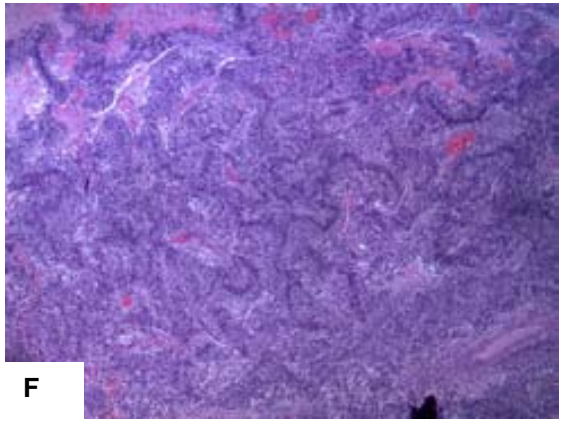
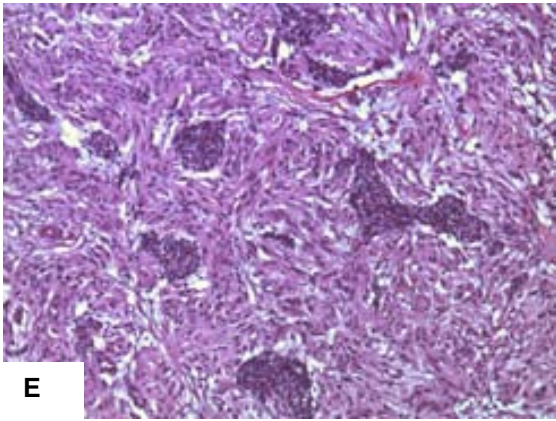
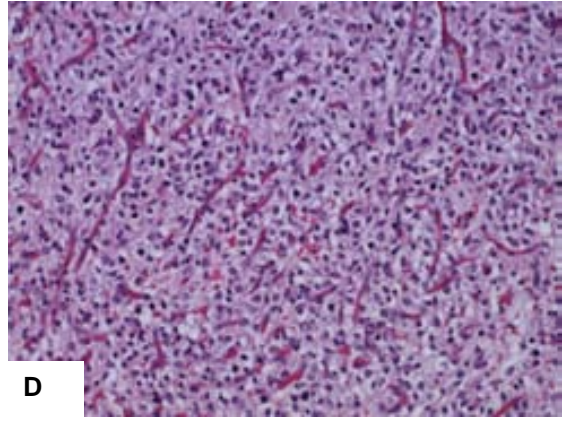
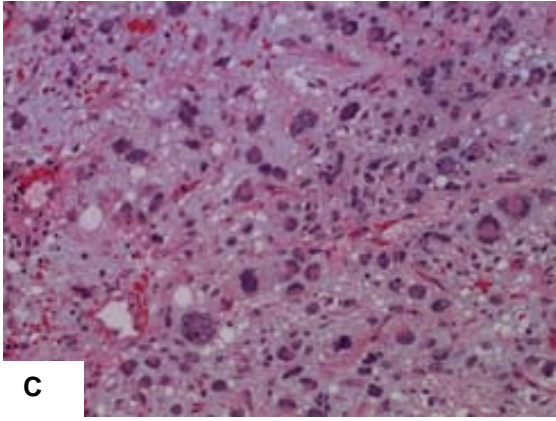
Con respecto a los otros parámetros histológicos valorados, en nuestra serie se ha observado (Tabla.19): ulceración de la mucosa en 24 casos (27,6 %), necrosis en 47 casos (54%), quistificación en 30 casos (34,5 %), presencia de matriz mixoide en 22 casos (25,3 %), vacuolización citoplasmática en 27 casos (31 %), fibras esquenoides en 13 casos (15 %), empalizadas nucleares, tipo schwannoma-like, en 41 casos (47,2 %), vascularización prominente en 72 casos (82,7 %) y atipia en 35 casos (40,2%).

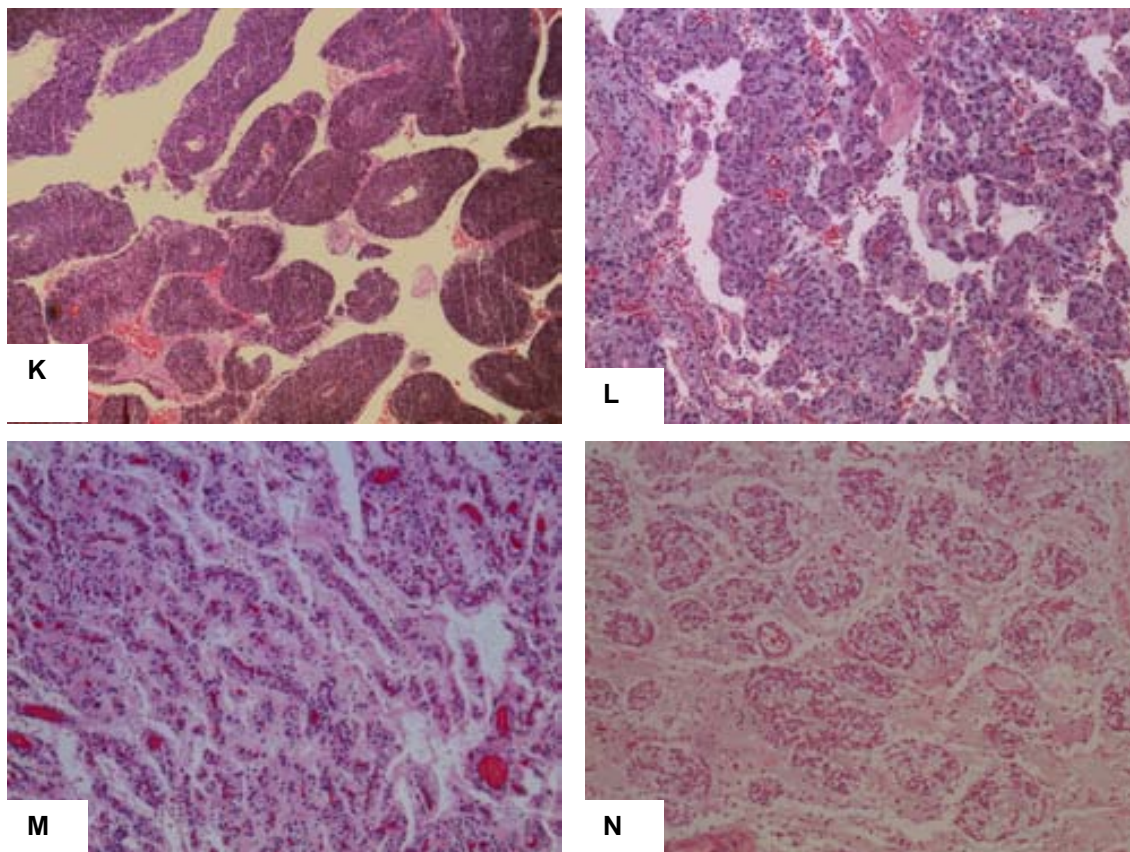
**Tabla.19** Resumen de otros hallazgos histológicos descritos

Parámetro	Nº Casos	Porcentaje %
Ulceración mucosa	24	27,6
Necrosis	47	54
Quistificación	30	34,5
Matriz mixoide	22	25,2
Vacuolización citoplasmática	27	31
Fibras esquenoides	13	15
Empalizadas	41	47,2
Vascularización	72	82,7
Atipia	35	40,2

Tal y como se ha comentado los GISTs pueden presentar distintas morfologías y patrones arquitecturales. A continuación representamos los hallazgos morfológicos observados en nuestra serie (**Fig.36**):







**Fig. 36** Patrones morfológicos y arquitecturales (HE): (A) atipia; (B) vacuolización citoplasmática; (C) células gigantes multinucleadas asociadas a estroma mixoide; (D) células con citoplasma claro asociadas a fina trama vascular; (E) patrón nefroma-like; (F) patrón circinado; (G) patrón edematoso; (H) empalizadas simulando hipocampo; (I) fibras esquenoides; (J) patrón nodular; (K) patrón lobular; (L) patrón glomeruloide; (M) patrón sinusoidal; (N) nidos epitelioides asociados a estroma mixoide.

## 2. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DEL ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO:

Los controles externos e internos asociados a cada caso mostraron un patrón de positividad o negatividad según lo esperado, indicando una correcta optimización de la técnica y de los anticuerpos estudiados.

### **c-kit y CD34:**

c-kit (CD117) ha sido positivo en todos los casos de la serie. En 9 casos (10,3%) la positividad observada fue débil, en 10 casos (11,5%) fue moderada, y en 68 casos (78,2%) fue intensa (**Fig. 37**).

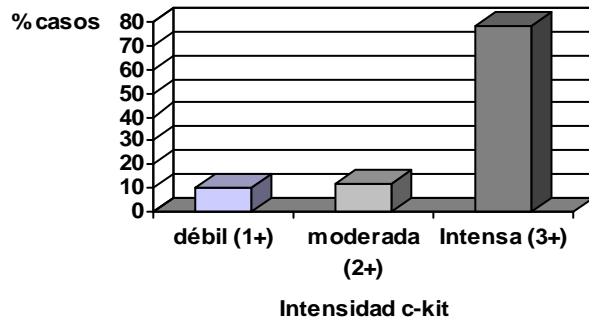


Fig. 37 Gráfico de distribución según la intensidad de c-Kit.

Según el patrón de tinción de c-kit, encontramos casos con patrón de membrana, citoplasmático o de tipo Golgi. Frecuentemente se observan de forma combinada, aunque también se pueden presentar de forma aislada (Fig.38). En nuestra serie 33 casos (37,9%) presentan patrón de tipo Golgi. La positividad fue focal en 13 casos (14,9%) y difusa en 20 casos (22,9%). CD34 fue positivo en 70 casos (80,5%).

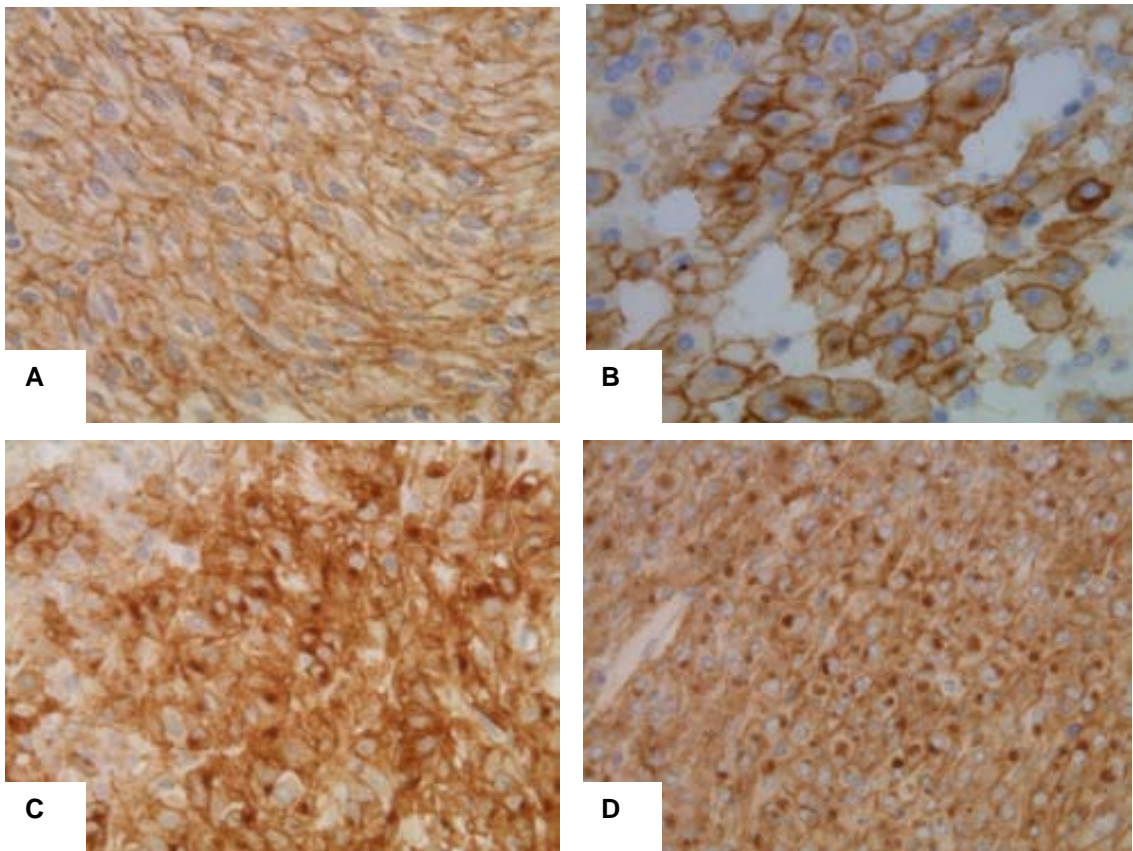


Fig. 38 Patrón de tinción inmunohistoquímica de c-Kit: (A) citoplasma y membrana; (B) membrana y Golgi; (C y D) citoplasma y Golgi.

### **Otros marcadores IHQ:**

La frecuencia de expresión del resto de marcadores inmunohistoquímicos estudiados se describe a continuación (Tabla.20).

**Tabla.20.** Resumen de expresión de marcadores inmunohistoquímicos.

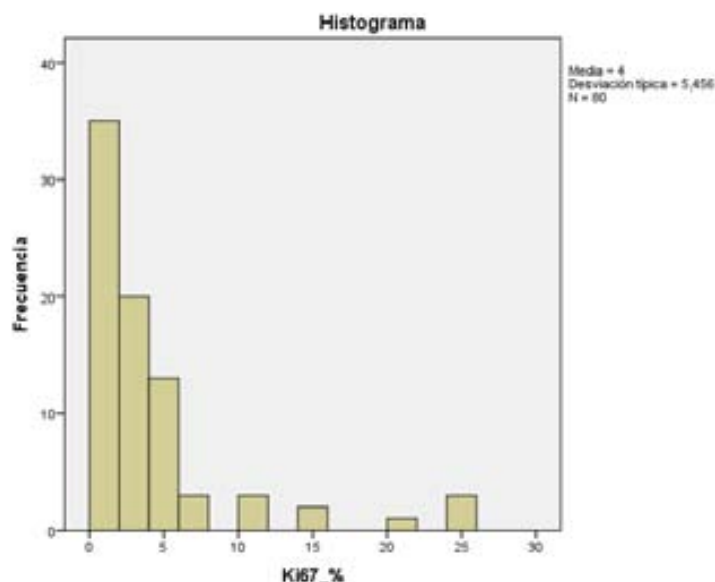
Anticuerpo	Nº Casos	Porcentaje %
Actina	11	12,6
Desmina	8	9,2
Proteína S-100	8	9,2
Enolasa	67	77

### **Índice de proliferación Ki-67:**

La actividad proliferativa la valoramos con el anticuerpo Ki-67, en función del porcentaje (%) de núcleos teñidos.

El rango de expresión de Ki-67 se encuentra entre 1-25%, con una media de 4% ( $\pm$  DE=5,45) y mediana de 2%, tal y como refleja el histograma.

Los GIST, en nuestra serie, se distribuyen con más frecuencia en el intervalo entre 1-2%.



En 7 casos (8%) la tinción fue no valorable (NV) (excluidos del análisis estadístico del porcentaje de expresión de Ki67), 35 casos (40,2%) mostraron

una expresión del 1%, 16 casos (18,4%) del 2%, 17 casos (19,5%) entre 3-5%, y 12 casos (13,6%) una expresión superior al 5% (Fig.39, 40).

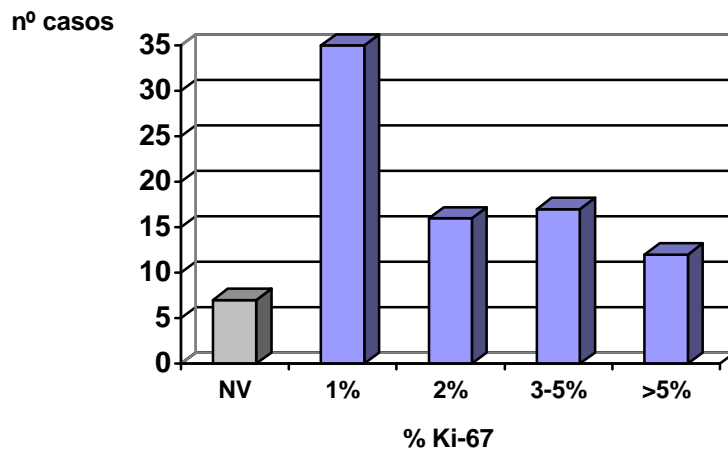


Fig. 39 Gráfico de distribución según el índice de proliferación Ki-67.

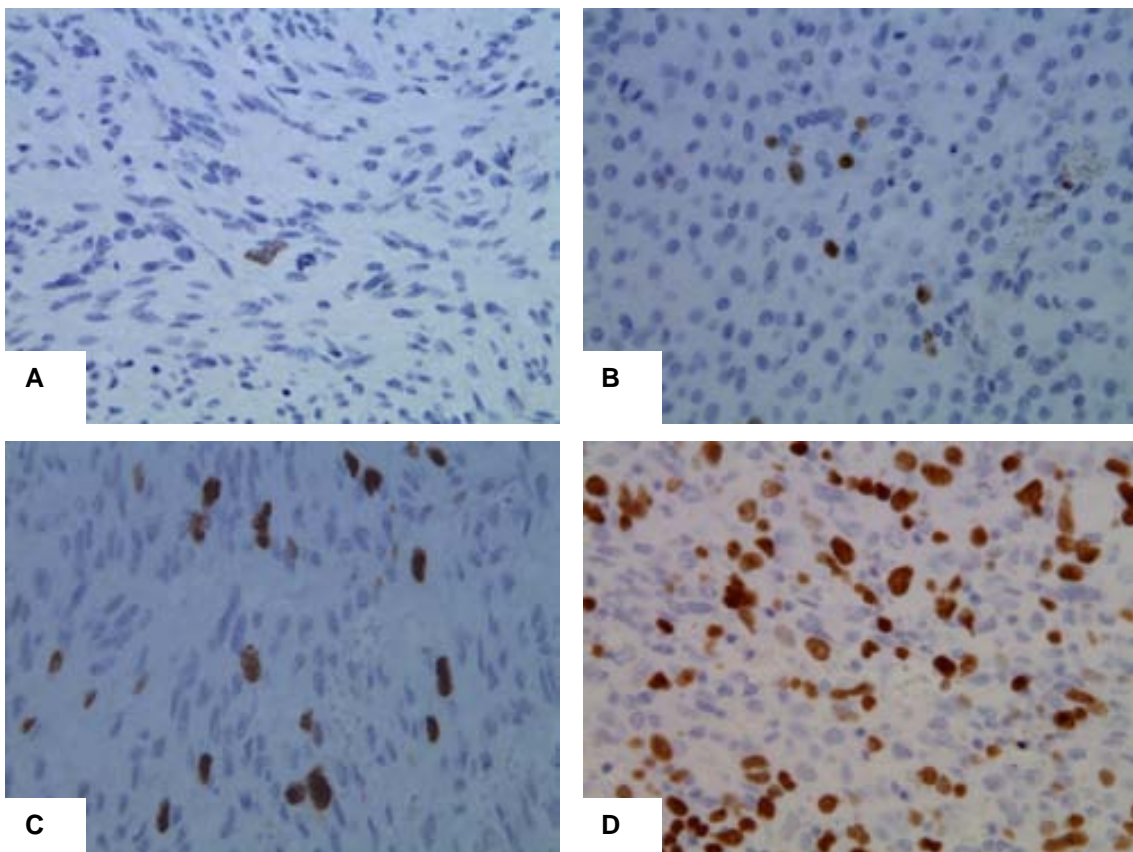


Fig. 40 Ejemplos de índice de proliferación Ki-67: (A) 1%; (B) 5%; (C) 10%; (D): 20%

### 3. ASOCIACIONES ENTRE PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS: LOCALIZACIÓN TUMORAL

#### a) parámetros histológicos:

Los GISTs localizados en estómago presentan matriz mixoide en el 45,9% de los casos y los localizados en intestino delgado en el 10%, esta diferencia es estadísticamente significativa ( $p=0,0001$ ).

Los GISTs localizados en estómago presentan vacuolización citoplasmática en el 51,4% de los casos y los localizados en intestino delgado en el 15%, esta diferencia es estadísticamente significativa ( $p=0,001$ ) (Tabla.21).

**Tabla.21** Asociación entre localización tumoral y parámetros histológicos.

Parámetro histológico	Localización		p*
	Estómago (n=37)	Intestino delgado (n=40)	
Matriz mixoide (sí)	17 (45,9%)	4 (10%)	<0,001
Vacuolización citoplasmática (sí)	19 (51,4%)	6 (15%)	0,001

\*test  $\chi^2$

#### b) tipo histológico:

Los GISTs localizados en intestino delgado se asocian con más frecuencia a morfología de tipo mixto, con respecto a los de localización gástrica ( $p=0,006$ ) (Tabla.22).

**Tabla.22** Asociación entre localización tumoral y tipo histológico.

Tipo histológico	Localización		p*
	Estómago (n=37)	Intestino delgado (n=40)	
Fusocelular	20 (54,1%)	17 (42,5%)	0,006
Epitelioide	11 (29,7%)	4 (10,0%)	
Mixto	6 (16,2%)	19 (47,5%)	

\*test  $\chi^2$



**c) intensidad de tinción inmunohistoquímica para c-kit:**

Los GISTs localizados en intestino delgado se asocian con más frecuencia a tinción con marcada intensidad (3+) de c-kit, con respecto a los de localización gástrica (p=0,016) (Tabla.23).

**Tabla.23** Asociación entre localización tumoral e intensidad de c-kit.

	Localización		p*
	Estómago (n=37)	Intestino delgado (n=40)	
Intensidad tinción de c-kit			
Débil (1+)	5 (13,5%)	3 (7,5%)	0,016
Moderada (2+)	8 (21,6%)	1 (2,5%)	
Marcada (3+)	24 (64,9%)	36 (90%)	

\*test  $\chi^2$

**d) CD34:**

Los GISTs localizados en estómago se asocian con más frecuencia a expresión de CD34, con respecto a los localizados en intestino delgado (p=0,0001) (Tabla.24).

**Tabla.24** Asociación entre localización tumoral y expresión de CD34.

	Localización		p*
	Estómago (n=37)	Intestino delgado (n=40)	
CD34 (sí)	37 (100%)	24 (61,5%)	<0,001

\*test  $\chi^2$

**GRUPOS DE RIESGO**

**a) parámetros histológicos:**

Conforme aumenta el riesgo de los GISTs observamos más tendencia a presentar necrosis (p<0,001).

Los GISTs que presentan con más frecuencia matriz mixoide (p=0,028) y vacuolización citoplasmática (p=0,035) se asocian a Alto Riesgo (Tabla.25).

**Tabla.25** Asociación entre grupos de riesgo y parámetros histológicos.

Parámetro histológico	Criterios 2006				p*
	Muy Bajo Riesgo (n=15)	Bajo Riesgo (n=19)	Riesgo Intermedio (n=19)	Alto Riesgo (n=29)	
Necrosis (sí)	1 (2,4%)	6 (14,3%)	13 (31%)	22 (52,4%)	<0,001**
Matriz mixoide (sí)	3 (14,3%)	3 (14,3%)	2 (9,5%)	13 (61,9%)	0,028
Vacuolización citoplasmática (sí)	6 (23,1%)	3 (11,5%)	3 (11,5%)	14 (53,8%)	0,035

\*test  $\chi^2$

\*\*test asociación lineal por lineal

**b) patrón de tinción inmunohistoquímica para c-kit:**

Conforme aumenta el riesgo de los GISTs observamos más tendencia a expresar tinción de c-kit con patrón de Golgi (p=0,021) (Tabla.26).

**Tabla.26** Asociación entre grupos de riesgo y patrón de c-kit.

Patrón c-kit	Criterios 2006				p*
	Muy Bajo Riesgo (n=15)	Bajo Riesgo (n=19)	Riesgo Intermedio (n=19)	Alto Riesgo (n=29)	
Patrón Golgi (sí)	2 (6,7%)	6 (20%)	8 (26,7%)	14 (46,7%)	0,021**

\*test  $\chi^2$

\*\*test asociación lineal por lineal

**c) CD34:**

Los GISTs con expresión de CD34 tienen tendencia a acumularse en el grupo de Alto Riesgo, aunque no se demuestran diferencias estadísticamente significativas (p=0,091) (Tabla.27).

**Tabla.27** Asociación entre grupos de riesgo y expresión de CD34.

	Criterios 2006				p*
	Muy Bajo Riesgo (n=15)	Bajo Riesgo (n=19)	Riesgo Intermedio (n=18)	Alto Riesgo (n=29)	
CD34 (sí)	15 (22,7%)	15 (22,7%)	14 (21,2%)	22 (33,3%)	0,091

\*test  $\chi^2$

**d) índice de proliferación Ki-67:**

Los GISTs del grupo de Alto Riesgo presentan expresión elevada de Ki67 con significación estadística ( $p < 0,001$ ), con una expresión media de 8,04%. Mediante pruebas no paramétricas (Kruskal-Wallis/ *U* de Mann-Whitney) se comparan los grupos de riesgo entre si, y se obtienen diferencias estadísticamente significativas que refuerzan la asociación entre expresión elevada de Ki-67 y el grupo de Alto Riesgo, con respecto a Muy Bajo Riesgo ( $p = 0,001$ ), Bajo Riesgo ( $p < 0,001$ ) y Riesgo Intermedio ( $p = 0,001$ ).

También se observan diferencias al comparar la expresión media de Ki-67 en el grupo de Bajo Riesgo frente al grupo de Riesgo Intermedio (**Tabla.28**) (**Fig.41**).

**Tabla.28** Asociación entre grupos de riesgo y % de expresión de Ki67.

Criterios 2006 (n)	Ki-67% <sup>1,2</sup>
Muy Bajo Riesgo (n=14)	2,14 ± 1,65
Bajo Riesgo (n=16)	1,19 ± 0,40
Riesgo Intermedio <sup>3</sup> (n=19)	2,26 ± 1,69
Alto Riesgo <sup>4</sup> (n=27)	8,04 ± 7,74

1. media ± DE

2. Kruskal-Wallis,  $p < 0,001$

3. Diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,01$ ) con el grupo de bajo riesgo en la comparación 2 a 2 (*U* de Mann-Whitney)

4. Diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ) con todos los grupos en la comparación 2 a 2 (*U* de Mann-Whitney)

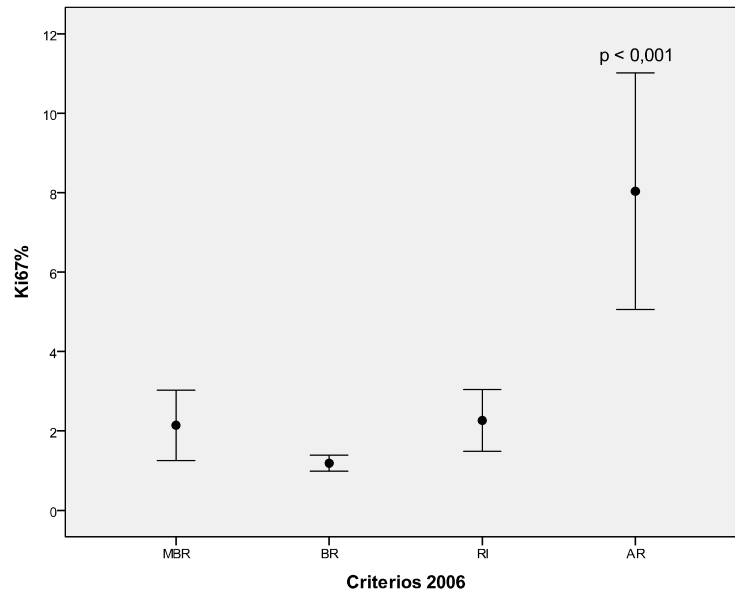


Fig.41 Gráfico de las medias  $\pm$  2x EEM de expresión de KI-67 en cada grupo de riesgo.

## TIPO HISTOLÓGICO

### a) parámetros histológicos:

Los GISTs con morfología epitelioide presentan con más frecuencia matriz mixoide ( $p=0,001$ ) y vacuolización citoplasmática ( $p=0,004$ ), con respecto al resto de tipos histológicos.

Los GISTs con morfología fusocelular presentan con más frecuencia empalizadas nucleares ( $p<0,001$ ), con respecto al resto de tipos histológicos (Tabla.29).

Tabla.29 Asociación entre tipos histológicos y parámetros histológicos.

Parámetro histológico	Tipo histológico			p*
	Fusocelular (n=42)	Epitelioide (n=17)	Mixto (n=28)	
Matriz mixoide (sí)	6 (14,3%)	10 (58,8%)	6 (21,4%)	0,001
Vacuolización citoplasmática (sí)	9 (21,4%)	11 (64,7%)	7 (25%)	0,004
Empalizadas (sí)	32 (76%)	1 (5,9%)	8 (28,6%)	<0,001

\*test  $\chi^2$

**b) intensidad de tinción inmunohistoquímica para c-kit:**

Los GISTs con morfología fusocelular se asocian con más frecuencia a tinción con marcada intensidad (3+) de c-kit ( $p=0,035$ ), con respecto al resto de tipos histológicos, epitelioide y mixto (**Tabla.30**).

**Tabla.30** Asociación entre tipos histológicos e intensidad de c-kit.

Intensidad de c-kit	Tipo histológico			p*
	Fusocelular (n=42)	Epitelioide (n=17)	Mixto (n=28)	
Débil (1+)	2 (4,8%)	2 (4,8%)	38(90,5%)	0,035
Moderada (2+)	4 (23,5%)	4 (23,5%)	9 (52,9%)	
Marcada (3+)	3 (10,7%)	4 (14,3%)	21 (75%)	

\*test  $\chi^2$

**OTROS PARÁMETROS HISTOLÓGICOS**

**a) matriz mixoide:**

Los GISTs que presentan matriz mixoide se asocian con más frecuencia a vacuolización citoplasmática ( $p<0,001$ ) (**Tabla.31**).

**Tabla.31** Asociación entre matriz mixoide y vacuolización citoplasmática.

Matriz mixoide	Vacuolización citoplasmática		p*
	SÍ (n=27)	NO (n=60)	
SÍ	17 (77,3%)	5 (22,7%)	<0,001
NO	10 (15,4%)	55 (84,6%)	

\*test  $\chi^2$

**b) empalizadas nucleares:**

Los GISTs que presentan empalizadas nucleares se asocian con más frecuencia a atipia nuclear ( $p=0,048$ ) (**Tabla.32**).

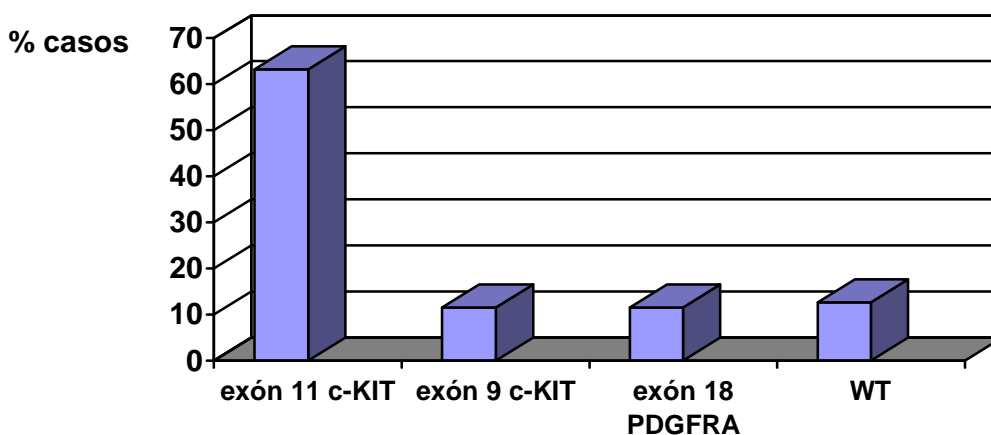
**Tabla.32** Asociación entre empalizadas y atipia.

Empalizadas	Atipia		p*
	SÍ (n=35)	NO (n=52)	
SÍ	21 (51,2%)	20 (48,8%)	0,048
NO	14 (30,4%)	32 (69,6%)	

\*test  $\chi^2$

#### 4. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE MUTACIONES EN *C-KIT* Y *PDGFRA*:

En nuestra serie encontramos 65 casos (74,7%) que presentan mutación del gen *c-KIT*, 11 casos (12,6%) con mutación en el gen *PDGFRA* y 11 casos (12,6%) WT para las mutaciones estudiadas (Tabla.33). En función del exón mutado los casos se distribuyen de la siguiente manera: 55 casos (63,2%) con mutación en el exón 11 de *c-KIT*, 10 casos (11,5%) en el exón 9 de *c-KIT*, 1 caso en el exón 12 de *PDGFRA* y 10 casos (11,5%) en el exón 18 de *PDGFRA*, tal y como se detalla en el siguiente gráfico (Fig.42).



**Fig.42** Distribución de las mutaciones según el exón afectado.

**Tabla.33** Mutaciones recogidas en la serie

Nº Caso	Localización	Grupo de Riesgo	Exón 9 c-KIT	Exón 11 c-KIT	Exón 12 PDGFRA	Exón 18 PDGFRA	BRAF	Mutaciones
1	ID	BR	Mutado					p.A503_Y504dup
2	ID	AR		Mutado				p.Q556_I573del
3	estómago	BR			Mutado			p.S566_E571del
4	ID	BR		Mutado				p.L576P
5	ID	AR		Mutado				p.M553_Y554delinsN
6	ID	AR	Mutado					p.A503_Y504dup
7	ID	BR		Mutado				p.M552_E554delinsK
8	estómago	BR		Mutado				p.D579del
9	ID	RI		Mutado				p.M552_W557del
10	ID	RI		Mutado				p.K550_W558delinsR
11	ID	RI		Mutado				p.V555_I571del
12	ID	RI		Mutado				p.L576P
14	ID	BR	WT	WT	WT	WT	WT	WILD TYPE
15	estómago	MBR	WT	WT	WT	WT	WT	WILD TYPE
16	estómago	BR				Mutado		p.D842V
17	estómago	BR		Mutado				p.Y553S+W557C+K558N
18	estómago	MBR				Mutado		p.D842V
19	ID	RI		Mutado				p.P551del
20	ID	AR		Mutado				p.W557R
21	ID	AR		Mutado				p.L576P
22	ID	RI		Mutado				p.W557_K558del
23	IG	AR		Mutado				p.K550_V555delinsL
24	estómago	MBR		Mutado				p.V560G
25	ID	BR		Mutado				p.I563_T574delinsTP
26	ID	AR		Mutado				p.V559del
27	estómago	MBR				Mutado		p.D842V
28	estómago	MBR		Mutado				p.L576P
29	IG	AR		Mutado				p.591_592insVYDHKWEFPRNRLS
30	IG	AR	WT	WT	WT	WT	WT	WILD TYPE
31	EGI	AR				Mutado		p.D842Y
32	EGI	AR		Mutado				p.W557G
33	IG	AR		Mutado				p.W557_K558del
34	ID	BR		Mutado				p.P551_E555delinsQ
35	estómago	AR		Mutado				p.M552_V559delinsI
36	ID	RI		Mutado				p.V559del
37	EGI	AR				Mutado		p.D842V
38	estómago	MBR				Mutado		p.D842V
39	ID	AR		Mutado				p.V560_L576del
40	estómago	MBR				Mutado		p.D842V
41	estómago	MBR		Mutado				p.M552_Y553delinsN
42	ID	BR		Mutado				p.V560E
43	estómago	RI				Mutado		p.D842_H845del
44	ID	AR		Mutado				p.P551_W557delinsR
45	ID	RI	Mutado					p.A503_Y504dup
46	ID	RI	Mutado					p.A503_Y504dup

Nº Caso	Localización	Grupo de Riesgo	Exón 9 c-KIT	Exón 11 c-KIT	Exón 12 PDGFRA	Exón 18 PDGFRA	BRAF	Mutaciones
47	EGI	AR		Mutado				p.P551_E554del
48	ID	BR		Mutado				p.T574_H580del
49	ID	RI		Mutado				p.W557_K558delinsE
50	ID	RI		Mutado				p.D572_P573dup
51	estómago	RI		Mutado				p.L576_D579dup
52	ID	AR	Mutado					p.A503_Y504dup
53	ID	AR	Mutado					p.A503_Y504dup
54	estómago	MBR		Mutado				p.Y578_D579dup
55	ID	RI	WT	WT	WT	WT	WT	WILD TYPE
56	ID	RI	WT	WT	WT	WT	WT	WILD TYPE
57	estómago	RI	WT	WT	WT	WT	WT	WILD TYPE
58	estómago	MBR		Mutado				p.V560D
59	IG	BR		Mutado				p.E554_K558del
61	estómago	AR		Mutado				p.D579del
62	estómago	AR	Mutado					p.A503_Y504dup
63	estómago	AR		Mutado				p.E554_K557del
64	estómago	BR		Mutado				p.W557R
65	ID	AR		Mutado				p.V569_L576del
66	ID	AR		Mutado				p.K550_K558del
67	estómago	AR	WT	WT	WT	WT	WT	WILD TYPE
68	estómago	AR	WT	WT	WT	WT	WT	WILD TYPE
69	estómago	MBR		Mutado				p.M552_V559delinsI
70	estómago	AR				Mutado		p.D842V
71	estómago	MBR		Mutado				p.W557_K558del
73	estómago	AR		Mutado				p.P551_E554del
74	ID	AR	Mutado					p.A503_Y504dup
75	ID	RI		Mutado				p.V560D
76	estómago	MBR	WT	WT	WT	WT	WT	WILD TYPE
77	estómago	AR		Mutado				p.P551_E554del
78	estómago	MBR	WT	WT	WT	WT	WT	WILD TYPE
79	estómago	RI		Mutado				p.W557_K558del
80	ID	BR		Mutado				p.E554_Q556delinsV
81	estómago	BR	WT	WT	WT	WT	WT	WILD TYPE
82	estómago	AR				Mutado		p.D842V
83	ID	AR		Mutado				p.D579del
84	ID	BR		Mutado				p.V559A
85	EGI	AR		Mutado				p.Y553_Q556del
86	ID	BR	Mutado					p.A503_Y504dup
87	estómago	RI	Mutado					p.A503_Y504dup
88	estómago	BR		Mutado				p.V560D
89	ID	AR		Mutado				p.D579del
90	estómago	MBR		Mutado				p.V560del

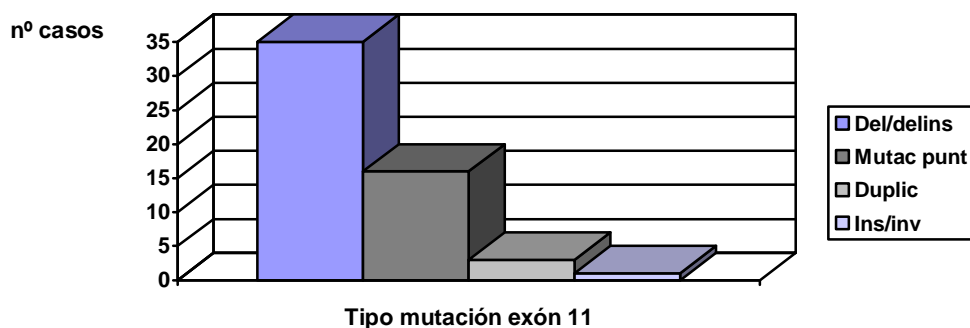


## 5. ASOCIACIONES ENTRE MUTACIONES Y PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS:

### MUTACIONES EN EL EXÓN 11 DE *c-KIT*

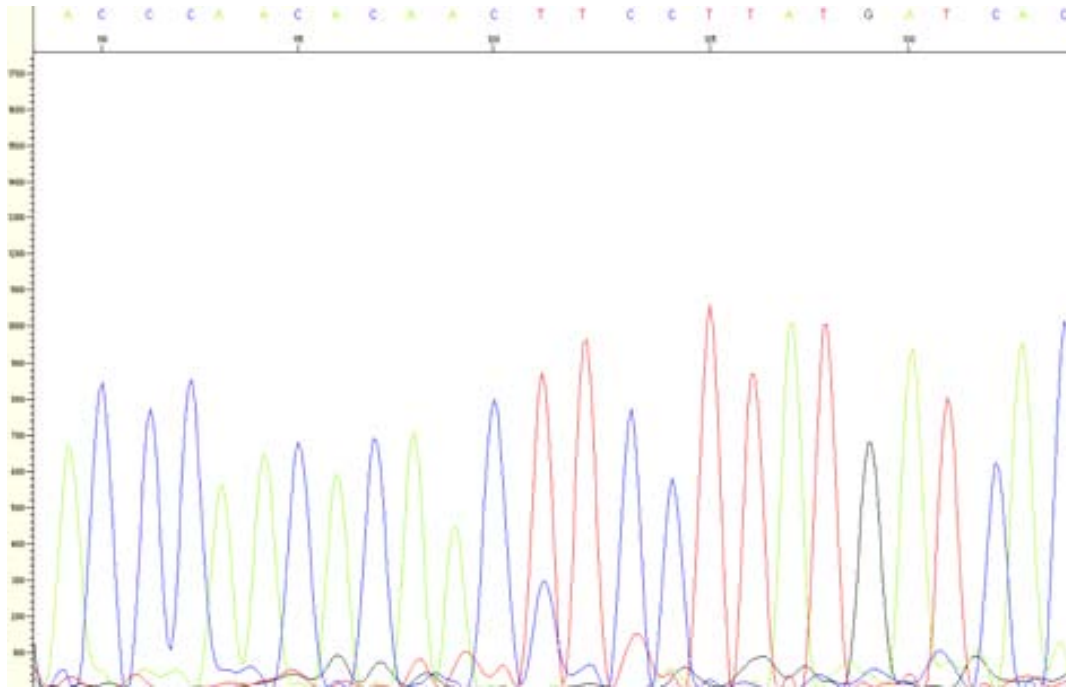
En los 55 casos que presentan mutación en el exón 11 encontramos los siguientes tipos de mutaciones (**Fig.43**): 35 casos (63,6%) presentan deleciones/deleciones-inserciones (del/indel), 16 casos (29,1%) mutaciones puntuales, 3 casos (5,5%) duplicaciones y 1 caso (1,8%) inserción/inversión.

La mutación se localiza en la región hot-spot, entre los codones 557-559, en 12 casos (21,8%).



**Fig.43** Distribución de los tipos de mutación en el exón 11.

Según el tipo de mutación concreta, tal y como se puede observar en la tabla de resultados detallada al principio (**Tabla.33**), se trata de un grupo de mutaciones heterogéneo, en el que destacan con más frecuencia las siguientes: W557\_K558del en 4 casos, D579del en 4 casos, L576P en 4 casos (**Fig.44**), P551\_E554del en 3 casos, V560D en 3 casos, W557R en 2 casos, V559del en 2 casos y M552\_V559delins en 2 casos. El resto de mutaciones se producen de forma aislada.



**Fig.44** Secuencia del exón 11 del gen *C-KIT* en uno de los casos con presencia de mutación p.L576P (CCT>CTT).

**a) edad:**

Cuando estudiamos la asociación con otros parámetros y comparamos la media de edad del grupo con mutación en el exón 11 con respecto al grupo con mutación en otros exones, observamos que los GISTs con mutación en el exón 11 de *c-KIT* se asocian con más frecuencia a edad avanzada, de forma estadísticamente significativa ( $p=0,023$ ), con respecto a los que no presentan mutación en el exón 11 (**Tabla.34**).

**Tabla.34** Asociación entre mutación en el exón 11 y edad.

	Mutación exón 11		Diferencia de medias	IC 95%	p*
	(SÍ) (n=55)	(NO) (n=32)			
Edad (media±DE)	68,18±14,099	61,19±12,691	-6,994	-13,007 a -0,981	0,023

\*test *t* de Student

Sin embargo, no se observan diferencias al comparar la media de edad con la localización de la mutación en la región hot-spot ni entre la media de edad y el tipo de mutación.

**b) sexo:**

Observamos que los GISTs de nuestra serie con mutación en el exón 11 son más frecuentes en mujeres ( $p=0,036$ ), con respecto a los que no presentan mutación en el exón 11. El riesgo de las mujeres de presentar mutación en el exón 11 es superior al de los hombres: OR = 2.64, IC95% = [1.06 a 6.60] (Tabla.35).

**Tabla.35** Asociación entre mutación en el exón 11 y sexo.

Sexo	Mutación exón 11		p*
	SÍ (n=55)	NO (n=32)	
Mujer	30 (75,0%)	10 (25%)	0,036
Hombre	25 (53,2%)	22 (46,8%)	

\*test  $\chi^2$

No se han observado diferencias entre ser mujer/hombre y la localización de la mutación en la región hot-spot, ni entre ser mujer/hombre y el tipo de mutación.

**c) localización:**

Los GISTs con mutación en el exón 11 se localizan con más frecuencia en intestino delgado, aunque no se han demostrado diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,056$ ) (Tabla.36).

**Tabla.36** Asociación entre mutación en el exón 11 y localización.

Localización	Mutación exón 11		P*
	SÍ (n=55)	NO (n=32)	
Estómago	19 (39,6%)	18 (62,1%)	0,056 (NS)
Intestino delgado	29 (60,4%)	11 (37,9%)	

\*test  $\chi^2$

NS=no significativo

Si representamos de forma gráfica como se distribuye la mutación en el exón 11 en función de la localización, observamos que con más frecuencia se asocia a GISTs localizados en intestino delgado, seguido de estómago y localizaciones extragastrointestinales (Fig.45).

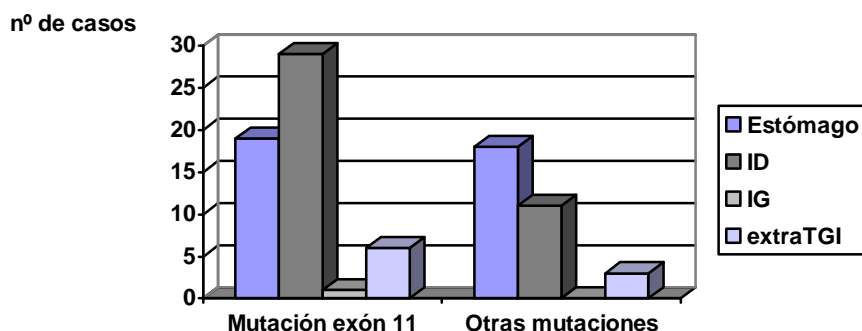


Fig.45 Distribución de la mutación en el exón 11 en función de la localización.

Respecto al tipo de mutación, se observa una tendencia a distribuirse de forma diferente en función de la localización. Las deleciones/indel tienen más tendencia a producirse en GIST de intestino delgado que en estómago. Las mutaciones puntuales son también frecuentes en intestino delgado, pero tienden a distribuirse con más frecuencia en GIST de localización gástrica, que en intestino delgado en comparación con deleciones/indel ( $p=0,481$ ) (Tabla.37).

Tabla.37 Asociación entre tipo de mutación en el exón 11 y localización.

Tipo de mutación	Localización		p*
	Estómago (n=17)	Intestino delgado (n=28)	
Delección/indel	10 (28,6%)	20 (57,1%)	0,481(NS)
Mutación puntual	7 (43,8%)	8 (50%)	

\*test  $\chi^2$

NS=no significativo

Si representamos de forma gráfica como se distribuyen los tipos de mutación en el exón 11, en función de la localización, observamos que las

deleciones/indel son más frecuentes en GISTs localizados en intestino delgado, seguido de estómago y localizaciones extragastrointestinales (Fig.46).

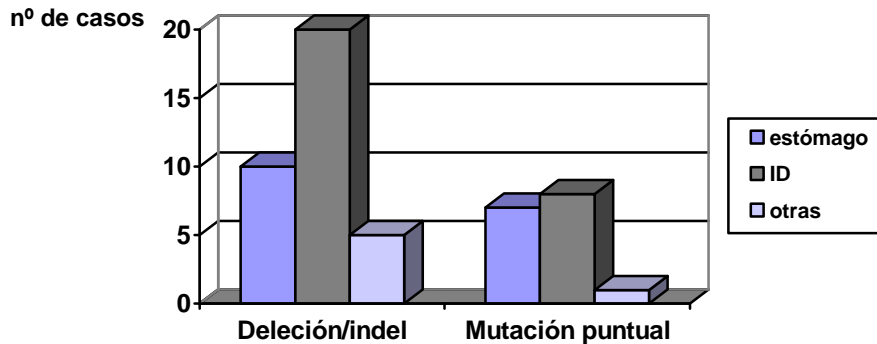


Fig.46 Distribución de los tipos de mutación en el exón 11 más frecuentes en función de la localización.

**d) grupos de riesgo:**

La mutación en el exón 11 no presenta diferencias estadísticamente significativas de distribución cuando comparamos los diferentes grupos de riesgo, aunque se distribuye con más frecuencia en el grupo de alto riesgo (Fig.47).

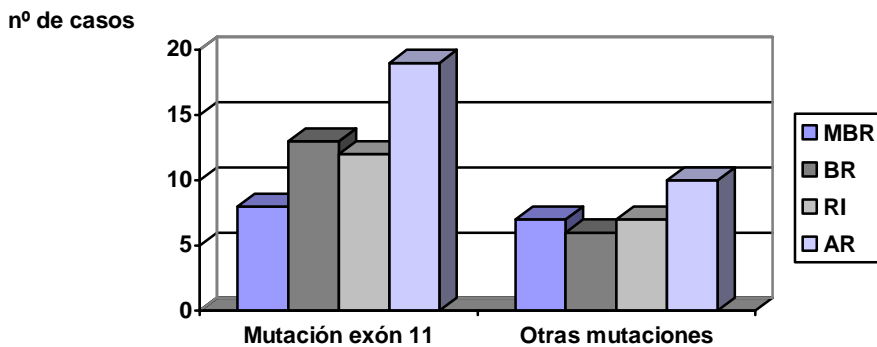
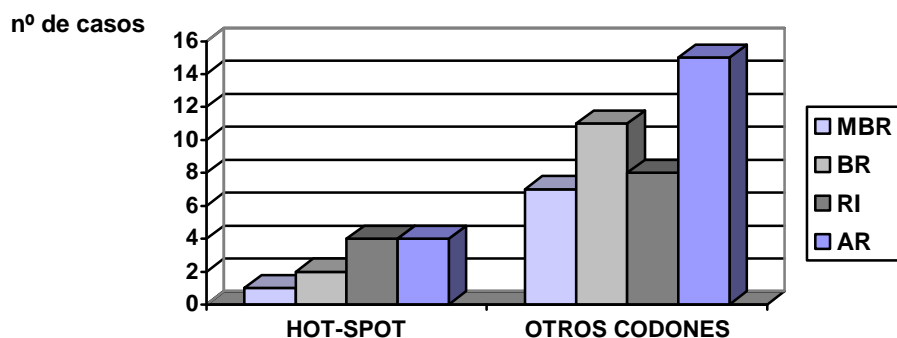


Fig.47 Distribución de la mutación en el exón 11 en función de los grupos de riesgo.

Los casos con mutación en la región hot-spot del exón 11 tienen tendencia a distribuirse en los GIST de riesgo intermedio y alto riesgo, y se distribuyen con poca frecuencia en GIST de muy bajo riesgo, sin demostrarse diferencias estadísticamente significativas (Fig.48).



**Fig. 48** Distribución de casos con mutación en la región hot-spot en función del grupo de riesgo.

Los tipos de mutación se distribuyen de forma diferente según el grupo de riesgo. Las deleciones/indel tienden a distribuirse con más frecuencia en GISTs de alto riesgo ( $p=0,043$ ), mientras que las mutaciones puntuales se distribuyen por igual en cualquier grupo de riesgo (**Tabla.38**).

**Tabla.38** Asociación entre grupos de riesgo y tipo de mutación en el exón 11.

Tipo de mutación	Criterios 2006				p*
	Muy Bajo Riesgo (n=7)	Bajo Riesgo (n=13)	Riesgo Intermedio (n=10)	Alto Riesgo (n=18)	
Delección/indel	4 (12,1%)	6 (18,2%)	8 (24,2%)	15 (45,5%)	0,043**
Mutación puntual	3 (20%)	7 (46,7%)	2 (13,3%)	3 (20%)	

\*test  $\chi^2$

\*\*test asociación lineal por lineal

El grupo de duplicaciones es menos frecuente (3 casos), observamos 1 caso en GIST de Muy Bajo Riesgo y en 2 casos en GIST de Riesgo Intermedio. Sólo hay 1 caso de mutación del tipo ins/inv identificado en un GIST de Alto Riesgo (**Fig.49**).

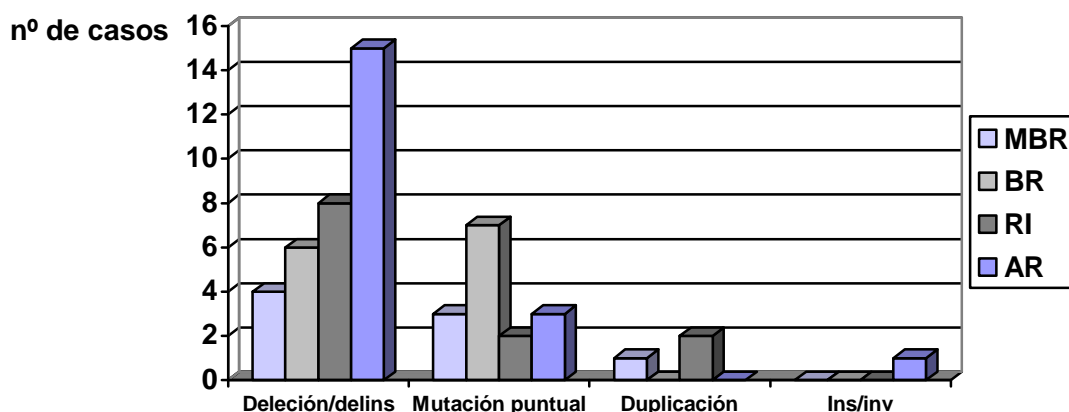


Fig. 49 Distribución de los tipos de mutación en el exón 11 en función del grupo de riesgo.

**e) tipo histológico:**

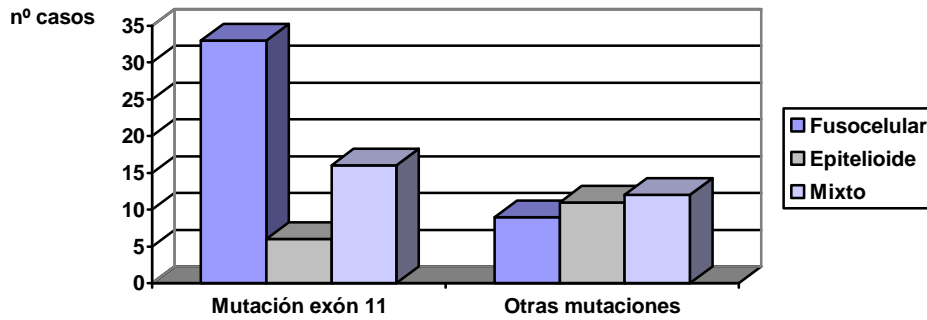
Respecto a la morfología que pueden presentar los GISTs, la mutación en el exón 11 se asocia con más frecuencia al tipo histológico fusocelular ( $p=0,006$ ) (Tabla.39).

Tabla.39 Asociación entre mutación en el exón 11 y tipo histológico.

	Tipo histológico			p*
	Fusocelular (n=42)	Epitelioide (n=17)	Mixto (n=28)	
Mutación exón 11 (sí)	33 (60%)	6 (10,9%)	16 (29,1%)	0,006

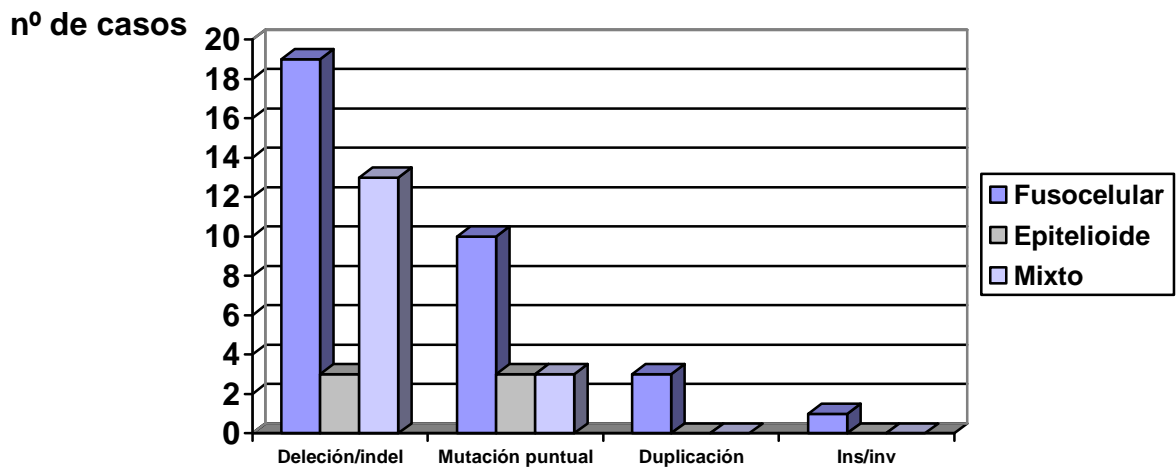
\*test  $\chi^2$

Si representamos de forma gráfica como se distribuyen los GISTs con mutación del exón 11 en función del tipo histológico, observamos que la mayoría corresponden al tipo fusocelular, cuando lo comparamos con el resto de mutaciones (Fig.50).



**Fig. 50** Distribución de la mutación en el exón 11 en función del tipo histológico.

No se han observado diferencias estadísticamente significativas entre la distribución de GISTs con mutación en el exón 11 en la región hot-spot en función del tipo histológico. Tampoco entre la distribución del tipo de mutación, aunque las mutaciones del/indel son más frecuentes en los tipos fusocelular y mixto (Fig.51).



**Fig. 51** Distribución de la mutación en el exón 11 en función del tipo de mutación.



**f) intensidad de expresión de c-kit:**

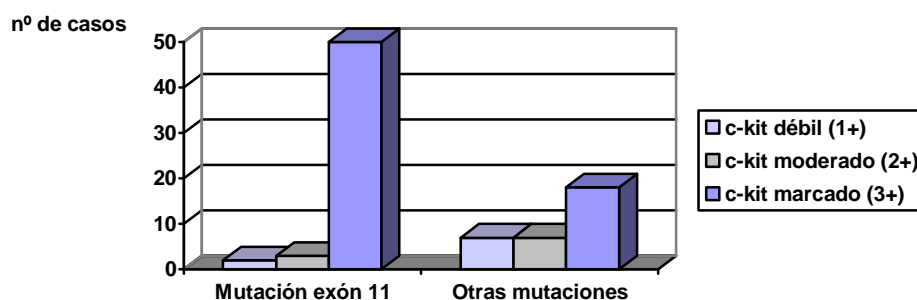
Los casos de GIST con mutación en el exón 11 se asocian con más frecuencia a tinción con intensidad marcada (3+) de c-kit ( $p=0,001$ ), con respecto a los casos sin mutación del exón 11 (**Tabla.40**).

**Tabla.40** Asociación entre mutación del exón 11 e intensidad de c-kit.

Intensidad de c-kit	Mutación exón 11		p*
	SÍ (n=55)	NO (n=32)	
Débil (1+)	2 (3,6%)	7 (21,9%)	0,001
Moderada (2+)	3 (5,5%)	7 (21,9%)	
Marcada (3+)	50 (90,9%)	18 (56,3%)	

\*test  $\chi^2$

Si representamos de forma gráfica como se distribuyen los GISTs con mutación en el exón 11, en función de la intensidad de c-kit, observamos que la mayoría de casos con mutación en el exón 11 expresan tinción con intensidad marcada (3+) para c-kit, cuando lo comparamos con el resto de mutaciones (**Fig.52**).



**Fig. 52** Distribución de la mutación en el exón 11 en función de la intensidad de c-kit.

No se han observado diferencias estadísticamente significativas entre la distribución de GISTs con mutación en el exón 11 en la región hot-spot y la intensidad de tinción para c-kit con respecto al resto de mutaciones, aunque

todos los casos muestran marcada intensidad de expresión inmunohistoquímica para c-kit (Fig.53).

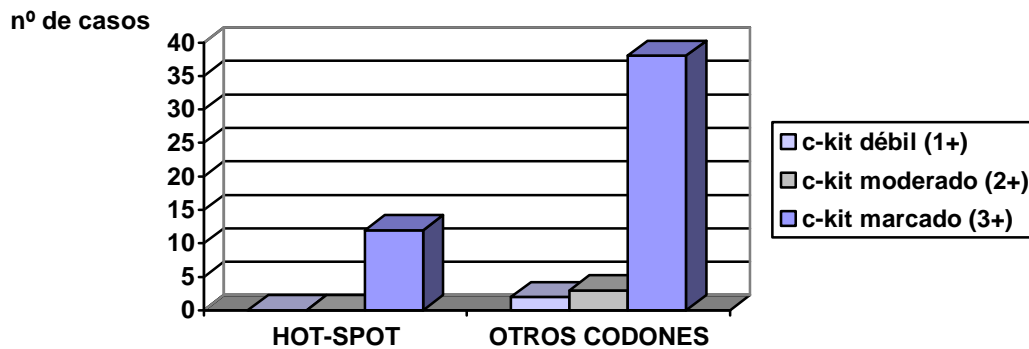


Fig. 53 Distribución de casos con mutación en la región hot-spot del exón 11 en función de la intensidad de c-kit.

#### **g) índice de proliferación Ki-67:**

Los GISTs con mutación en el exón 11 no presentan diferencias significativas al comparar los valores de expresión de Ki-67 con respecto al resto de mutaciones.

#### **MUTACIONES DEL EXÓN 9 DE c-KIT**

Se trata de un grupo homogéneo en el sólo hemos encontrado la duplicación *A503\_Y504dup* en los 10 casos mutados.

#### **a) localización:**

Los GISTs con mutación en el exón 9 se localizan con más frecuencia en intestino delgado, aunque no se han demostrado diferencias estadísticamente significativas al compararlo con mutaciones en otros exones ( $p=0,057$ ) (Tabla.41).

**Tabla.41** Asociación entre mutación del exón 9 y localización.

	Localización		p*
	Estómago (n=37)	Intestino delgado (n=40)	
Mutación exón 9 (sí)	2 (20%)	8 (80%)	0,057 (NS)

\*test  $\chi^2$

NS=no significativo

Si representamos de forma gráfica como se distribuyen los GISTs con mutación en el exón 9 en función de la localización, observamos que la mayoría de casos con mutación en el exón 9 se localizan en intestino delgado. Ninguno de los 5 casos extragastrointestinales ni los 5 casos colorectales presentan mutación en el exón 9 (Fig.54).

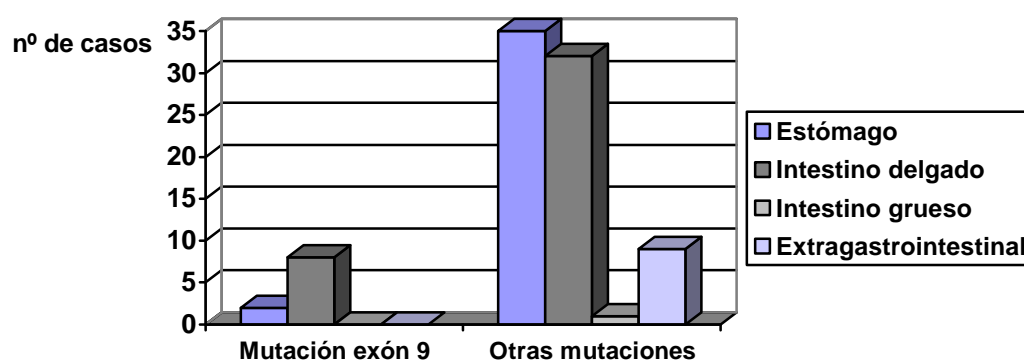


Fig. 54 Distribución de la mutación en el exón 9 en función de la localización.

### **b) grupos de riesgo:**

La presencia de mutación en el exón 9 no presenta diferencias estadísticamente significativas de distribución, en función de los diferentes grupos de riesgo, al comparar con mutaciones en otros exones. No se ha observado ningún caso con mutación en el exón 9 en el grupo de Muy Bajo Riesgo (Fig.55).

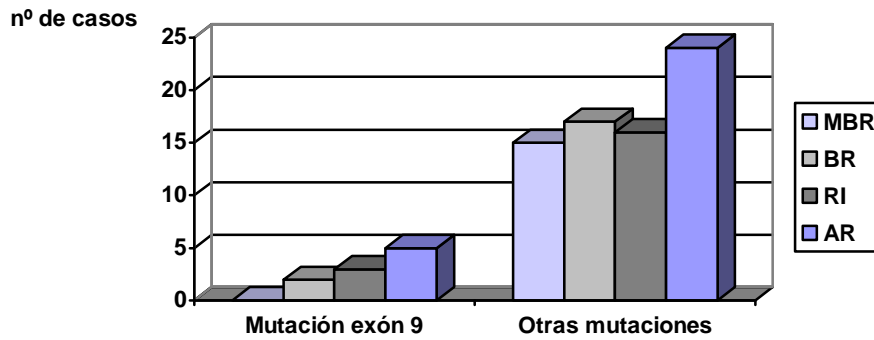


Fig. 55 Distribución de la mutación del exón 9 en función de los grupos de riesgo.

**c) tipo histológico:**

Respecto a la morfología que pueden presentar los GISTs, los casos que presentan mutación en el exón 9 se distribuyen con más frecuencia en el tipo histológico mixto, sin demostrar diferencias estadísticamente significativas cuando se compara con mutaciones en otros exones (Fig.56).

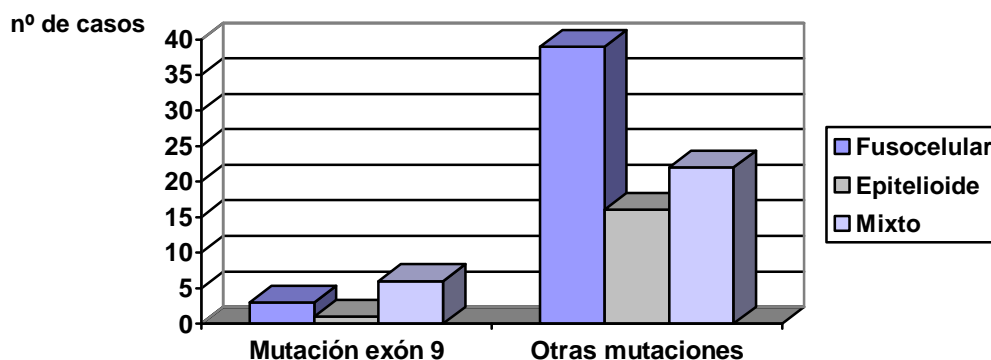


Fig. 56 Distribución de la mutación en el exón 9 en función del tipo histológico.

**d) intensidad de expresión de c-kit:**

Los casos de GIST con mutación en el exón 9 no muestran diferencias estadísticamente significativas en la intensidad de expresión inmunohistoquímica para c-kit, al comparar con mutaciones en otros exones.

**e) índice de proliferación Ki-67:**

Los GISTs con mutación en el exón 9 se asocian a valores de expresión de Ki-67 más elevados ( $p=0,007$ ) (Tabla.42).

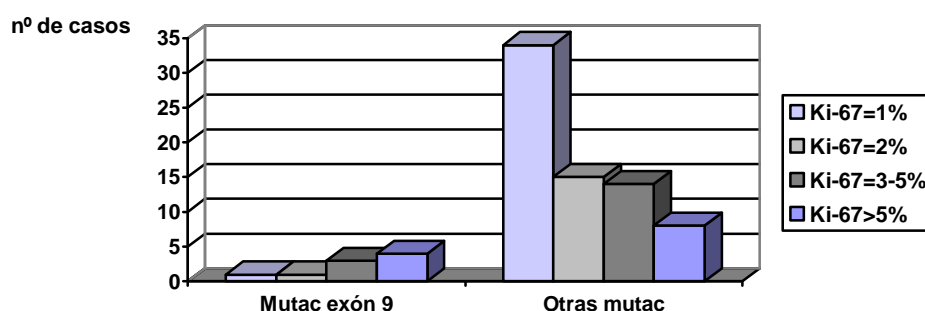
**Tabla.42** Asociación entre mutación en el exón 9 y % de expresión de Ki-67.

Mutación exón 9 (n)	Ki-67% <sup>1,2</sup>
SÍ (n=9)	7±5,26
NO (n=71)	3,62±5,39

1.media ± DE

2.Diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,007$ ) (U de Mann-Whitney)

Si representamos de forma gráfica como se distribuyen los GISTs con mutación en el exón 9, en función de la expresión de Ki-67, observamos que la mayoría de casos con mutación en el exón 9 muestran expresión de Ki-67 superior al 5% (Fig.57).



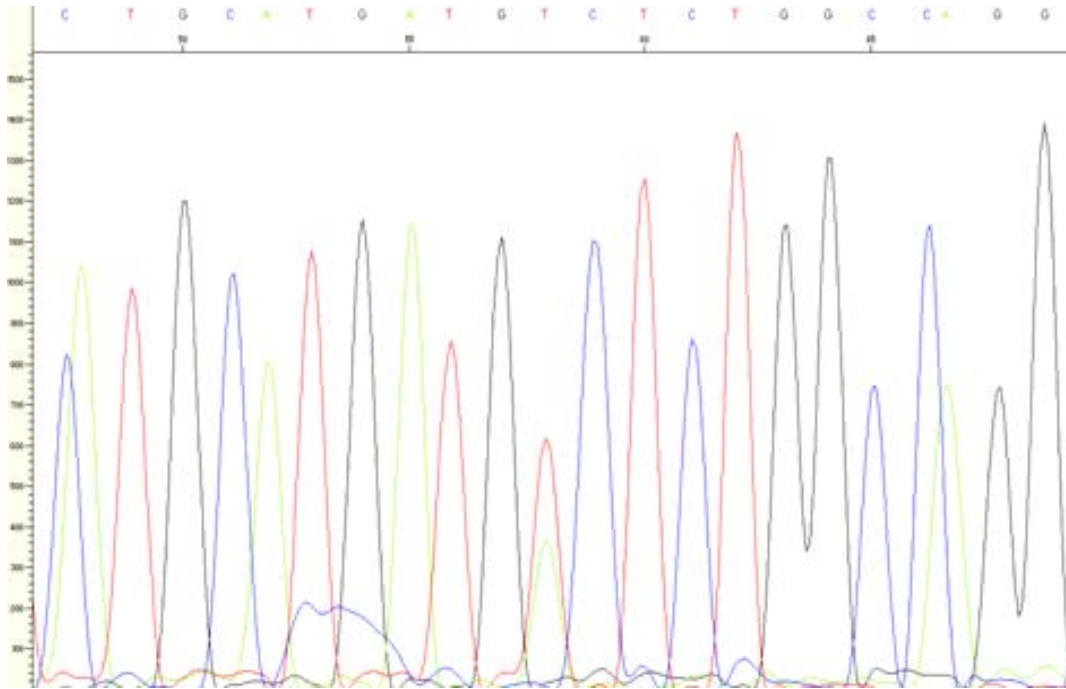
**Fig. 57** Distribución de la mutación en el exón 9 en función de los valores de expresión de Ki-67.

**MUTACIONES DEL EXÓN 12 DE PDGFRA**

Tan sólo 1 caso de nuestra serie presenta mutación en este exón. El tipo de mutación observada es la delección p.S566\_E571.

**MUTACIONES DEL EXÓN 18 DE PDGFRA**

De los 10 casos de esta categoría, 8 presentan la mutación puntual p.D842V, 1 caso presenta la delección p.D842\_H845 y 1 caso la mutación puntual p.D842Y (Fig.58).



**Fig. 58** Secuencia del exón 18 del gen *PDGFRA* en uno de los casos con presencia de mutación p.D842V (GTC>GAT).

**a) sexo:**

Observamos que los hombres tienen más riesgo (OR=9,0, IC95%=[1,09 a 74,56]) de presentar mutación en el exón 18 que las mujeres (p=0,017) (Tabla.43).

**Tabla.43** Asociación entre mutación en el exón 18 y sexo.

Sexo	Mutación exón 18		p*
	SÍ (n=10)	NO (n=76)	
Mujer	1 (2,6%)	38 (97,4%)	0,017
Hombre	9 (19,1%)	38 (80,9%)	

\*test  $\chi^2$

**b) localización:**

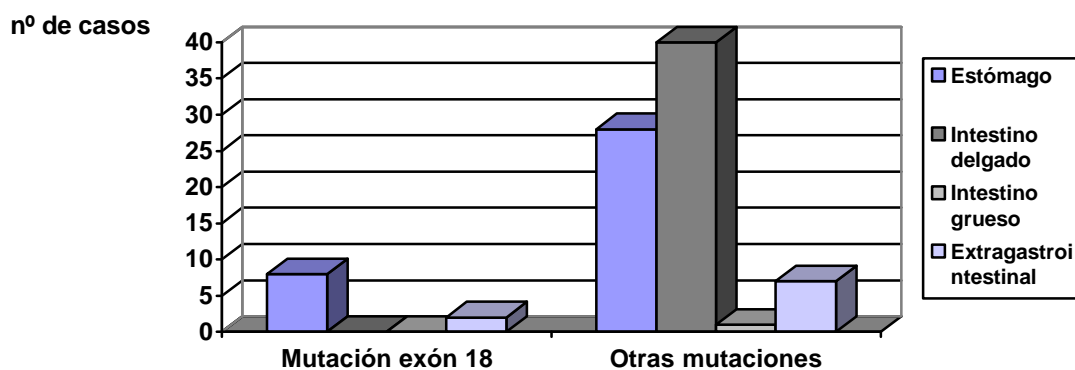
Los GISTs con mutación en el exón 18 se localizan con más frecuencia en estómago ( $p=0,002$ ), con respecto a las otras mutaciones (Tabla.44).

**Tabla.44** Asociación entre mutación en el exón 18 y localización.

	Localización		p*
	Estómago (n=36)	Intestino delgado (n=40)	
Mutación exón 18 (sí)	8 (100%)	0 (0%)	0,002

\*test  $\chi^2$

Si representamos de forma gráfica como se distribuyen los GISTs con mutación en el exón 18, en función de la localización, se observa mutación en el exón 18 en 2 de los 5 casos extragastrointestinales y en ninguno de los 5 casos colorectales (Fig.59).



**Fig. 59** Distribución de la mutación en el exón 18 en función de la localización.

**c) grupos de riesgo:**

La mutación en el exón 18 no presenta diferencias estadísticamente significativas de distribución en los diferentes grupos de riesgo, cuando comparamos con mutaciones en otros exones, aunque se observa una tendencia a distribuirse en el grupo de Muy Bajo Riesgo. El conjunto del resto

de mutaciones se distribuyen con más frecuencia en el grupo de Alto Riesgo (Fig.60).

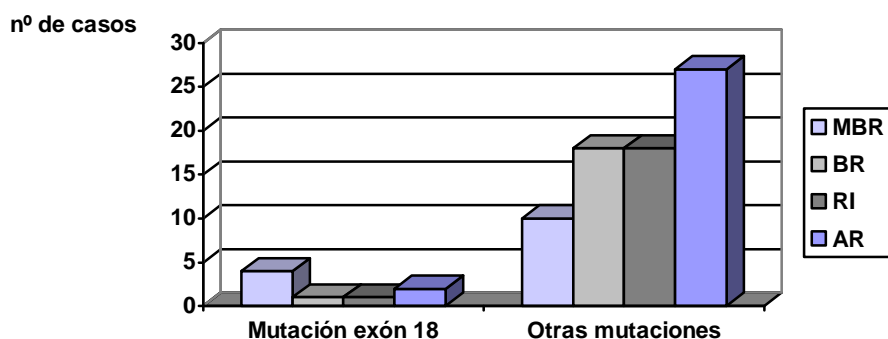


Fig. 60 Distribución de la mutación en el exón 18 en función de los grupos de riesgo.

**d) tipo histológico:**

Respecto a la morfología que pueden presentar los GISTs, la mutación en el exón 18 se asocia con más frecuencia al tipo histológico epitelioide ( $p=0,002$ ), con respecto al resto de mutaciones (Tabla.45).

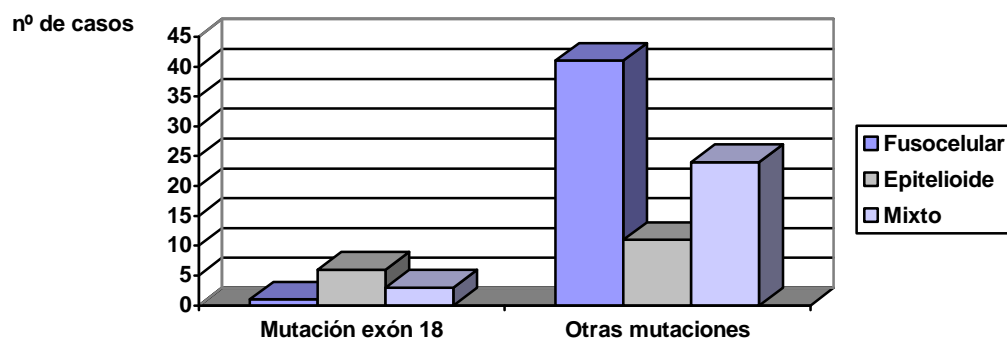
Tabla.45 Asociación entre mutación en el exón 18 y tipo histológico.

	Tipo histológico			p*
	Fusocelular (n=42)	Epitelioide (n=17)	Mixto (n=27)	
Mutación exón 18 (sí)	1 (10%)	6 (60%)	3 (30%)	0,002

\*test  $\chi^2$

Si representamos de forma gráfica como se distribuyen los GISTs con mutación en el exón 18, en función del tipo histológico, observamos que la mayoría corresponden al tipo epitelioide, cuando lo comparamos con el resto de mutaciones (Fig.61).





**Fig. 61** Distribución de la mutación en el exón 18 en función del tipo histológico.

**e) intensidad de expresión de c-kit:**

Los casos de GIST con mutación en el exón 18 no se asocian a una intensidad específica de c-kit ( $p < 0,001$ ), comparado con el grupo de mutaciones en otros exones, que expresan con más intensidad c-kit (Tabla.46).

**Tabla.46** Asociación entre mutación en el exón 18 e intensidad de c-kit.

	Mutación exón 18		p*
	SÍ (n=10)	NO (n=76)	
Intensidad de c-kit			
Débil (1+)	4 (40%)	5 (6,6%)	<0,001
Moderada (2+)	3 (30%)	6 (7,9%)	
Marcada (3+)	3 (30%)	65 (85,5%)	

\*test  $\chi^2$

**f) índice de proliferación Ki-67:**

Los GISTs con mutación en el exón 18 no presentan diferencias significativas al comparar los valores de expresión de Ki-67 con respecto a mutaciones en otros exones.

**DIFERENCIAS DE ASOCIACIÓN DE PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS ENTRE CADA GRUPO DE MUTACIONES**

Hasta ahora se han comparado las diferencias entre los parámetros clínico-patológicos que han presentado los casos de GISTs con una mutación

concreta frente al resto de mutaciones. En este apartado se comparan las diferencias entre los parámetros clínico-patológicos que han presentado los casos de GISTs con una mutación concreta con respecto a cada una de las otras mutaciones y los casos *wild-type*. Se excluye el único caso con mutación en el exón 12 de *PDGFRA* ya que no permite realizar cálculos estadísticos.

**a) sexo:**

Observamos una tendencia de distribución diferente entre hombres y mujeres con respecto a cada mutación, pero no se demuestran diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,06$ ) (Tabla.47).

**Tabla.47** Asociación entre sexo y mutaciones de *c-KIT*, *PDGFRA*, casos WT.

Sexo	Mutaciones				p*
	Exón 11 (n=55)	Exón 9 (n=10)	Exón 18 (n=10)	WT (n=11)	
Mujer	30 (76,9%)	4 (10,3%)	1 (2,6%)	4 (10,3%)	0,06 (NS)
Hombre	25 (53,2%)	6 (12,8%)	9 (19,1%)	7 (14,9%)	

\*test  $\chi^2$

NS=no significativo

WT= wild-type

Tal y como se ha comentado anteriormente el riesgo de las mujeres de presentar mutación del exón 11 es superior al de los hombres: OR = 2.64, IC95% = [1.06 a 6.60]. Observamos que los hombres tienen más riesgo (OR=9,0, IC95%=[1,09 a 74,56]) de presentar mutación del exón 18 que las mujeres ( $p=0,017$ ).

**b) localización:**

Los GISTs muestran diferencias en la localización en función del gen (*c-KIT/PDGFRA*) y exón mutado ( $p=0,01$ ). Los GISTs con mutación en el exón 11 y exón 9 de *c-KIT* se localizan con más frecuencia en intestino delgado, mientras que los GIST con mutación en exón 18 de *PDGFRA* y los GISTs WT se localizan con más frecuencia en estómago ( $p=0,01$ ) (Tabla.48).

**Tabla.48** Asociación entre mutaciones de *c-KIT*, *PDGFRA*, casos WT y localización.

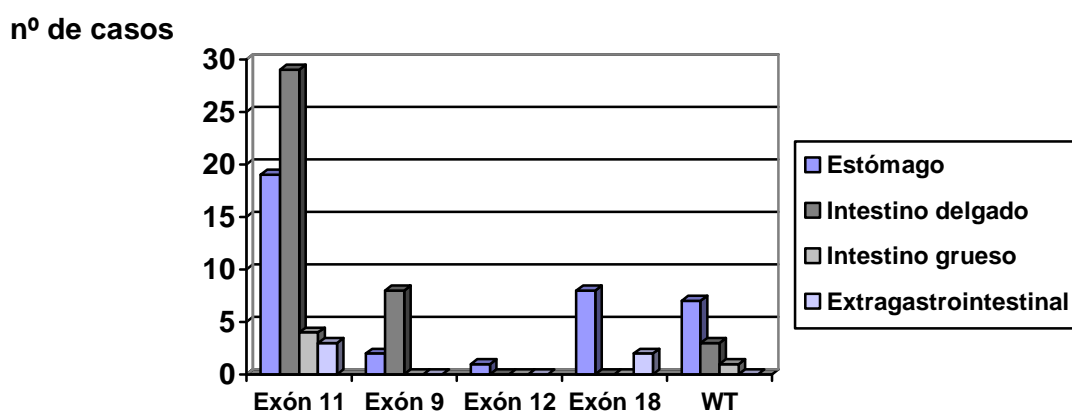
Localización	Mutaciones				p*
	Exón 11 (n=55)	Exón 9 (n=10)	Exón 18 (n=10)	WT (n=11)	
Estómago	19 (34,5%)	2 (20%)	8 (80%)	7 (63,6%)	0,01
Intestino delgado	29 (52,7%)	8 (80%)	0 (0%)	3 (27,3%)	
Intestino grueso	4 (7,3%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (9,1%)	
Extragastrintestinal <sup>1</sup>	3 (5,5%)	0 (0%)	2 (20%)	0 (0%)	

\*test  $\chi^2$

<sup>1</sup> esta localización se excluye del cálculo estadístico por su baja frecuencia

WT= wild-type

Si representamos de forma gráfica como se distribuyen los GISTs según la mutación que presenten, en función de la localización, observamos que la mayoría de casos con mutación en el exón 11 y 9 de *c-KIT* se localizan en intestino delgado y los casos con mutación en el exón 18 de *PDGFRA* y *wild-type* en el estómago. La mayoría de GISTs colorectales presentan mutación en el exón 11 de *c-KIT*. Los GISTs extragastrintestinales presentan mutación en el exón 11 de *c-KIT* y en el 18 de *PDGFRA* (Fig.62).



**Fig.62** Distribución de las mutaciones en función de la localización.

**c) grupos de riesgo:**

Los GISTs con mutación en el exón 11 y 9 de *c-KIT* muestran tendencia a distribuirse en el grupo de alto riesgo y los casos con mutación en el exón 18

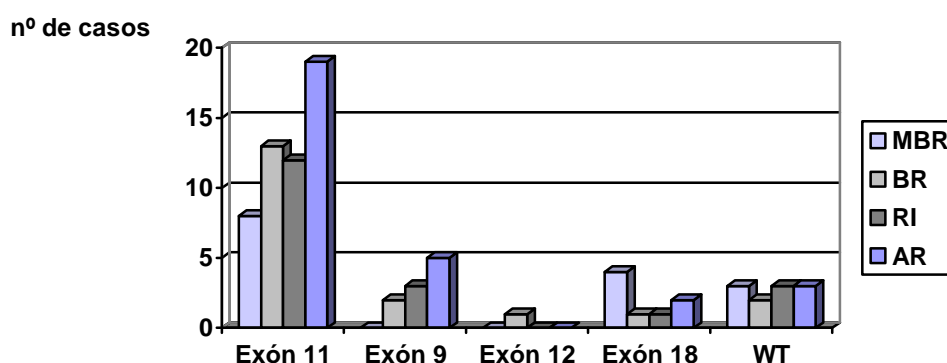
de *PDGFRA* muestran tendencia a distribuirse en el grupo de muy bajo riesgo, aunque no se demuestran diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,41$ ) (Tabla.49).

**Tabla.49** Asociación entre mutaciones de *c-KIT*, *PDGFRA*, casos WT y grupos de riesgo.

Criterios 2006	Mutaciones				p*
	Exón 11 (n=55)	Exón 9 (n=10)	Exón 18 (n=10)	WT (n=11)	
Muy Bajo Riesgo	8 (15,4%)	0 (0%)	4 (50%)	3 (27,3%)	0,41(NS)
Bajo Riesgo	13 (25%)	2 (20%)	1 (12,5%)	2 (18,2%)	
Riesgo Intermedio	12 (23,1%)	3 (30%)	1 (12,5%)	3 (27,3%)	
Alto Riesgo	19 (36,5%)	5 (50%)	2 (25%)	3 (27,3%)	

\*test  $\chi^2$   
NS=no significativo  
WT= wild-type

La representación en diagrama de barras puede verse a continuación (Fig.63).



**Fig.63** Distribución de las mutaciones en función de los grupos de riesgo.

**d) tipo histológico:**

Los GISTs muestran en función del gen (*c-KIT/PDGFRA*) y exón mutado diferente asociación con el tipo histológico ( $p=0,002$ ). Los GISTs con mutación en el exón 11 de *c-KIT* y los WT se asocian al tipo histológico fusocelular, los GIST con mutación en el exón 9 de *c-KIT* se asocian al tipo histológico mixto, y

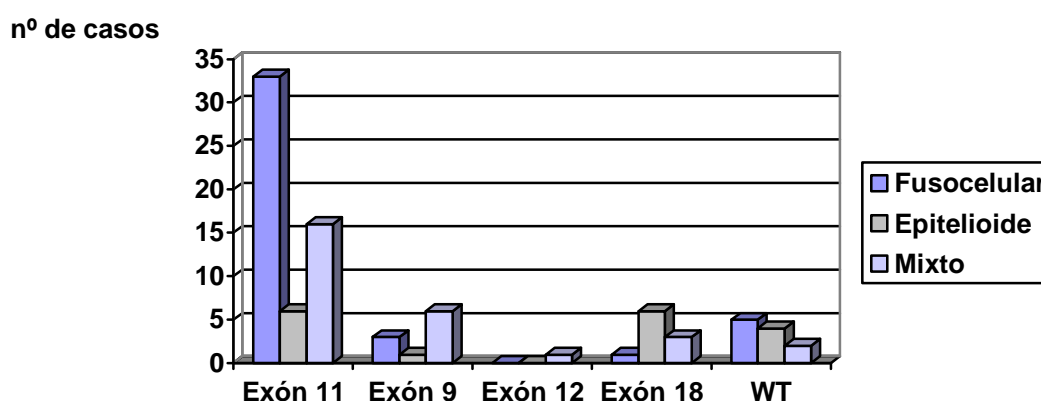
los GIST con mutación en exón 18 de *PDGFRA* se asocian al tipo histológico epitelioide (**Tabla.50**).

**Tabla.50** Asociación entre mutaciones de *c-KIT*, *PDGFRA*, casos WT y tipo histológico

Tipo histológico	Mutaciones				p*
	Exón 11 (n=55)	Exón 9 (n=10)	Exón 18 (n=10)	WT (n=11)	
Fusocelular	33 (60%)	3 (30%)	1 (10%)	5 (45,5%)	0,002
Epitelioide	6 (10,9%)	1 (10%)	6 (60%)	4 (36,4%)	
Mixto	16 (29,1%)	6 (60%)	3 (30%)	2 (18,2%)	

\*test  $\chi^2$   
WT= wild-type

La representación en diagrama de barras puede verse a continuación (**Fig.64**).



**Fig.64** Distribución de las mutaciones en función del tipo histológico.

**e) otros parámetros histológicos:**

Entre todos los parámetros histológicos valorados (descritos anteriormente) observamos que en función del gen (*c-KIT/PDGFRA*) y exón mutado encontramos diferente asociación con la presencia de matriz mixoide (p=0,043), vacuolización citoplasmática (p=0,030) y empalizadas (p=0,007).

Comparamos las mutaciones dos a dos para identificar entre cuáles se produce asociación con significación estadística (**Tabla.51**):

- GISTs con mutación en el exón 18 de *PDGFRA* presentan con frecuencia matriz mixoide ( $p=0,003$ ), cuando los comparamos con casos que presentan mutación en el exón 11 de *c-KIT*.
- GISTs con mutación en el exón 18 de *PDGFRA* ( $p=0,008$ ) y WT ( $p=0,017$ ) presentan con frecuencia vacuolización citoplasmática, cuando los comparamos con casos que presentan mutación en el exón 11 de *c-KIT*.
- GISTs con mutación en el exón 11 de *c-KIT* presentan con frecuencia empalizadas nucleares, cuando los comparamos con GISTs con mutación en el exón 18 de *PDGFRA* ( $p=0,002$ ) y con casos WT ( $p=0,035$ ).

**Tabla.51** Asociación entre mutaciones de *c-KIT*, *PDGFRA*, casos WT y parámetros histológicos.

Parámetro histológico	Mutaciones				p*
	Exón 11 (n=55)	Exón 9 (n=10)	Exón 18 (n=10)	WT (n=11)	
Matriz mixoide	9 (16,4%)	3 (30%)	6 (60%)	4 (36,4%)	0,003 <sup>¶</sup>
Vacuolización citoplasmática	11 (20%)	4 (40%)	6 (60%)	6 (54,5%)	0,008 <sup>¶</sup> 0,017 <sup>¶¶</sup>
Empalizadas	34 (61,8%)	3 (30%)	1 (10%)	3 (27,3%)	0,002 <sup>¶</sup>

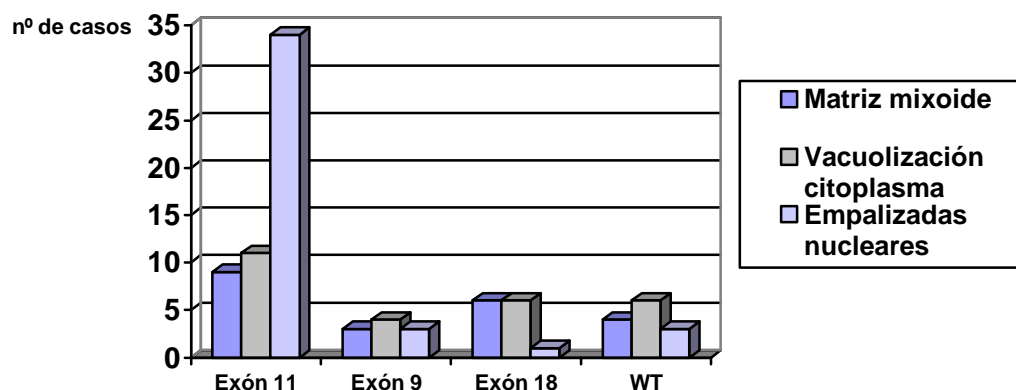
\*test  $\chi^2$

<sup>¶</sup>diferencia entre el exón18 y el exón 11

<sup>¶¶</sup>diferencia entre WT y el exón 11

WT=wild-type

Si representamos de forma gráfica como se distribuyen los GISTs, según determinados parámetros histológicos, observamos que la mayoría de casos con mutación en el exón 11 de *c-KIT* presentan empalizadas, los casos con mutación en el exón 18 de *PDGFRA* presentan matriz mixoide y vacuolización citoplasmática, y los casos WT presentan vacuolización citoplasmática (**Fig.65**).



**Fig.65** Distribución de las mutaciones en función de la presencia de matriz mixoide, vacuolización citoplasmática y empalizadas nucleares.

**f) intensidad de expresión de c-kit:**

Los GISTs muestran una tendencia diferente de distribución en función de la intensidad de expresión de c-kit, se demuestra que los casos con mutación en el exón 11 de *c-KIT* presentan con más frecuencia expresión de intensidad marcada (3+) ( $p < 0,001$ ), con respecto a casos con mutación en el exón 9 (Tabla.52).

**Tabla.52** Asociación entre mutaciones de *c-KIT*, *PDGFRA*, casos WT e intensidad de c-kit

Intensidad de c-kit	Mutaciones				p*
	Exón 11 (n=55)	Exón 9 (n=10)	Exón 18 (n=10)	WT (n=11)	
Débil (1+)	2 (3,6%)	2 (20%)	4 (40%)	1 (9,1%)	<0,001
Moderada (2+)	3 (5,5%)	0 (0%)	3 (30%)	4 (36,4%)	
Marcada (3+)	50 (90,9%)	8 (80%)	3 (30%)	6 (54,5%)	

\*test  $\chi^2$   
WT=wild-type

La representación en diagrama de barras puede verse a continuación (Fig.66).

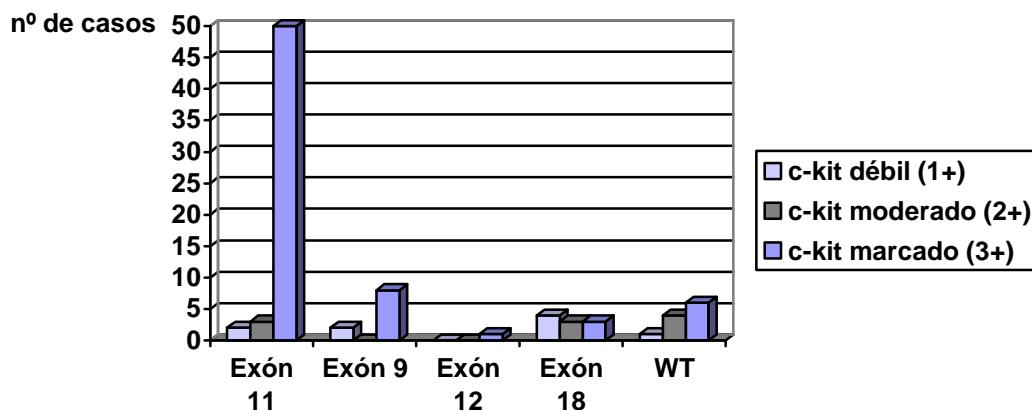


Fig. 66 Distribución de las mutaciones en función de la intensidad de c-kit.

### g) expresión de CD34:

Se observa que todos los GISTs con mutación en el exón 9 de c-KIT y en el exón 18 de PDGFRA y la mayoría de casos wild-type expresan con más frecuencia CD34, con respecto a GISTs con mutación en el exón 11, aunque estas diferencias no han demostrado significación estadística ( $p=0,052$ ) (Tabla.53).

Tabla.53 Asociación entre mutaciones de c-KIT, PDGFRA, casos WT y CD34

	Mutaciones				p*
	Exón 11 (n=55)	Exón 9 (n=10)	Exón 18 (n=10)	WT (n=11)	
CD34 (sí)	40 (72,7%)	10(100%)	10 (100%)	9 (90%)	0,052 (NS)

\*test  $\chi^2$   
WT=wild-type; NS=no significativo

### h) índice de proliferación Ki-67:

Los GISTs muestran diferente asociación con los valores de expresión de Ki-67 en función del gen (*c-KIT/PDGFRA*) y exón mutado ( $p=0,05$ ).

Mediante el test *U* de Mann-Whitney detectamos entre qué mutaciones se producen las diferencias. Observamos diferencias entre los porcentajes de expresión de Ki-67 de determinadas mutaciones, de manera que GISTs con



mutación en el exón 9 expresan positividad en un porcentaje mayor de núcleos en comparación con los casos que presentan mutación en el exón 11, en el exón 18 de *PDGFRA* y WT, de forma estadísticamente significativa (Tabla.54) (Fig.67).

**Tabla.54** Asociación entre mutaciones de *c-KIT*, *PDGFRA*, casos WT y % de expresión de Ki-67.

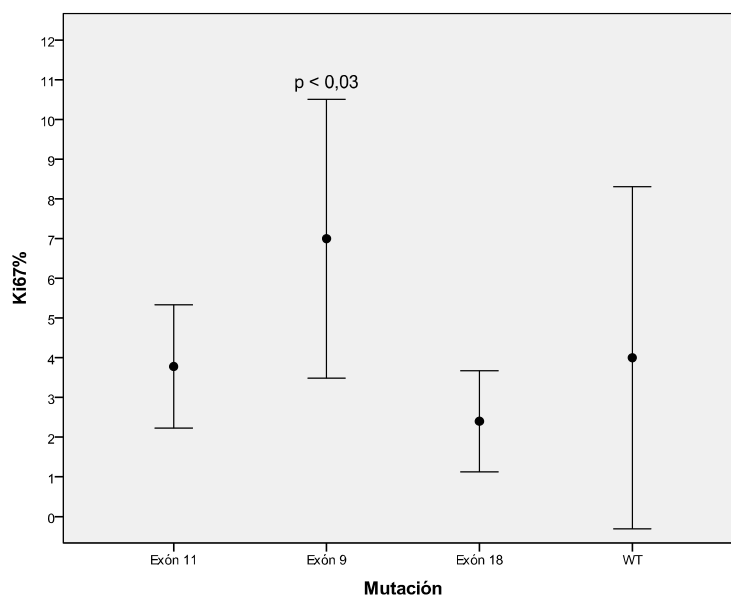
Mutaciones	Ki-67% <sup>1,2</sup>
Exón 11 (50)	3,78±5,48
Exón 9 <sup>3</sup> (9)	7,00±5,26
Exón 18 (10)	2,40±2,01
WT (11)	4,00±7,14

1.media±DE (n)

2.Kruskal-Wallis, p=0,05

3.Diferencias estadísticamente significativas (p<0,03) con todos los grupos en la comparación 2 a 2 (U de Mann-Whitney)

WT=wild-type



**Fig.67** Gráfico de las medias ± 2xEEM de expresión de Ki-67 en cada grupo de riesgo.

## 6. GISTs wild type

De los 87 casos de la serie, 11 casos (12,6%) son wild-type para las mutaciones estudiadas de *c-KIT* y *PDGFRA*.

### **Mutaciones en BRAF**

Se estudia la mutación *BRAF* en los codones 600, 464, 466 y 469, y los 11 casos son wild-type para las mutaciones estudiadas del gen *BRAF*.

Resumiendo todos los hallazgos que se han ido comentando con anterioridad, los GISTs WT presentan las siguientes características:

#### **a) localización:**

Los GISTs WT se asocian a localización gástrica ( $p=0,010$ ) cuando comparamos con el resto de mutaciones.

#### **b) tipo histológico:**

Los GISTs WT se asocian al tipo histológico fusocelular ( $p=0,002$ ) cuando comparamos con el resto de mutaciones.

#### **c) otros parámetros histológicos:**

Los GISTs WT se asocian a vacuolización citoplasmática ( $p=0,017$ ) cuando comparamos con GISTs que presentan mutación en el exón 11 de c-KIT.

## **7. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE NIVELES DE EXPRESIÓN DE miRNAs:**

En la siguiente tabla se muestran detallados los resultados de la expresión de miRNA-221, miRNA-222 y miRNA-494 para cada caso de la serie (Tabla.55).

**Tabla.55** Resultado de los niveles de expresión de los miRNA estudiados

Nº Caso	Grupo de Riesgo	Exón 9 c-KIT	Exón 11 c-KIT	Exón 12 PDGFRA	Exón 18 PDGFRA	BRAF	miRNA-221	miRNA-222	miRNA-494
1	BR	<i>A503_Y504dup</i>							
2	AR		<i>Q556_I573del</i>						
3	BR			<i>S566_E571del</i>			0,109	0,081	0,265
4	BR		<i>L576P</i>				0,331	0,288	0,656
5	AR		<i>M553_Y554delinsN</i>				0,345	0,493	0,204
6	AR	<i>A503_Y504dup</i>	<i>&gt;&gt;&gt;&gt;</i>				0,469	0,338	3,780
7	BR		<i>M552_E554delinsK</i>				0,363	0,385	1,080
8	BR		<i>D579del</i>				0,108	0,110	0,846

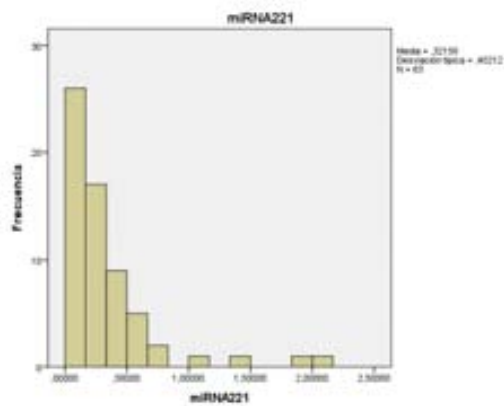
Nº Caso	Grupo de Riesgo	Exón 9 c-KIT	Exón 11 c-KIT	Exón 12 PDGFRA	Exón 18 PDGFRA	BRAF	miRNA-221	miRNA-222	miRNA-494
9	RI		<i>M552_W557del</i>				0,031	0,018	0,193
10	RI		<i>K550_W558delinsR</i>				0,092	0,103	0,558
11	RI		<i>V555_I571del</i>				0,500	0,358	2,234
12	RI		<i>L576P</i>				0,211	0,216	0,281
14	BR	WT	WT	WT	WT	WT	0,029	0,026	0,433
15	MBR	WT	WT	WT	WT	WT	0,092	0,118	0,144
16	BR				<i>D842V</i>		0,361	0,267	1,044
17	BR		<i>Y553S+W557C+K558N</i>				0,026	0,018	0,263
18	MBR				<i>D842V</i>		0,355	0,228	0,398
19	RI		<i>P551del</i>				0,316	0,325	1,017
20	AR		<i>W557R</i>				0,117	0,157	1,143
21	AR		<i>L576P</i>						
22	RI		<i>W557_K558del</i>						
23	AR		<i>K550_V555delinsL</i>				0,165	0,212	0,193
24	MBR		<i>V560G</i>				0,206	0,149	0,584
25	BR		<i>I563_T574delinsTP</i>				0,246	0,213	1,857
26	AR		<i>V559del</i>				1,880	1,441	0,719
27	MBR				<i>D842V</i>		0,536	0,524	0,672
28	MBR		<i>L576P</i>				0,050	0,054	0,370
29	AR		<i>591_592insVYDHKWEFP RNRLS</i>				0,203	0,076	0,294
30	AR	WT	WT	WT	WT	WT	0,203	0,173	0,399
31	AR				<i>D842Y</i>		0,546	1,017	2,267
32	AR		<i>W557G</i>						
33	AR		<i>W557_K558del</i>						
34	BR		<i>P551_E555delinsQ</i>				0,165	0,125	0,712
35	AR		<i>M552_V559delinsI</i>				0,106	0,086	0,221
36	RI		<i>V559del</i>				0,550	0,675	0,891
37	AR				<i>D842V</i>		0,173	0,173	0,158
38	MBR				<i>D842V</i>		0,003	0,008	0,495
39	AR		<i>V560_L576del</i>				0,081	0,069	1,354
40	MBR				<i>D842V</i>				
41	MBR		<i>M552_Y553delinsN</i>						
42	BR		<i>V560E</i>				0,564	0,159	0,657
43	RI				<i>D842_H845del</i>				
44	AR		<i>P551_W557delinsR</i>				1,467	1,015	0,106
45	RI	<i>A503_Y504dup</i>					2,109	0,712	0,402
46	RI	<i>A503_Y504dup</i>					0,104	0,056	0,039
47	AR		<i>P551_E554del</i>						
48	BR		<i>T574_H580del</i>				0,231	0,510	0,482
49	RI		<i>W557_K558delinsE</i>				0,223	0,180	0,255
50	RI		<i>D572_P573dup</i>						
51	RI		<i>L576_D579dup</i>				0,017	0,010	0,518
52	AR	<i>A503_Y504dup</i>					0,020	0,028	0,774
53	AR	<i>A503_Y504dup</i>					0,067	0,054	0,054
54	MBR		<i>Y578_D579dup</i>				0,049	0,045	0,768
55	RI	WT	WT	WT	WT	WT			

Nº Caso	Grupo de Riesgo	Exón 9 c-KIT	Exón 11 c-KIT	Exón 12 PDGFRA	Exón 18 PDGFRA	BRAF	miRNA-221	miRNA-222	miRNA-494
56	RI	WT	WT	WT	WT	WT	0,346	0,283	0,501
57	RI	WT	WT	WT	WT	WT	0,023	0,045	0,0268
58	MBR		V560D				0,076	0,076	0,134
59	BR		E554_K558del				0,732	0,918	0,267
61	AR		D579del				0,017	0,017	0,130
62	AR	A503_Y504dup					0,023	0,045	0,0268
63	AR		E554_K557del						
64	BR		W557R				0,066	0,044	0,538
65	AR		V569_L576del				1,084	0,626	0,426
66	AR		K550_K558del				0,579	0,264	0,115
67	AR	WT	WT	WT	WT	WT	0,291	0,336	0,693
68	AR	WT	WT	WT	WT	WT			
69	MBR		M552_V559delinsl						
70	AR				D842V		0,197	0,149	0,116
71	MBR		W557_K558del						
73	AR		P551_E554del				0,246	0,279	0,348
74	AR	A503_Y504dup							
75	RI		V560D				0,208	0,119	3,099
76	MBR	WT	WT	WT	WT	WT			
77	AR		P551_E554del						
78	MBR	WT	WT	WT	WT	WT			
79	RI		W557_K558del				0,113	0,100	1,137
80	BR		E554_Q556delinsV				0,300	0,085	0,204
81	BR	WT	WT	WT	WT	WT			
82	AR				D842V		0,415	0,277	0,090
83	AR		D579del						
84	BR		V559A						
85	AR		Y553_Q556del				0,257	0,135	0,077
86	BR	A503_Y504dup					0,694	0,043	0,371
87	RI	A503_Y504dup							
88	BR		V560D				0,263	0,235	0,659
89	AR		D579del				0,062	0,047	0,126
90	MBR		V560del				0,447	0,537	0,575

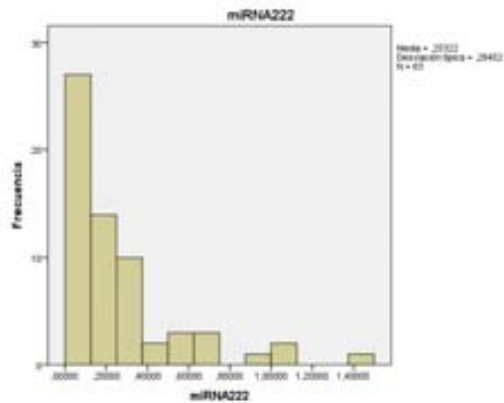
A continuación se describe de forma gráfica la expresión de los miRNA estudiados (miRNA-221, miRNA-222 y miRNA-494) a partir de histogramas (Tabla.56). Observamos como en general los niveles de expresión de los miRNA son inferiores a 1.

**Tabla.56** Valores estadísticos descriptivos de los miRNA estudiados

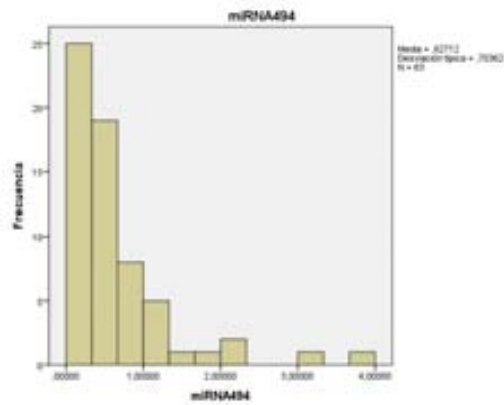
	miRNA-221	miRNA-222	miRNA-494
N	63	63	63
Media	0,321	0,253	0,627
Mediana	0,208	0,157	0,426
DE	0,402	0,284	0,703
Mínimo	0,003	0,008	0,026
Máximo	2,109	1,441	3,780



Los valores de expresión de miRNA-221 presentan un rango entre 0,003 y 2,109, con una media de 0,321.



Los valores de expresión de miRNA-222 presentan un rango entre 0,008 y 1,441 con una media de 0,253.



Los valores de expresión de miRNA-494 presentan un rango entre 0,026 y 3,780 con una media de 0,627.

## 8. ASOCIACIONES ENTRE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE miRNA, MUTACIONES Y PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS:

### a) mutaciones c-KIT y PDGFRA:

No se observan diferencias estadísticamente significativas al comparar los niveles de expresión de los miRNA-221, 222 y 494 en función de las mutaciones en el exón 11 y 9 de *c-KIT* y en el exón 18 de *PDGFRA*. A continuación se puede observar la expresión de cada microRNA en función de cada mutación (Fig.68, 69, 70).

### Niveles de expresión de miRNA-221:

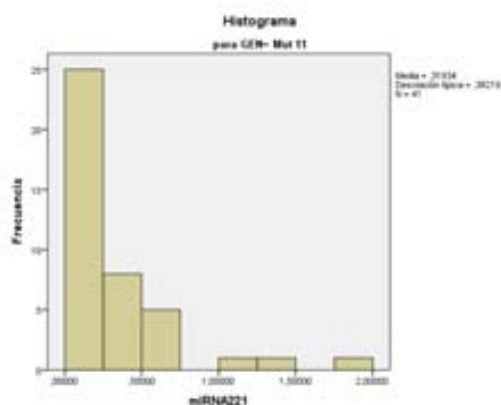


Fig. 68A Niveles de expresión de miRNA-221 en casos con mutación en el exón 11 de *c-KIT*.

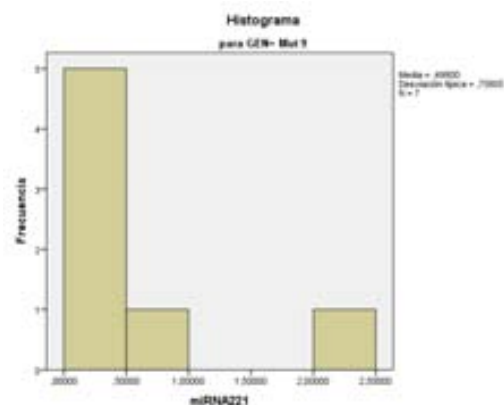


Fig.68B Niveles de expresión de miRNA-221 en casos con mutación en el exón 9 de *c-KIT*.

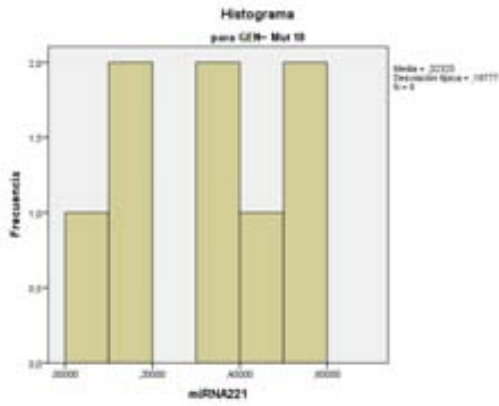


Fig.68C Niveles de expresión de miRNA-221 en casos con mutación en el exón 18 de *PDGFRA*.

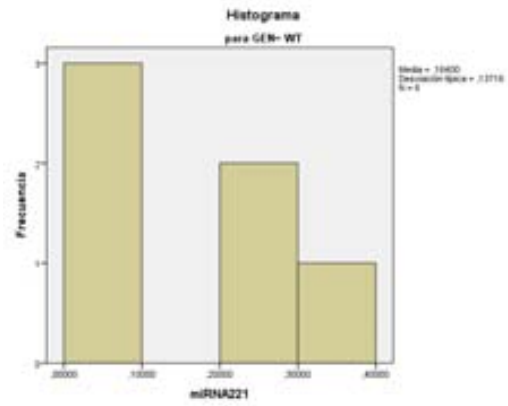


Fig.68D Niveles de expresión de miRNA-221 en casos WT.

Niveles de expresión de miRNA-222:

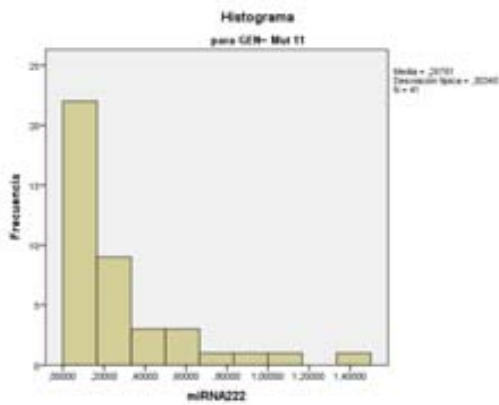


Fig.69A Niveles de expresión de miRNA-222 en casos con mutación en el exón 11 de *c-KIT*.

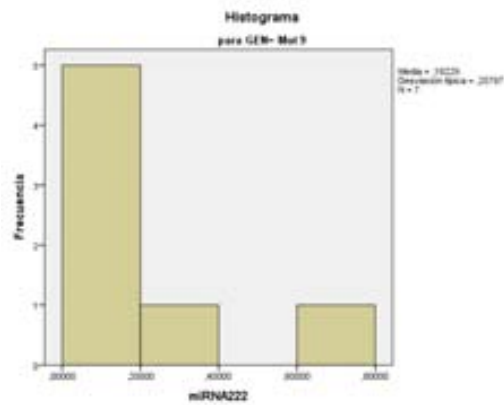


Fig.69B Niveles de expresión de miRNA-222 en casos con mutación en el exón 9 de *c-KIT*.

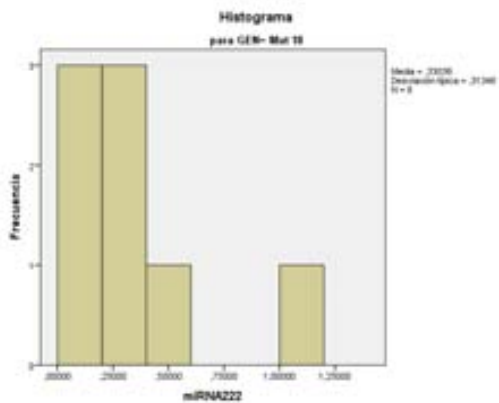


Fig.69C Niveles de expresión de miRNA-222 en casos con mutación en el exón 18 de *PDGFRA*.

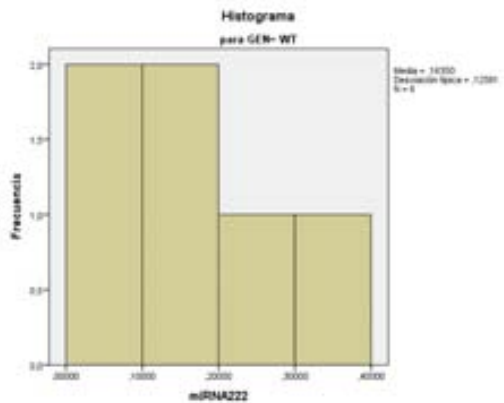


Fig.69D Niveles de expresión de miRNA-222 en casos WT.

## Niveles de expresión de miRNA-494:

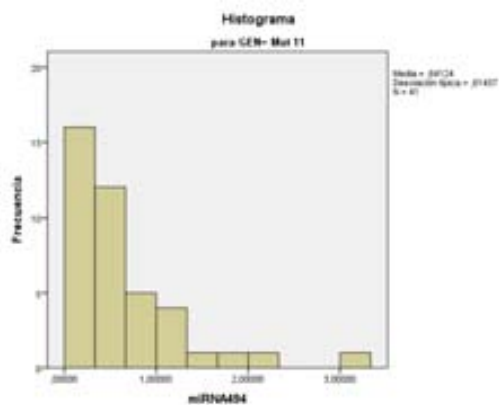


Fig.70A Niveles de expresión de miRNA-494 en casos con mutación en el exón 11 de *c-KIT*.

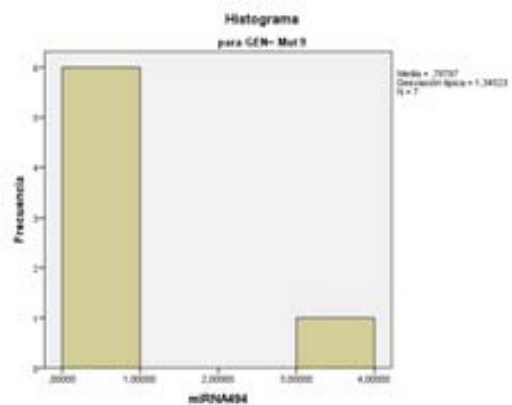


Fig.70B Niveles de expresión de miRNA-494 en casos con mutación en el exón 9 de *c-KIT*.

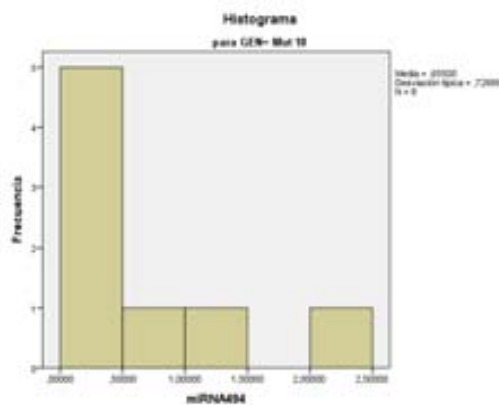


Fig.70C Niveles de expresión de miRNA-494 en casos con mutación en el exón 18 de *PDGFRA*.

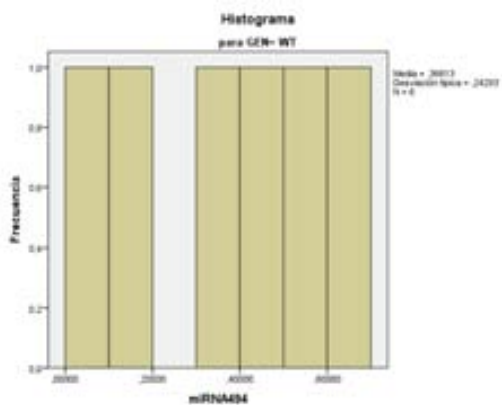


Fig.70D Niveles de expresión de miRNA-494 en casos WT.

El estudio de niveles de expresión de miRNA se realiza en 6 de los 11 casos WT. Observamos que miRNA-221 y 222 presentan en todos los casos niveles de expresión  $<0,4$ , miRNA-494 presenta en todos los casos niveles de expresión  $<0,7$ . Ninguno de los miRNA presenta valores de 1 o superiores, aunque miRNA-494 presenta valores próximos a 1 (Fig.71).

En el resto de mutaciones se observan como algunos casos muestran valores de 1 o superiores.



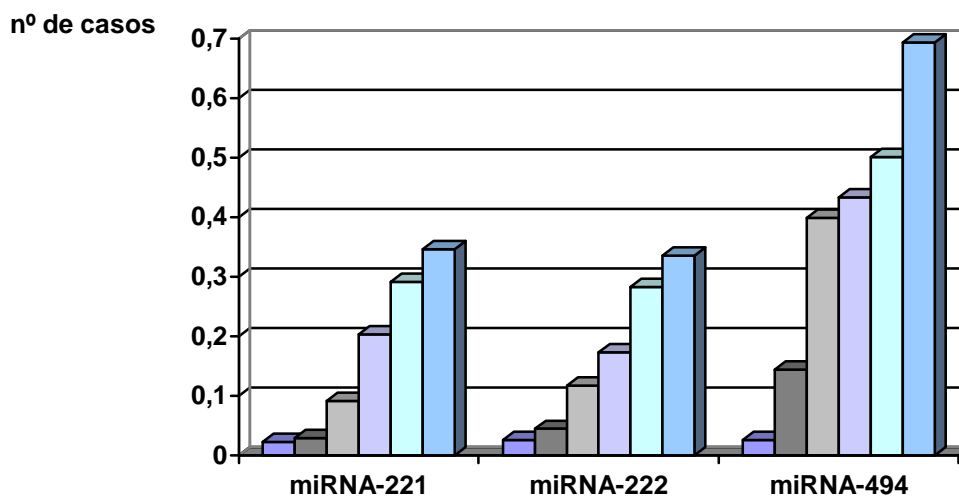


Fig.71 Niveles de expresión de miRNA-221, 222 y 494 en GISTs WT.

**b) localización:**

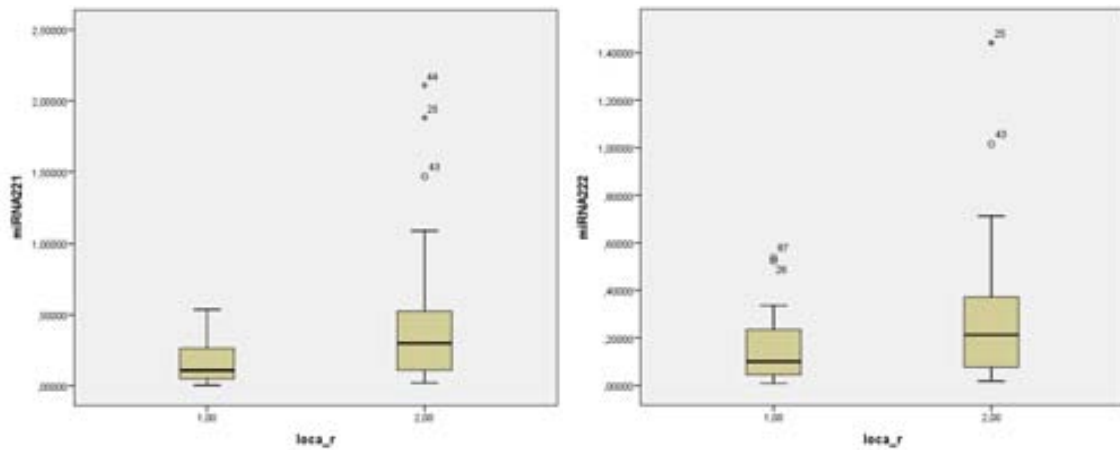
Se observan diferencias en los niveles de expresión de miRNA-221 y 222, en función de la localización. Los GISTs localizados en estómago presentan con frecuencia niveles de expresión más bajos de miRNA-221 ( $p=0,008$ ) y miRNA-222 ( $p=0,037$ ) (Tabla.57) (Fig.72).

**Tabla.57** Asociación entre miRNA y localización

miRNA	Localización	
	Estómago <sup>1,2</sup> (n=25)	Intestino delgado <sup>1</sup> (n=31)
miRNA-221 <sup>2</sup>	0,167 ± 0,155	0,444 ± 0,519
miRNA-222 <sup>2</sup>	0,153 ± 0,148	0,303 ± 0,320
miRNA-494	0,442 ± 0,310	0,310 ± 0,873

1.media±DE (n)

2.Kruskal-Wallis,  $p<0,05$



**Fig.72** Diferencias estadísticamente significativas entre las medias de expresión de miRNA-221 y miRNA-222 de GISTs localizados en estómago, con respecto a los de intestino delgado.

**c) grupos de riesgo:**

Después de analizar la expresión de los diferentes miRNA con respecto a los parámetros clínico-patológicos y mutaciones estudiadas, comparando la diferencia entre las sus medias de expresión, decidimos categorizar la expresión de los miRNA estudiados en 6 grupos: (1)  $\leq 0,05$ ; (2)  $>0,05 \leq 0,12$ ; (3)  $>0,12 \leq 0,25$ ; (4)  $>0,25 \leq 0,5$ ; (5)  $>0,5 \leq 0,99$  y (6)  $>1$ .

Observamos que los niveles de expresión de miRNA494 de las categorías con niveles más bajos de expresión, (1) y (2), se distribuyen en los GISTs de Riesgo Intermedio y Alto Riesgo, sin demostrar diferencias estadísticamente significativas con respecto a la distribución del resto de categorías ( $p=0,066$ ) (Tabla.58) (Fig.73).

**Tabla.58** Asociación entre niveles de expresión de miRNA-494 y grupos de riesgo.

miRNA-494	Criterios 2006				p*
	Muy Bajo Riesgo (n=9)	Bajo Riesgo (n=16)	Riesgo Intermedio (n=14)	Alto Riesgo (n=21)	
$\leq 0,05$	0 (0%)	0 (0%)	2 (66,7%)	1 (33,3%)	0,066** (NS)
$>0,05 \leq 0,12$	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (100%)	
$>0,12 \leq 0,25$	2 (20%)	1 (10%)	1 (10%)	6 (60%)	
$>0,25 \leq 0,5$	3 (18,8%)	6 (37,7%)	3 (18,8%)	4 (25%)	

>0,5 ≤0,99	4 (23,5%)	6 (35,2%)	4 (23,5%)	3 (17,6%)	
>1	0 (0%)	3 (30%)	4 (40%)	3 (30%)	

\*test  $\chi^2$

\*\*test asociación lineal por lineal

NS=no significativo

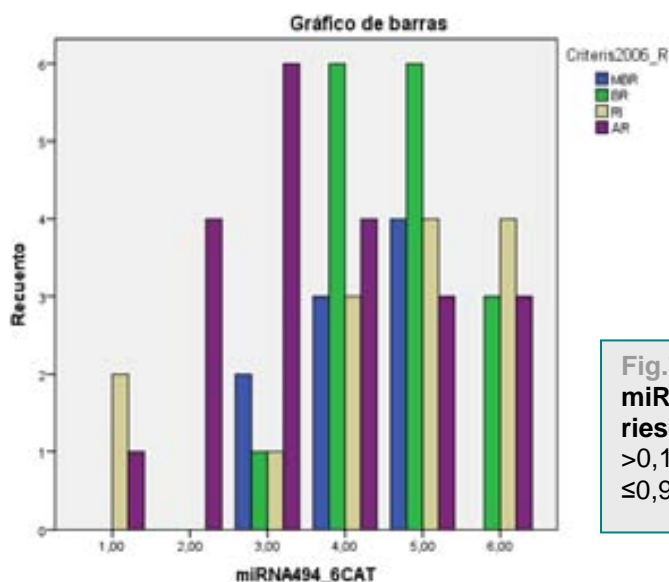


Fig.73 Niveles de expresión de miRNA-494 en función del grupo de riesgo: (1)  $\leq 0,05$ ; (2)  $>0,05 \leq 0,12$ ; (3)  $>0,12 \leq 0,25$ ; (4)  $>0,25 \leq 0,5$ ; (5)  $>0,5 \leq 0,99$  y (6)  $>1$ .

**d) tipo histológico:**

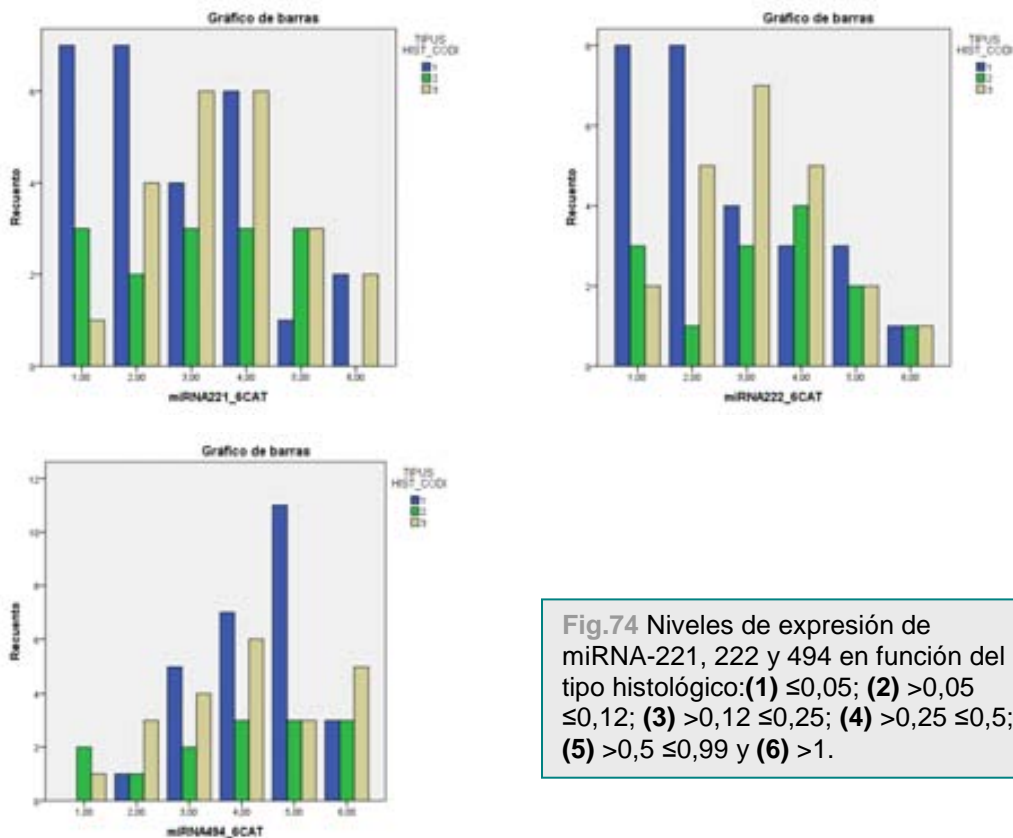
Observamos que los niveles de expresión de miRNA-221 de las categorías (1):  $\leq 0,05$  y (2):  $>0,05 \leq 0,12$ , niveles más bajos de expresión, se distribuyen en los GISTs de morfología fusocelular, sin demostrar diferencias estadísticamente significativas con respecto a la distribución del resto de categorías. Los niveles de expresión de miRNA-222 siguen una distribución similar. En cambio los niveles de expresión de miRNA-494 que se distribuyen predominantemente en GISTs de morfología fusocelular pertenecen a la categoría (5):  $>0,5 \leq 0,99$ .

Niveles de miRNA-221  $>1$ , categoría (6) no se observan en casos de GISTs con morfología epitelioide (Tabla.59) (Fig.74).

**Tabla.59** Asociación entre niveles de expresión de miRNA y tipo histológico.

miRNA	Tipo histológico			p*
	Fusocelular (n=27)	Epitelioide (n=14)	Mixto (n=22)	
miRNA-221				
≤0,05	7 (63,6%)	3 (27,3%)	1 (9,1%)	0,52(NS)
>0,05 ≤0,12	7 (53,8%)	2 (15,4%)	4 (30,8%)	
>0,12 ≤0,25	4 (30,8%)	3 (23,1%)	6 (46,2%)	
>0,25 ≤0,5	6 (40%)	3 (20%)	6 (40%)	
>0,5 ≤0,99	1 (14,3%)	3 (42,9%)	3 (42,9%)	
>1	2 (50%)	0 (0%)	2 (50%)	
miRNA-222				
≤0,05	8 (61,5%)	3 (23,1%)	2 (15,4%)	0,59(NS)
>0,05 ≤0,12	8 (57,1%)	1 (7,1%)	5 (35,7%)	
>0,12 ≤0,25	4 (28,6%)	3 (21,4%)	7 (50%)	
>0,25 ≤0,5	3 (25%)	4 (33,3%)	5 (41,7%)	
>0,5 ≤0,99	3 (42,9%)	2 (28,6%)	2 (28,6%)	
>1	1 (33,3%)	1 (33,3%)	1 (33,3%)	
miRNA-494				
≤0,05	0 (0%)	2 (66,7%)	1 (33,3%)	0,41(NS)
>0,05 ≤0,12	1 (20%)	1 (20%)	3 (60%)	
>0,12 ≤0,25	5 (45,5%)	2 (18,2%)	4 (36,4%)	
>0,25 ≤0,5	7 (43,8%)	3 (18,8%)	6 (37,5%)	
>0,5 ≤0,99	11 (64,7%)	3 (17,6%)	3 (17,6%)	
>1	3 (27,3%)	3 (27,3%)	5 (45,5%)	

\*test  $\chi^2$   
NS=no significativo



**Fig.74** Niveles de expresión de miRNA-221, 222 y 494 en función del tipo histológico: **(1)**  $\leq 0,05$ ; **(2)**  $> 0,05 \leq 0,12$ ; **(3)**  $> 0,12 \leq 0,25$ ; **(4)**  $> 0,25 \leq 0,5$ ; **(5)**  $> 0,5 \leq 0,99$  y **(6)**  $> 1$ .

**e) otros parámetros histológicos:**

Vacuolización citoplasmática:

Los GISTs con niveles de expresión de miRNA-221 próximos, iguales o superiores a 1, categorías (5) y (6) no presentan vacuolización citoplasmática ( $p=0,045$ ) (Tabla.60) (Fig.75).

**Tabla.60** Asociación entre niveles de expresión de miRNA-221 y vacuolización citoplasmática.

miRNA-221	Vacuolización citoplasmática		p*
	SÍ (n=19)	NO (n=44)	
$\leq 0,05$	6 (54,5%)	5 (45,5%)	0,045
$> 0,05 \leq 0,12$	3 (23,1%)	10 (76,9%)	
$> 0,12 \leq 0,25$	6 (46,2%)	7 (53,8%)	
$> 0,25 \leq 0,5$	2 (13,3%)	13 (86,7%)	
$> 0,5 \leq 0,99$	2 (28,6%)	5 (71,4%)	
$> 1$	0 (0%)	4 (100%)	

\*test  $\chi^2$

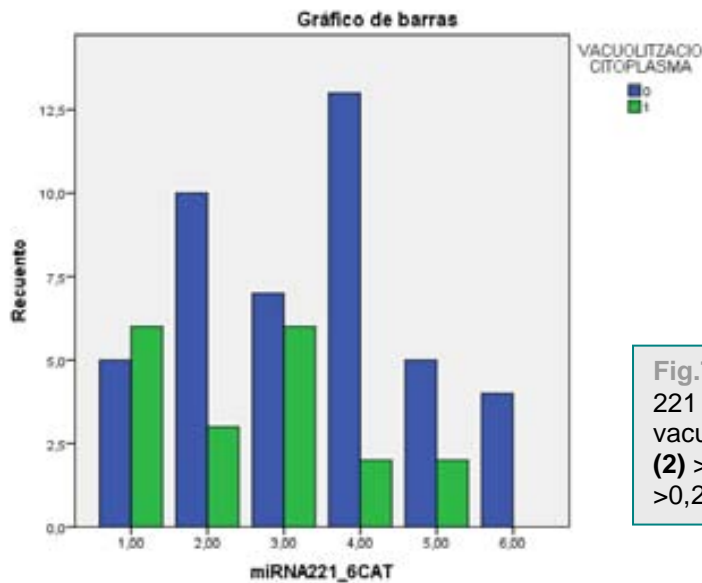


Fig.75 Niveles de expresión de miRNA-221 en función de la presencia de vacuolización citoplasmática: **(1)**  $\leq 0,05$ ; **(2)**  $>0,05 \leq 0,12$ ; **(3)**  $>0,12 \leq 0,25$ ; **(4)**  $>0,25 \leq 0,5$ ; **(5)**  $>0,5 \leq 0,99$  y **(6)**  $>1$ .

Matriz mixoide:

En los GISTs con **niveles de expresión de miRNA-494 próximos, iguales o superiores a 1**, categorías (4) (5) y (6), el porcentaje promedio de presentación de matriz mixoide es aproximadamente del 13%, mientras que en el resto de categorías es del 47% ( $p=0,016$ ) (Tabla.61) (Fig.76).

**Tabla.61** Asociación entre niveles de expresión de miRNA-494y matriz mixoide.

miRNA-494	Matriz mixoide		p*
	SÍ (n=19)	NO (n=44)	
$\leq 0,05$	2 (66,7%)	1 (33,3%)	0,016**
$>0,05 \leq 0,12$	2 (40%)	3 (60%)	
$>0,12 \leq 0,25$	4 (36,4%)	7 (63,6%)	
$>0,25 \leq 0,5$	2 (12,5%)	14 (87,5%)	
$>0,5 \leq 0,99$	3 (17,6%)	14 (82,4%)	
$>1$	1 (9,1%)	10 (90,9%)	

\*test  $\chi^2$

\*\*test asociación lineal por lineal

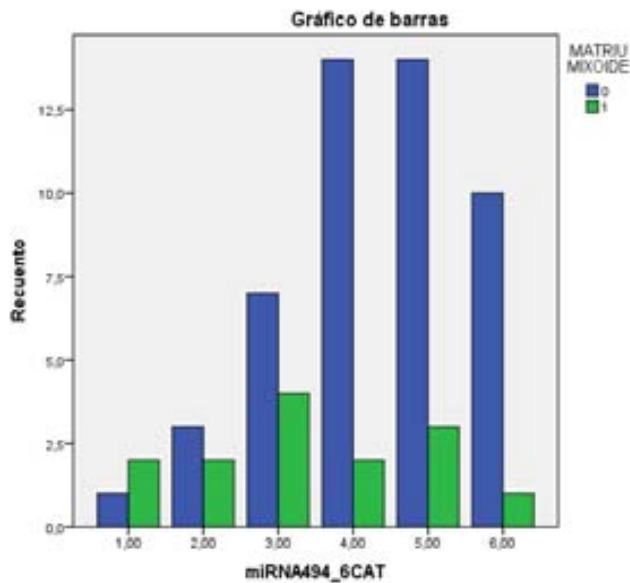


Fig.76 Niveles de expresión de miRNA-494 en función de la presencia de matriz mixoide: **(1)**  $\leq 0,05$ ; **(2)**  $> 0,05 \leq 0,12$ ; **(3)**  $> 0,12 \leq 0,25$ ; **(4)**  $> 0,25 \leq 0,5$ ; **(5)**  $> 0,5 \leq 0,99$  y **(6)**  $> 1$ .

**f) expresión de c-kit con patrón Golgi:**

En los GISTs con **niveles de expresión de miRNA-221 próximos a valores de 1**, categorías (5) y (6), el porcentaje promedio de expresión de c-kit con patrón de Golgi es aproximadamente del 53%, mientras que en el resto de categorías es del 19% ( $p=0,014$ ) (Tabla.62) (Fig.77).

**Tabla.62** Asociación entre niveles de expresión de miRNA-221 y patrón c-kit Golgi.

miRNA-221	Patrón c-kit Golgi		p*
	SÍ (n=16)	NO (n=47)	
$\leq 0,05$	2 (18,2%)	9 (81,8%)	0,014
$> 0,05 \leq 0,12$	2 (15,4%)	11 (84,6%)	
$> 0,12 \leq 0,25$	3 (23,1%)	10 (76,9%)	
$> 0,25 \leq 0,5$	3 (20%)	12 (80%)	
$> 0,5 \leq 0,99$	4 (57,1%)	3 (42,9%)	
$> 1$	2 (50%)	2 (50%)	

\*test  $\chi^2$

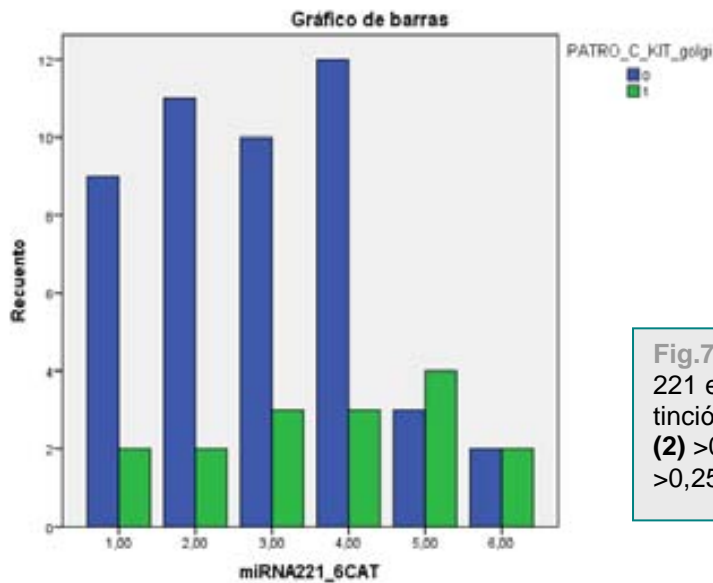


Fig.77 Niveles de expresión de miRNA-221 en función de la presencia de tinción c-kit con patrón Golgi: **(1)**  $\leq 0,05$ ; **(2)**  $>0,05 \leq 0,12$ ; **(3)**  $>0,12 \leq 0,25$ ; **(4)**  $>0,25 \leq 0,5$ ; **(5)**  $>0,5 \leq 0,99$  y **(6)**  $>1$ .

**g) intensidad de expresión de c-kit:**

Los GISTs con niveles de expresión de miRNA-494 elevados, categorías (4), (5) y (6) tienen tendencia a expresar c-kit con mayor intensidad (+3), aunque no se demuestran diferencias estadísticamente significativas respecto a la distribución del resto de categorías ( $p=0,092$ ) (Tabla.63) (Fig.78).

**Tabla.63** Asociación entre niveles de expresión de miRNA-494 e intensidad de c-kit.

miRNA-494	Intensidad c-kit			p*
	Débil (1+) (n=6)	Moderada (2+) (n=6)	Marcada (3+) (n=51)	
$\leq 0,05$	1 (33,3%)	1 (33,3%)	1 (33,3%)	0,092(NS)
$>0,05 \leq 0,12$	0 (0%)	1 (20%)	4 (80%)	
$>0,12 \leq 0,25$	3 (27,3%)	1 (9,1%)	7 (63,6%)	
$>0,25 \leq 0,5$	0 (0%)	1 (6,3%)	15 (93,8%)	
$>0,5 \leq 0,99$	1 (5,9%)	1 (5,9%)	15 (88,2%)	
$>1$	1 (9,1%)	1 (9,1%)	9 (81,8%)	

\*test  $\chi^2$   
NS=no significativo



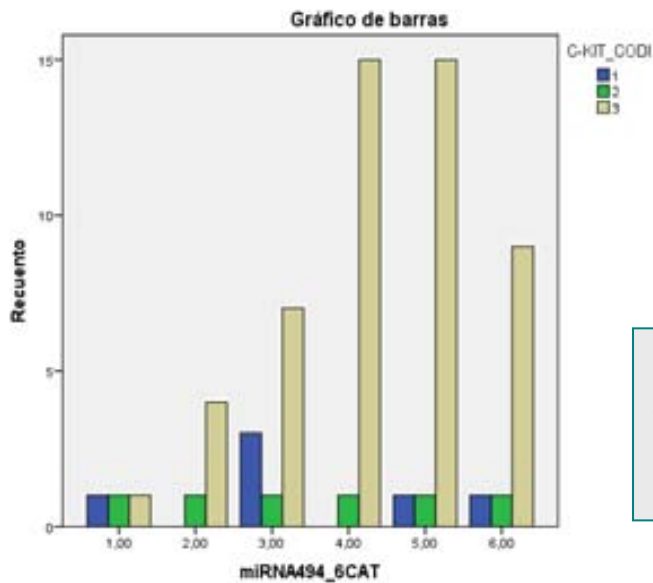


Fig.78 Niveles de expresión de miRNA-494 en función de la intensidad de tinción de c-kit: **(1)**  $\leq 0,05$ ; **(2)**  $> 0,05 \leq 0,12$ ; **(3)**  $> 0,12 \leq 0,25$ ; **(4)**  $> 0,25 \leq 0,5$ ; **(5)**  $> 0,5 \leq 0,99$  y **(6)**  $> 1$ .

**h) expresión de CD34:**

Los GISTs con niveles de expresión de miRNA-221 muy bajos, categorías (1) y (2), se asocian con más frecuencia a expresión de CD34, si lo comparamos con el resto de categorías ( $p=0,023$ ) (Tabla.64) (Fig.79).

**Tabla.64** Asociación entre niveles de expresión de miRNA-221y CD34.

miRNA-221	CD34		p*
	SÍ (n=50)	NO (n=13)	
$\leq 0,05$	10 (90,9%)	1 (9,1%)	0,023**
$> 0,05 \leq 0,12$	12 (92,3%)	1 (7,7%)	
$> 0,12 \leq 0,25$	10 (76,9%)	3 (23,1%)	
$> 0,25 \leq 0,5$	12 (80%)	3 (20%)	
$> 0,5 \leq 0,99$	4 (57,1%)	3 (42,9%)	
$> 1$	2 (50%)	2 (50%)	

\*test  $\chi^2$

\*\*test lineal por lineal

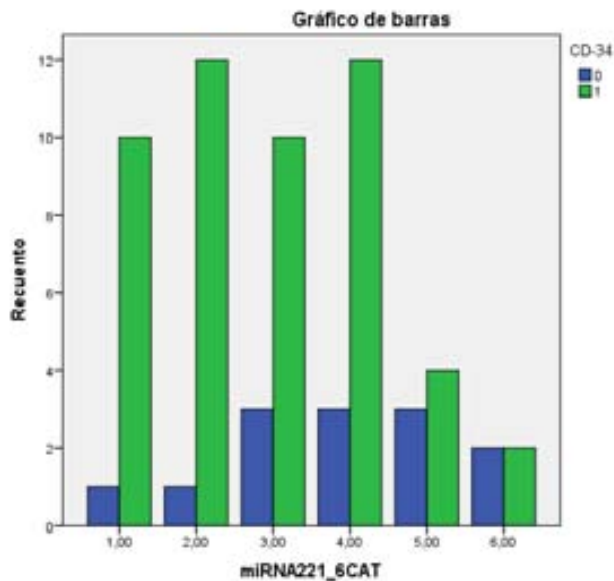


Fig.79 Niveles de expresión de miRNA-221 en función de la positividad para CD34: **(1)**  $\leq 0,05$ ; **(2)**  $>0,05 \leq 0,12$ ; **(3)**  $>0,12 \leq 0,25$ ; **(4)**  $>0,25 \leq 0,5$ ; **(5)**  $>0,5 \leq 0,99$  y **(6)**  $>1$ .

## 9. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DEL SEGUIMIENTO:

### TRATAMIENTO ADYUVANTE

Reciben tratamiento adyuvante con mesilato de imatinib 18 casos (21,2%), que se tendrá que modificar a otro fármaco de segunda línea en 7 casos por progresión de la enfermedad a pesar del tratamiento. Reciben mesilato de imatinib: 4 casos por presentar metástasis en el momento del diagnóstico, 8 casos por presentar metástasis durante el seguimiento (3 meses postdiagnóstico), y 6 casos por pertenecer a grupos de riesgo con indicación de tratamiento (5 de alto riesgo y 1 de riesgo intermedio), de los cuales ninguno presentó metástasis (Fig.80).

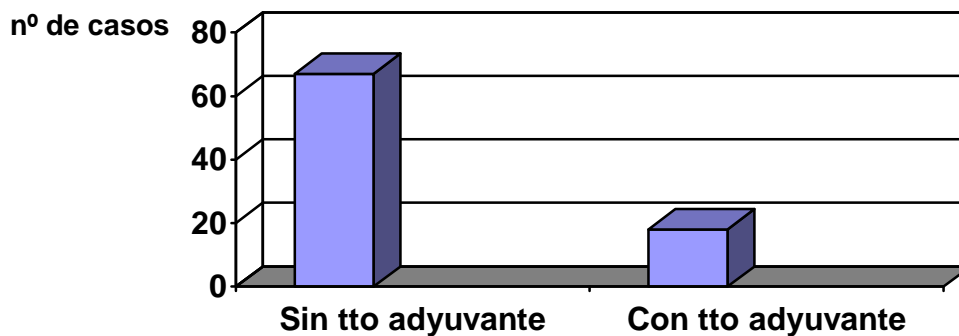
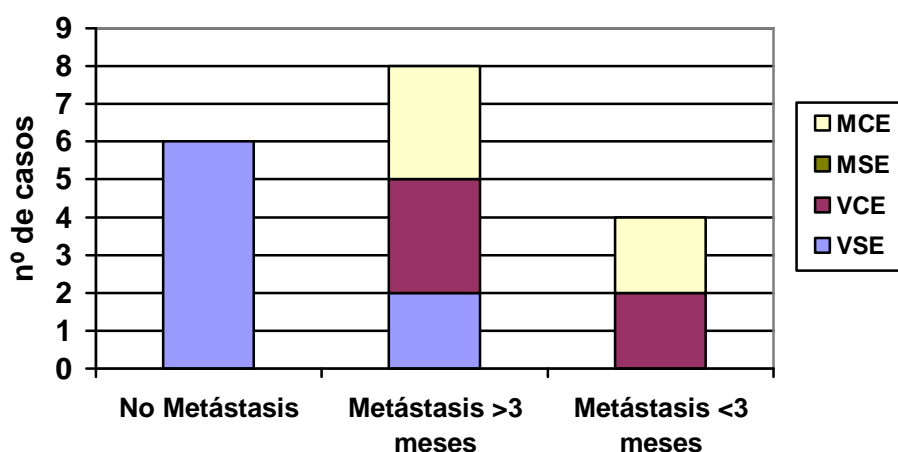


Fig.80 Distribución de los GISTs en función del tratamiento adyuvante recibido.

Cuando estudiamos el estado de los pacientes tratados observamos que los 6 pacientes de riesgo intermedio-alto, sin metástasis, se encuentran vivos sin enfermedad en el último seguimiento. Los 8 pacientes que reciben tratamiento por presentar metástasis durante el seguimiento, 3 han fallecido con enfermedad y 5 están vivos, 3 con enfermedad y 2 libres de enfermedad. Los 4 pacientes con metástasis en el momento del diagnóstico, 2 han fallecido con enfermedad y 2 están vivos con enfermedad (Fig.81).



**Fig.81** Distribución de los casos de GISTs que han recibido tratamiento adyuvante en función del momento de aparición de las metástasis y el estado del paciente (VSE: vivo sin enfermedad; VCE: vivo con enfermedad; MSE: muerto sin enfermedad; MCE: muerto con enfermedad).

La evolución (estado) de los pacientes con GISTs tratados no presenta diferencias estadísticamente significativas cuando se estudia su relación con el exón mutado ni con los niveles de expresión de miRNA. Observamos que los casos con mutación en el exón 18 de *PDGFRA* y los WT muestran una distribución similar, 2 pacientes están vivos sin enfermedad y uno ha fallecido con enfermedad. Los pacientes con mutación en el exón 9 están todos vivos (Fig.82).

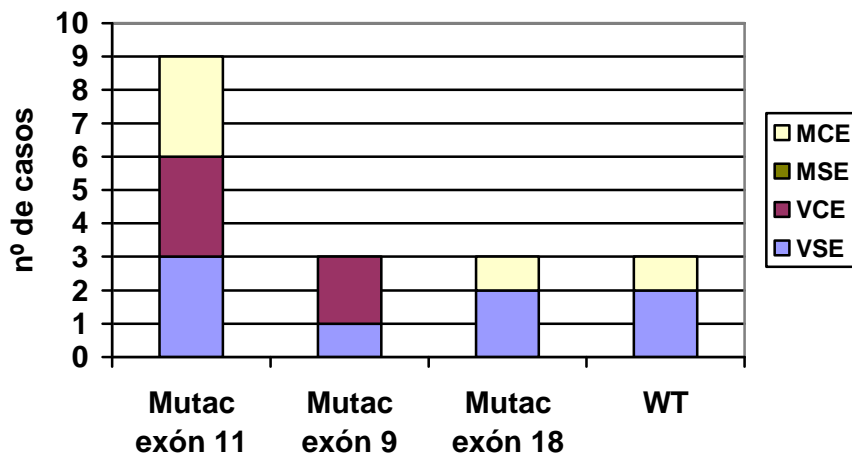


Fig.82 Distribución de los casos de GISTs que han recibido tratamiento adyuvante en función del exón mutado y el estado del paciente (VSE: vivo sin enfermedad; VCE: vivo con enfermedad; MSE: muerto sin enfermedad; MCE: muerto con enfermedad).

La supervivencia de los casos tratados no se relaciona con el exón mutado ni con los niveles de miRNA.

### METÁSTASIS:

De todos los casos de la serie, 7 casos (8,2%) se presentan como GIST metastásicos (incluye casos que presentan metástasis en el momento del diagnóstico y hasta 3 meses postdiagnóstico), 15 casos (17,6%) presentan metástasis a partir de tres meses postdiagnóstico, y 63 casos (74,1%) no presentan metástasis en el momento del último seguimiento (Fig.83).

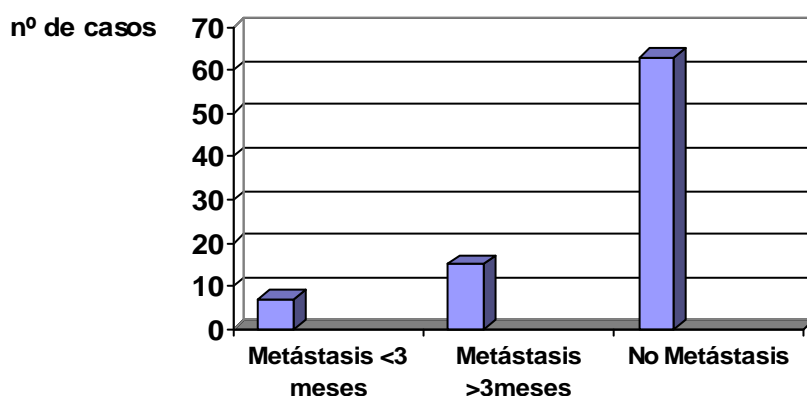


Fig.83 Distribución de los GISTs en función de la presencia de metástasis.

**a) localización:**

Los GISTs localizados en intestino delgado se asocian con más frecuencia a metástasis, con respecto a los de localización gástrica (p=0,017) (Tabla.65).

**Tabla.65** Asociación entre localización tumoral y metástasis.

	Localización		p*
	Estómago (n=37)	Intestino delgado (n=40)	
Metástasis (sí)	4 (11,4%)	14 (35%)	0,017

\*test  $\chi^2$

Si analizamos la presencia de metástasis en función de la localización observamos que los GISTs localizados en intestino delgado se asocian a la presencia de metástasis en el momento del diagnóstico y a los 3 meses postdiagnóstico (p=0,02), si los comparamos con los GISTs de localización gástrica (Tabla.66).

**Tabla.66** Asociación entre localización y presencia de metástasis.

Localización	Presencia de metástasis			p*
	No metástasis	Metástasis > 3 meses	Metástasis < 3 meses	
Estómago (n=35)	31 (88,6%)	3 (8,6%)	1 (2,9%)	0,020**
Intestino delgado (n=40)	26 (65%)	9 (22,5%)	5 (12,5%)	

\*test  $\chi^2$

\*\*test lineal por lineal

**b) grupos de riesgo:**

Con respecto a los grupos de riesgo, los GISTs de Alto Riesgo se asocian con más frecuencia a metástasis en el momento del diagnóstico y 3 meses postdiagnóstico (p<0,001).

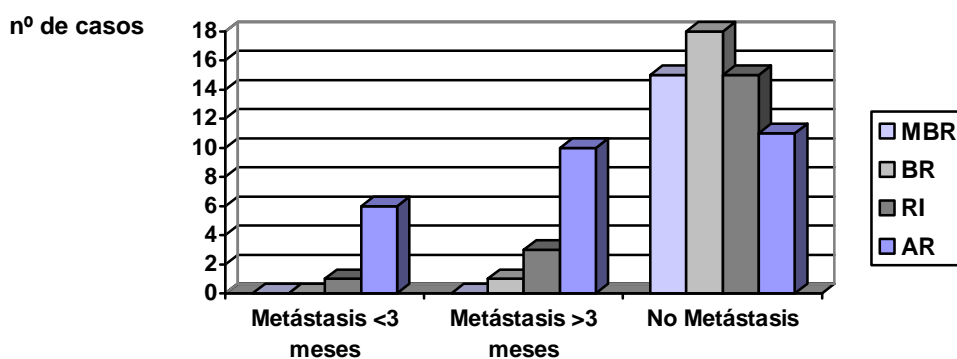
Conforme aumenta el riesgo de los GISTs observamos más tendencia a presentar metástasis en el curso evolutivo de los GISTs de nuestra serie (Tabla.67).

**Tabla.67** Asociación entre grupos de riesgo y presencia de metástasis.

	Criterios 2006				p*
	Muy Bajo Riesgo (n=15)	Bajo Riesgo (n=19)	Riesgo Intermedio (n=19)	Alto Riesgo (n=27)	
Metástasis (sí)	0 (0,0%)	1 (4,8%)	4 (19%)	16 (76,2%)	<0,001

\*test  $\chi^2$

Si representamos los resultados en un gráfico de barras observamos la tendencia ya comentada (Fig.84).



**Fig.84** Distribución de las metástasis en función del grupo de riesgo.

### c) mutaciones:

Si analizamos la presencia de metástasis en función del exón mutado observamos que los GISTs con mutación en el exón 11 de *c-KIT* no acostumbran a presentar metástasis en su evolución, aunque no se demuestran diferencias estadísticamente significativas respecto al resto de mutaciones (Fig.85).

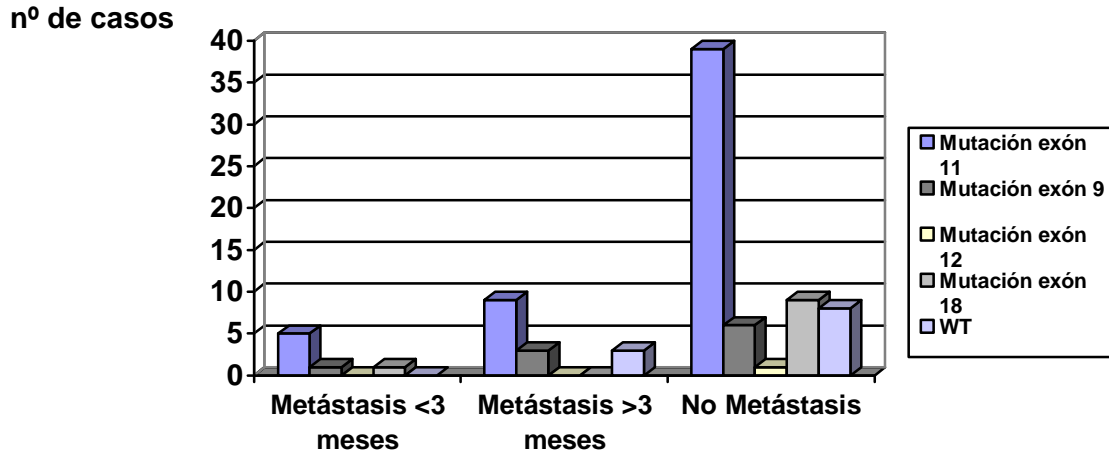


Fig.85 Distribución de las metástasis en función del exón mutado.

Los casos de GISTs con mutación en el exón 9 de *c-KIT* o en el exón 18 de *PDGFRA*, no muestran diferencias estadísticamente significativas cuando se estudia la aparición de metástasis en su evolución, al comparar con mutaciones en otros exones.

**\*distribución de las metástasis**

De los 22 casos con metástasis, con afectación aislada o combinada, 12 casos (14,1%) muestran diseminación hepática, 16 casos (18,8%) diseminación peritoneal y 5 casos (5,9%) afectación del TGI (Fig.86).

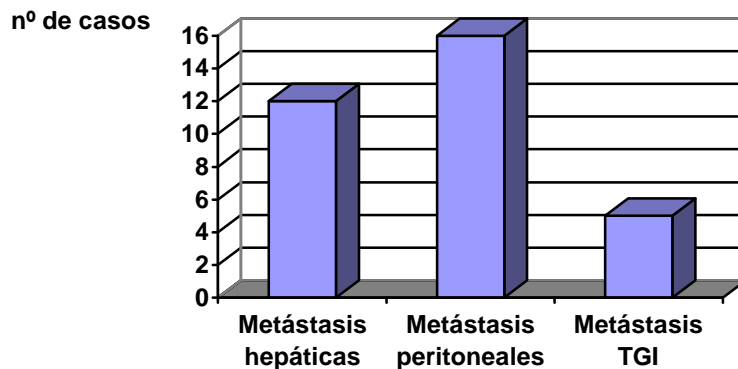


Fig.86 Distribución de las metástasis

## **GIST ASOCIADOS A OTRA NEOPLASIA**

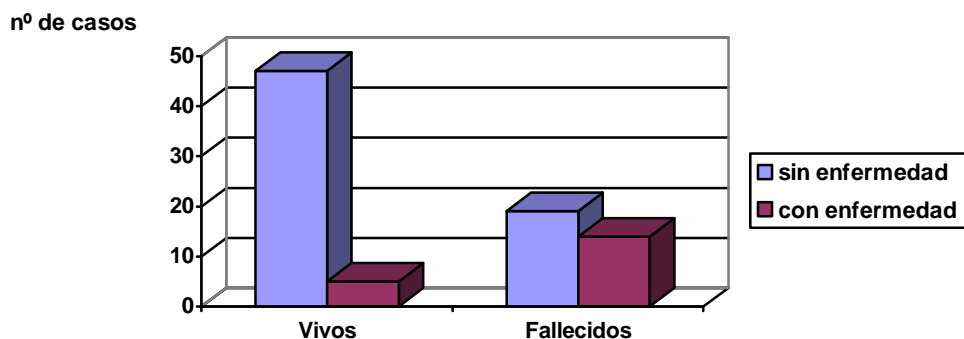
Se observa otra neoplasia asociada en 20 casos (22,9%), en 5 casos (5,7%) se trata de neoplasia sincrónica y en 15 casos metacrónica (17,2%).

Dentro de las neoplasias sincrónicas: 3 casos presentaron adenocarcinoma gástrico y 2 casos adenocarcinoma de colon. Los tres adenocarcinomas gástricos comportan el diagnóstico incidental de de GISTs gástricos de muy bajo riesgo, mientras que el diagnóstico de los dos casos de adenocarcinomas de colon se realiza de forma sincrónica al diagnóstico de dos GISTs de riesgo intermedio y alto riesgo.

Las neoplasias metacrónicas fueron: 4 casos adenocarcinoma de próstata, 2 casos adenocarcinoma pulmonar, 2 neoplasias de esófago, 2 tumores de vejiga urinaria, 1 carcinoma hepatocelular por VHC, 1 linfoma de Hodgkin, 1 neoplasia mielodisplásica refractaria al tratamiento y 1 tumor neuroendocrino mediastínico.

### **10. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA:**

En 2 casos se ha perdido el seguimiento, de los 85 casos con seguimiento clínico: 52 casos (61,2%) están vivos a fecha de último seguimiento, 47 de ellos sin enfermedad (VSE) y 5 con enfermedad asociada (VCE). Han fallecido 33 casos (38,9%), 14 casos a consecuencia de su enfermedad (MCE), y 19 casos por otras causas (MSE), sin presentar enfermedad residual o diseminada (Fig.87).



**Fig.87** Distribución de los pacientes vivos o fallecidos sin enfermedad o con enfermedad asociada.



En 73 casos se registran datos sobre procesos intercurrentes u otras enfermedades asociadas (se desconoce información en 12 casos). En los pacientes vivos sin enfermedad: 18 casos presentan buen estado general, 10 casos otras enfermedades comunes, 6 casos presentan otras neoplasias asociadas, 2 casos demencia, 2 casos infarto agudo de miocardio y 1 infarto cerebral. Los pacientes muertos sin enfermedad: 6 casos presentaron otras neoplasias, 3 complicaciones postquirúrgicas, 2 bacteriemias, 1 enfermedad de Parkinson, 1 edema agudo de pulmón y 1 caso tromboembolismo pulmonar.

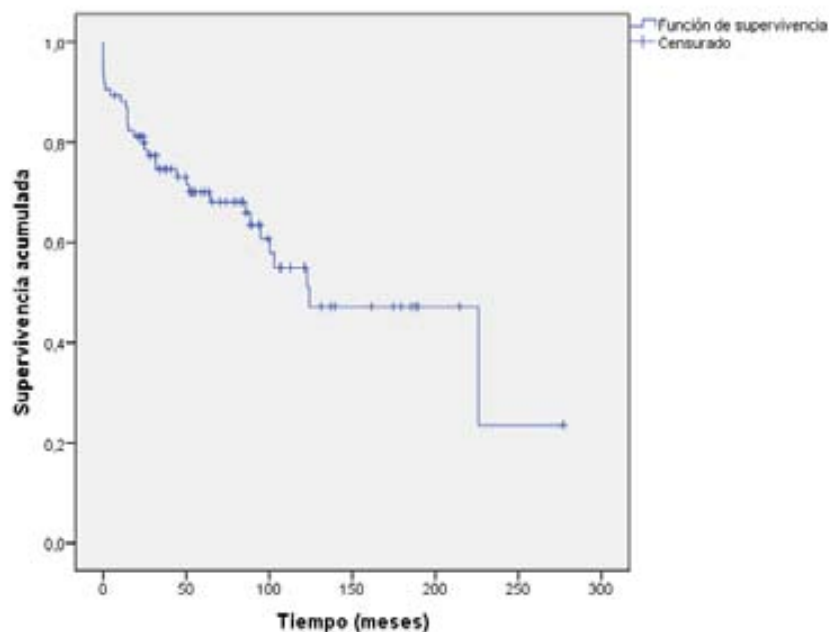
### **SUPERVIVENCIA GLOBAL**

El seguimiento presenta un rango entre 0 y 276,98 meses. Hay que destacar que 3 pacientes fallecen en el momento del diagnóstico, 1 de ellos por complicaciones quirúrgicas y 2 por otras enfermedades intercurrentes (Tabla.68).

**Tabla.68** Descriptiva estadística del tiempo de seguimiento.

	Tiempo de seguimiento
N	85
Media	69,829
Mediana	54,491
DE	59,603
Mínimo	0,00
Máximo	276,98

En nuestra serie el total de éxitos fueron 33 pacientes (38,8%). El tiempo de supervivencia global se estima con una media de 147,251 meses, IC95% = [115,25 a 179,321]. Si estudiamos la supervivencia global según las curvas de supervivencia Kaplan-Meier observamos la siguiente distribución general de los GISTs (Fig.88)



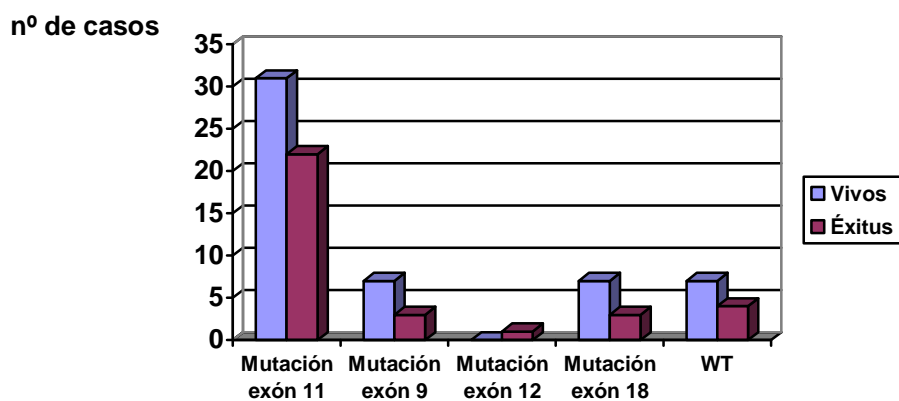
N° en riesgo      82      47      21      9      3      1      0

**Fig.88** Curva de supervivencia global en nuestra serie.

**Asociaciones con otros parámetros clínico-patológicos:**

**a) exón mutado:**

Si analizamos la supervivencia global en función del exón mutado observamos la siguiente distribución de los GISTs (**Fig.89**).



**Fig.89** Distribución de vivos y éxitus en función del exón mutado.

Quando analizamos la influencia del exón mutado sobre el tiempo de supervivencia global (**Tabla.69**), y lo representamos a partir de curvas de

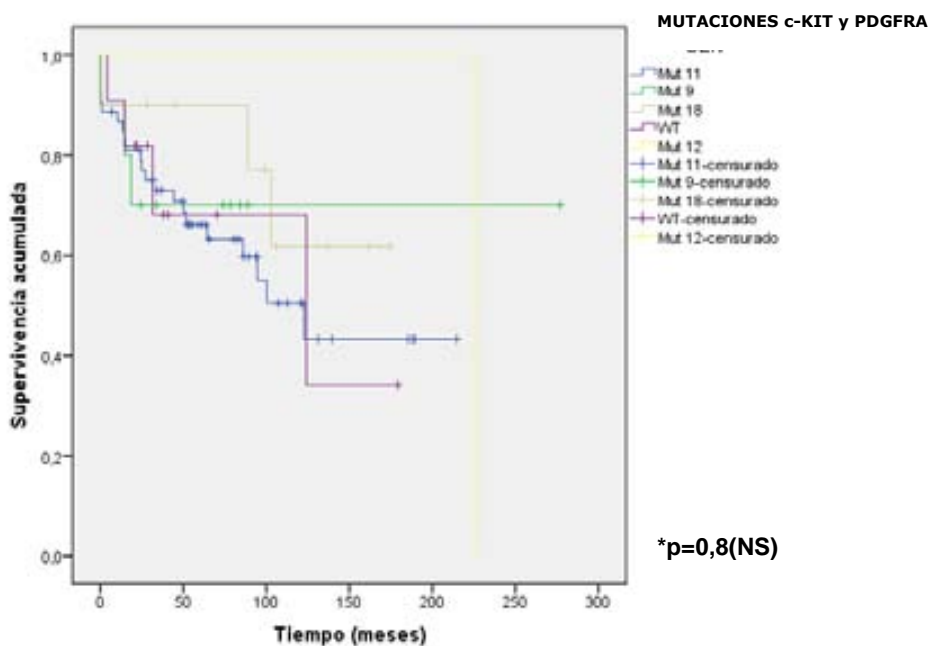
Kaplan-Meier, no observamos diferencias estadísticamente significativas entre las mutaciones estudiadas, aunque los GISTs wild-type y los que presentan mutación en el exón 11 fallecen antes (**Fig.90**).

**Tabla.69** Estimación tiempo de supervivencia en función del exón mutado.

Mutaciones	Tiempo de supervivencia		*p
	Estimación de la media	IC 95%	
Exón 11 (n=53)	122,184	93,861 a 150,507	0,8(NS)
Exón 9 (n=10)	197,233	121,679 a 272,786	
Exón 18 (n=10)	135,041	97,228 a 172,854	
WT (n=11)	109,471	61,373 a 157,569	

\*test log-rango

NS=no significación



Nº en riesgo

Exón 11 (n=53)	50	31	12	4	1	0	0
Exón 9 (n=10)	10	5	1	0	0	0	0
Exón 18 (n=10)	10	7	5	2	0	0	0
WT (n=11)	11	3	2	1	0	0	0

**Fig.90** Curvas de supervivencia global en función del exón mutado.

### b) tipo de mutación:

Si analizamos la influencia del tipo de mutación sobre el tiempo de supervivencia global (**Tabla.70**), a partir de curvas de Kaplan-Meier,

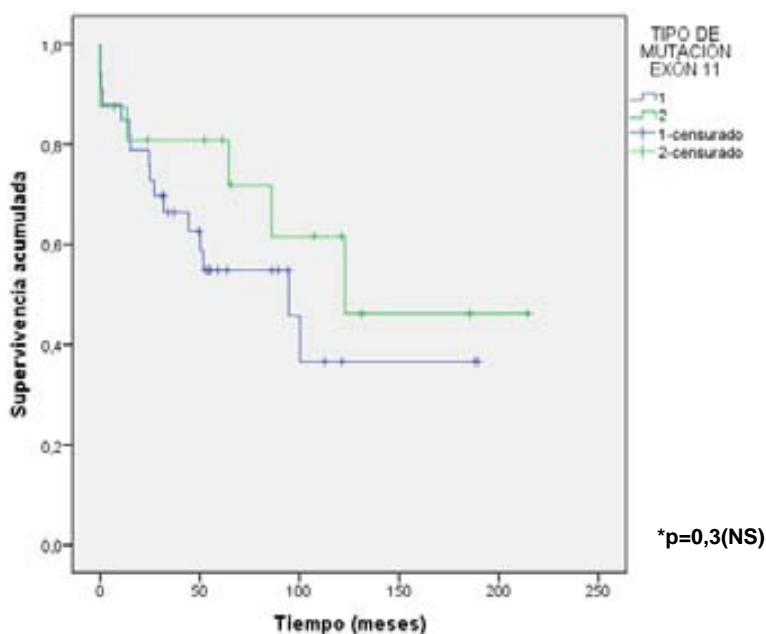
observamos que los GISTs con deleción/indel (1) en el exón 11 de *c-KIT* tienen tendencia a presentar menor supervivencia que los GISTs con mutaciones puntuales (2), aunque no se demuestran diferencias estadísticamente significativas (Fig.91).

**Tabla.70** Estimación tiempo de supervivencia en función del tipo de mutación.

Tipo de mutación	Tiempo de supervivencia		*p
	Estimación de la media	IC 95%	
Deleción/indel (n=33)	97,434	66,522 a 128,346	0,3(NS)
Mutación puntual (n=16)	133,464	85,705 a 181,223	

\*test log-rango

NS=no significación



Nº en riesgo

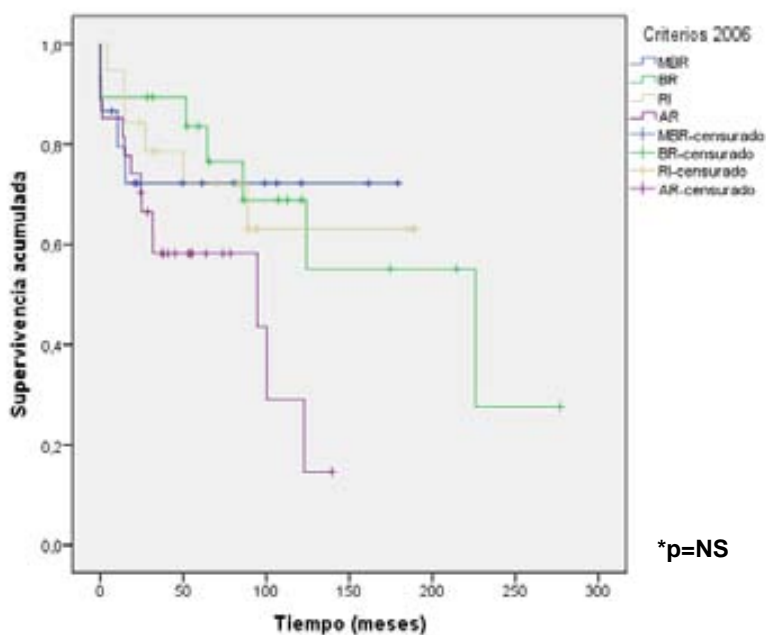
Deleción/indel (n=33)	31	16	5	2	0	0
Mutac puntual (n=16)	15	11	6	2	0	0

**Fig.91** Curvas de supervivencia global en función del tipo de mutación (1=deleción/indel; 2=mutaciones puntuales).

### c) grupos de riesgo:

Para analizar la influencia del grupo de riesgo según Miettinen-2006 sobre el tiempo de supervivencia global (Tabla.71), a partir de curvas de Kaplan-Meier,

primero analizamos cada grupo de riesgo de forma independiente, sin obtener diferencias de supervivencia con significación estadística (Fig.92). Agrupamos las categorías Muy Bajo Riesgo, Bajo Riesgo y Riesgo Intermedio y comparamos el tiempo de supervivencia con el del grupo de Alto Riesgo. Observamos que el grupo de Alto Riesgo se asocia con menor supervivencia ( $p=0,019$ ) (Fig.93).



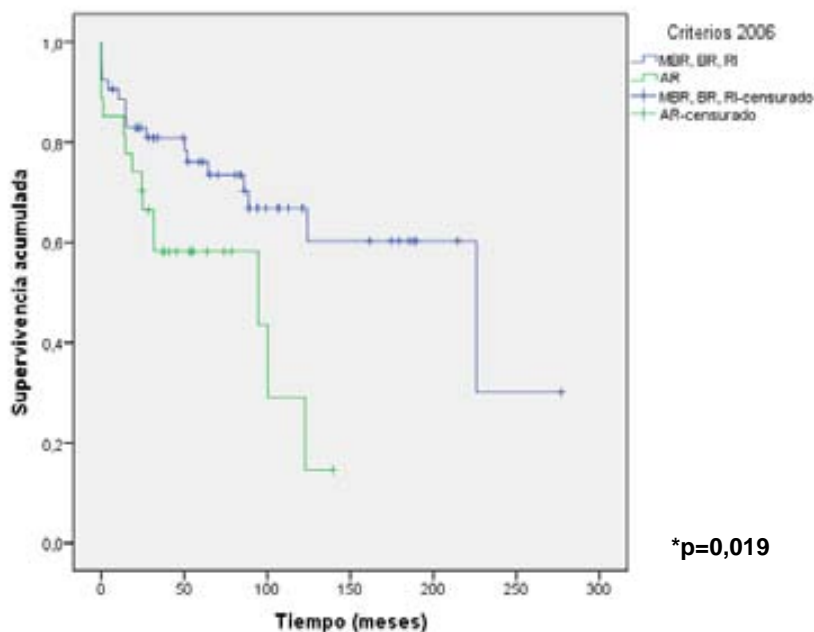
N° en riesgo								
MBR	(n=15)	15	7	4	2	0	0	0
BR	(n=19)	18	15	8	4	3	1	0
RI	(n=19)	19	12	3	3	0	0	0
AR	(n=27)	25	10	3	0	0	0	0

**Fig.92** Curvas de supervivencia global en función del grupo de riesgo, considerando los grupos de forma individual.

**Tabla.71** Estimación tiempo de supervivencia en función del grupo de riesgo.

Grupo de riesgo	Tiempo de supervivencia		*p
	Estimación de la media	IC 95%	
MBR+BR+RI (n=53)	171,211	132,214 a 210,207	0,019
AR (n=27)	72,774	51,211 a 94,337	

\*test log-rango



N° en riesgo							
MB+B+RI	(n=53)	52	34	15	9	3	0
AR	(n=27)	18	15	8	4	3	1

Fig.93 Curvas de supervivencia global en función de los grupos de riesgo agrupados.

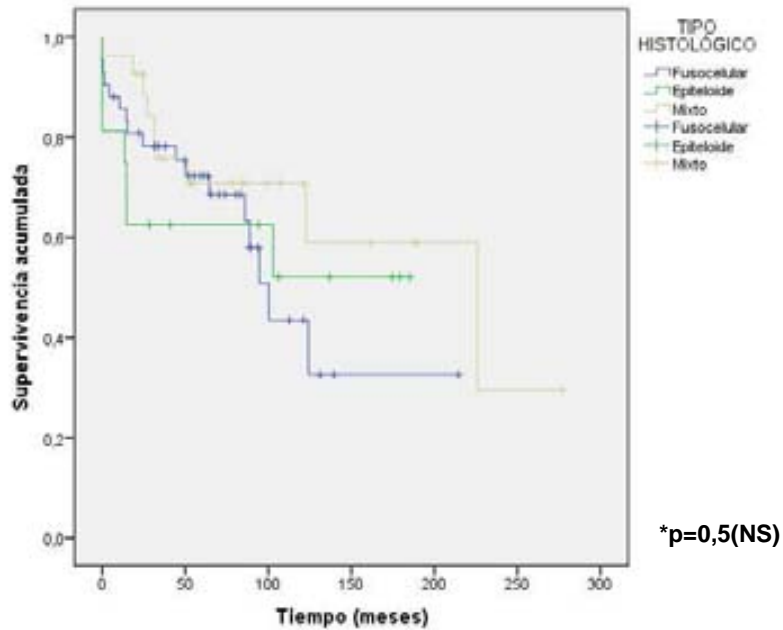
**d) tipo histológico:**

Si analizamos la influencia del tipo histológico sobre la supervivencia global (Tabla.72), a partir de curvas de Kaplan-Meier, observamos que los GISTs con morfología fusocelular (1) tienen tendencia a presentar menor supervivencia que los GISTs con morfología epitelioide (2), aunque no se demuestran diferencias estadísticamente significativas (Fig.94).

**Tabla.72** Estimación tiempo de supervivencia en función del tipo histológico.

Tipo histológico	Tiempo de supervivencia		*p
	Estimación de la media	IC 95%	
Fusocelular (n=42)	113,815	81,119 a 146,512	0,5(NS)
Epitelioide (n=16)	109,959	67,987 a 151,931	
Mixto (n=27)	170,819	120,259 a 221,378	

\*test log-rango  
NS=no significación



N° en riesgo							
Fusocelular (n=42)	40	25	7	1	1	0	0
Epitelioide (n=16)	15	7	6	3	0	0	0
Mixto (n=27)	27	16	8	5	2	1	0

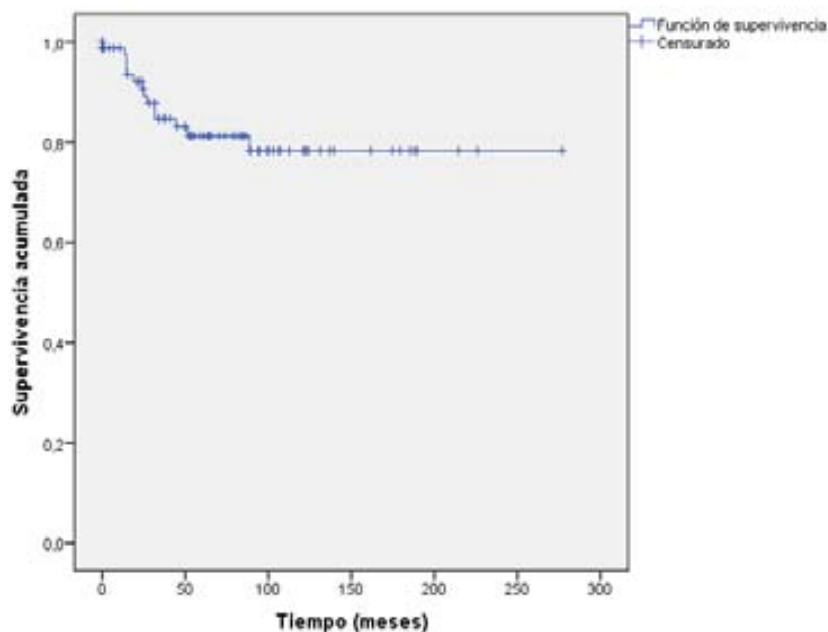
**Fig.94** Curvas de supervivencia global en función del tipo histológico.

### **SUPERVIVENCIA ESPECÍFICA**

Si estudiamos la supervivencia específica, en nuestra serie observamos 14 pacientes que han fallecido a consecuencia de la enfermedad.

El seguimiento presenta un rango entre 0 y 276,98 meses.

El tiempo de supervivencia específica se estima con una media de 224,266 meses, IC95%= [199,254 a 249,277]. Si estudiamos la supervivencia global según las curvas de supervivencia Kaplan-Meier observamos la siguiente distribución general de los GISTs (**Fig.95**).



Nº en riesgo 82 47 21 9 3 1 0

Fig.95 Curvas de supervivencia específica en nuestra serie.

**a) grupos de riesgo:**

Si analizamos la influencia del grupo de riesgo según Miettinen-2006 sobre la supervivencia específica (Tabla.73), a partir de curvas de Kaplan-Meier, observamos que el grupo de AR se asocia con menor supervivencia ( $p=0,036$ ) (Fig.96).

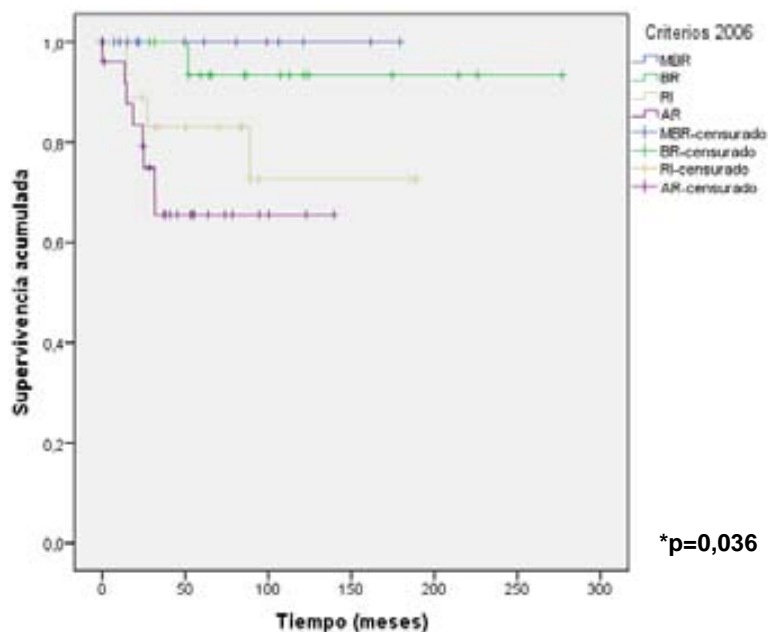
**Tabla.73** Estimación tiempo de supervivencia en función del grupo de riesgo.

Grupo de riesgo**	Tiempo de supervivencia		*p
	Estimación de la media	IC 95%	
BR (n=19)	261,967	233,533 a 290,401	0,036
RI (n=19)	150,054	116,300 a 183,809	
AR (n=27)	98,458	75,263 a 121,653	

\*test log-rango

\*\* Despreciamos el grupo de MBR (sin eventos) para calcular los valores de estimación.





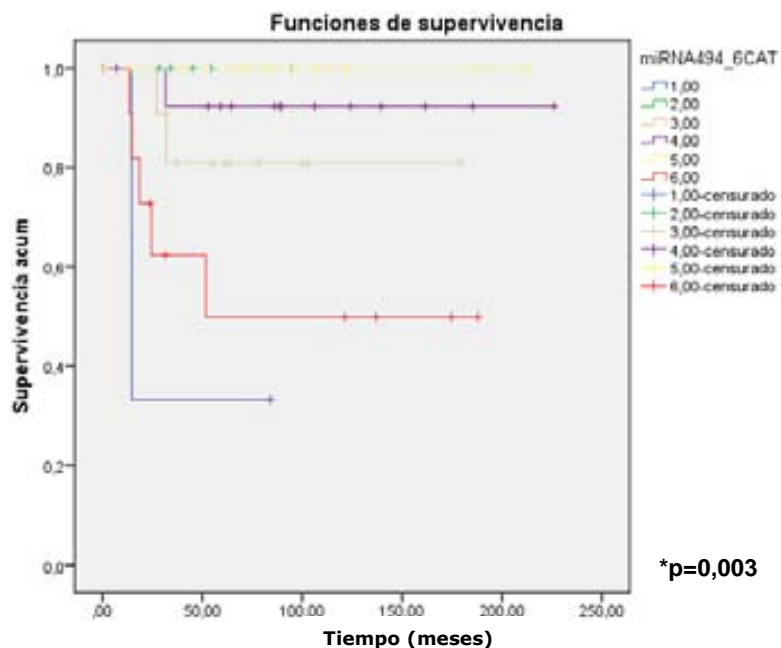
**N° en riesgo**

MBR	(n=15)	15	7	4	2	0	0	0
BR	(n=19)	18	15	8	4	3	1	0
RI	(n=19)	19	12	3	3	0	0	0
AR	(n=27)	25	10	3	0	0	0	0

**Fig.96** Curvas de supervivencia específica en función del grupo de riesgo, considerando los grupos de forma individual.

**b) niveles de expresión de miRNA:**

GISTs con niveles de expresión de miRNA-494 >1 se asocian a mayor riesgo de fallecer a causa de la enfermedad ( $p=0,003$ ), cuando comparamos con el resto de categorías que recogen los diferentes niveles de expresión (**Fig.97**).



N° en riesgo

(1)	(n=3)	3	1	0	0	0	0
(2)	(n=5)	5	2	0	0	0	0
(3)	(n=11)	11	7	3	1	0	0
(4)	(n=15)	15	12	6	3	1	0
(5)	(n=17)	17	14	6	2	0	0
(6)	(n=11)	11	5	4	2	0	0

**Fig.97** Curvas de supervivencia específica en función de los niveles de expresión de miRNA-494: **(1)**  $\leq 0,05$ ; **(2)**  $>0,05 \leq 0,12$ ; **(3)**  $>0,12 \leq 0,25$ ; **(4)**  $>0,25 \leq 0,5$ ; **(5)**  $>0,5 \leq 0,99$  y **(6)**  $>1$ .

## SUPERVIVENCIA LIBRE DE RECURRENCIA

Necesitamos conocer el tiempo que tarda en aparecer de nuevo la enfermedad o evento (recurrencia, recidiva, metástasis). Tenemos los datos necesarios para realizar el cálculo en 76 pacientes, una vez excluidos los casos que fallecen en el momento del diagnóstico (3 casos). De estos pacientes, 22 han presentado metástasis en diferentes momentos de su evolución. Excluimos los casos metastásicos en el momento del diagnóstico (6 casos) y partimos de 16 pacientes que presentarán el evento en algún momento. El tiempo de aparición de metástasis se estima con una mediana de 17 meses y un rango entre 1,80 y 79,31 meses.

### **Asociaciones con otros parámetros clínico-patológicos:**

#### **a) exón mutado:**

Si analizamos la supervivencia libre de recurrencia en función del exón mutado observamos la siguiente distribución de los GISTs: GISTs con mutación en exón 18 de *PDGFRA* no presentan metástasis, GISTs con mutación en el exón 11 de *c-KIT* presentan aparición de metástasis tardía y GISTs con mutación en el exón 9 de *c-KIT* o WT presentan aparición de metástasis más temprana, aunque no se demuestran diferencias estadísticamente significativas (Tabla.74) (Fig.98).

**Tabla.74** Estimación tiempo de supervivencia en función del exón mutado.

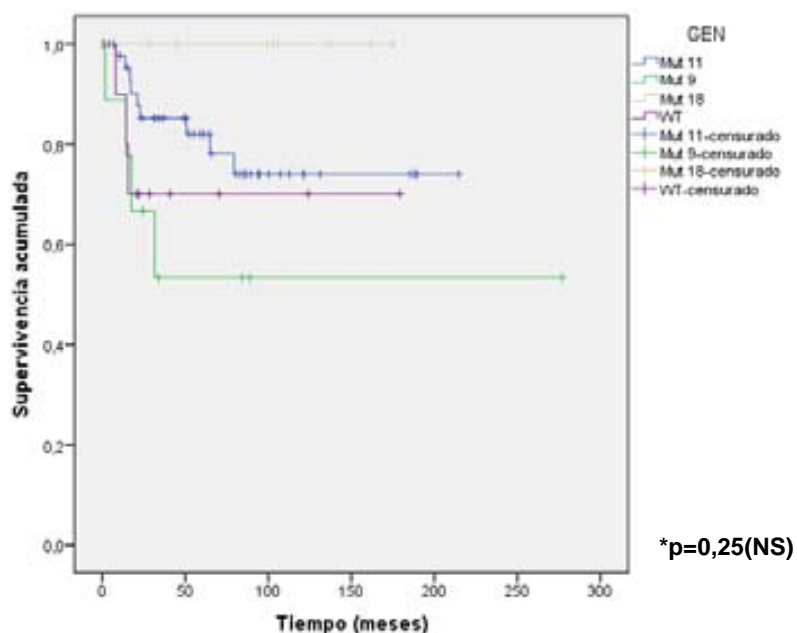
Mutaciones	Tiempo de supervivencia**		*p
	Estimación de la media	IC 95%	
Exón 11 (n=45)	168,658	142,365 a 194,951	0,25(NS)
Exón 9 (n=10)	155,714	67,704 a 243,723	
WT (n=11)	129,305	82,009 a 176,601	

\*test log-rango

\*\* falta cálculo de la mediana porque la presencia de metástasis es <50%

\*\*\*no realiza cálculo de estimaciones para las mutaciones en el exón 12 y 18 de *PDGFRA* porque no presentan eventos

NS=no significación



Nº en riesgo

Exón 11 (n=45)	45	28	10	4	1	0	0
Exón 9 (n=10)	10	3	1	0	0	0	0
Exón 18 (n=9)	9	6	5	2	0	0	0
WT (n=11)	11	3	2	1	0	0	0

**Fig.98** Curvas de supervivencia libre de recurrencia Kaplan-Meier en función del exón mutado.

**b) grupos de riesgo:**

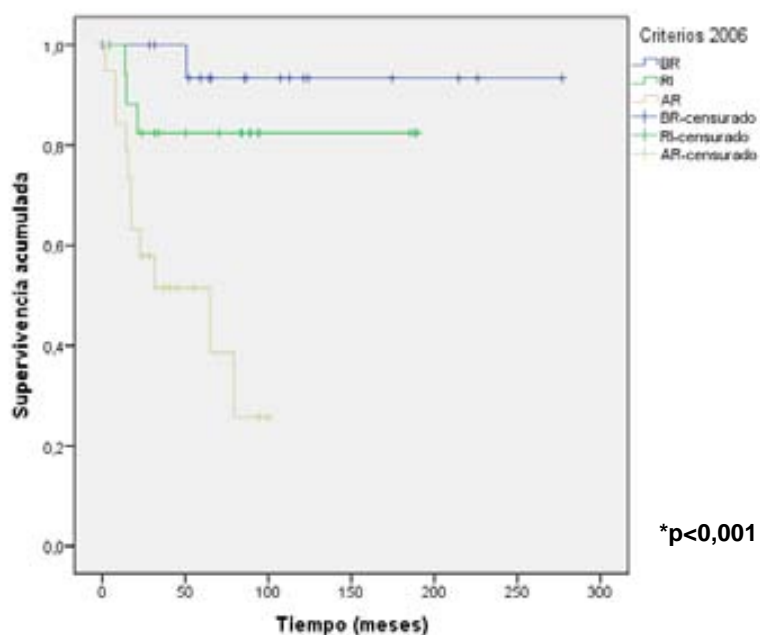
Para analizar la influencia del grupo de riesgo según Miettinen-2006 sobre la supervivencia libre de recurrencia a partir de curvas de Kaplan-Meier, despreciamos la categoría Muy Bajo Riesgo, porque no presenta metástasis y no permiten calcular la estimación de la media (Tabla.75). Observamos que el grupo de Alto Riesgo se asocia a menor supervivencia libre de recurrencia ( $p < 0,001$ ) (Fig.99).

**Tabla.75** Estimación tiempo de supervivencia en función del grupo de riesgo.

Grupo de riesgo**	Tiempo de supervivencia		*p
	Estimación de la media	IC 95%	
BR (n=18)	261,899	233,337 a 290,462	<0,001
RI (n=18)	159,040	127,676 a 190,403	
AR (n=20)	51,984	33,999 a 69,968	

\*test log-rango

\*\* Despreciamos el grupo de MBR (sin eventos) para calcular los valores de estimación.



**N° en riesgo**

MBR	(n=15)	15	7	4	2	0	0	0
BR	(n=18)	18	15	8	4	3	1	0
RI	(n=18)	18	11	3	3	0	0	0
AR	(n=20)	20	5	1	0	0	0	0

**Fig.99** Curvas de supervivencia libre de recurrencia en función del grupo de riesgo.

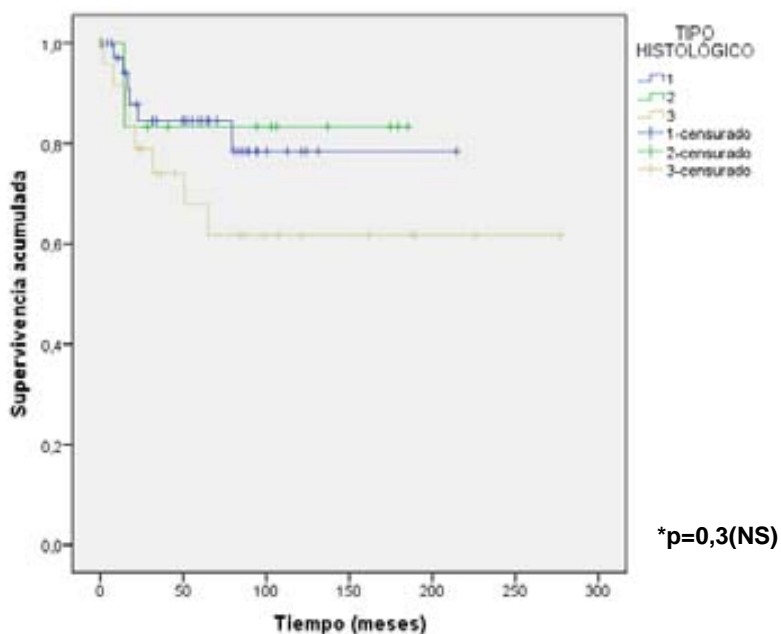
**c) tipo histológico:**

Si analizamos la influencia del tipo histológico sobre la supervivencia libre de recurrencia a partir de curvas de Kaplan-Meier, observamos que los GISTs con morfología mixta (3) tienen tendencia a presentar metástasis de forma precoz (menor SLR) (Tabla.76), aunque no se demuestran diferencias estadísticamente significativas (Fig.100).

**Tabla.76** Estimación tiempo de supervivencia en función del grupo del tipo histológico.

Tipo histológico	Tiempo de supervivencia		*p
	Estimación de la media	IC 95%	
Fusocelular (n=42)	175,662	147,453 a 203,870	0,3(NS)
Epiteliode (n=16)	156,863	120,830 a 192,897	
Mixto (n=27)	182,246	129,385 a 235,108	

\*test log-rango  
NS=no significación



Nº en riesgo	0	50	100	150	200	250	300
Fusocelular (n=38)	38	22	6	1	1	0	0
Epiteliode (n=13)	13	7	6	3	0	0	0
Mixto (n=25)	25	12	7	5	2	1	0

**Fig.100** Curvas de supervivencia libre de recurrencia en función del tipo histológico (1=fusocelular; 2=epiteliode; 3=mixto).

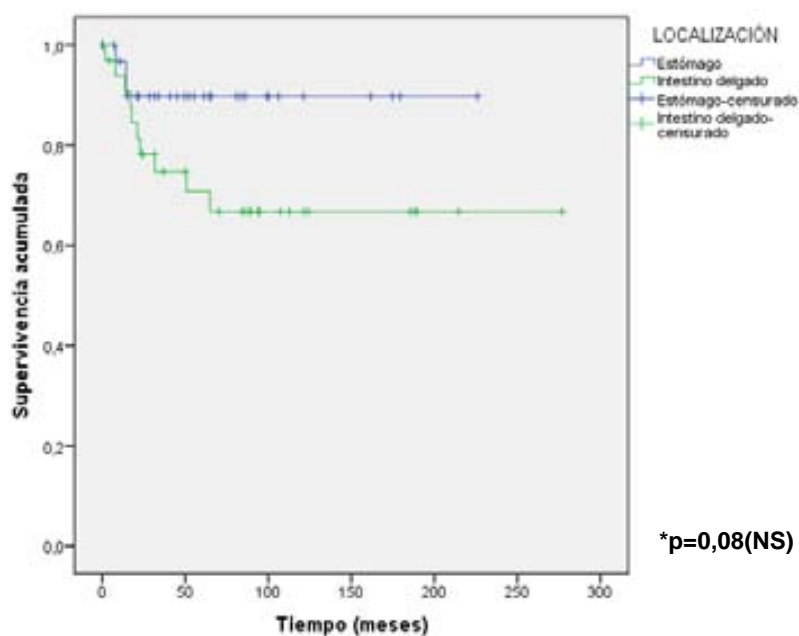
**d) localización:**

Los GISTs localizados en intestino delgado tienen tendencia a presentar más metástasis (menor SLR) que los localizados en estómago, aunque no se demuestran diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,08$ ) (Tabla.77) (Fig.101)

**Tabla.77** Estimación tiempo de supervivencia en función de la localización.

Localización	Tiempo de supervivencia		*p
	Estimación de la media	IC 95%	
Estómago (n=33)	204,103	180,652 a 227,554	0,08(NS)
Intestino delgado (n=34)	193,876	151,320 a 236,432	

\*test log-rango  
NS=no significación



**N° en riesgo**

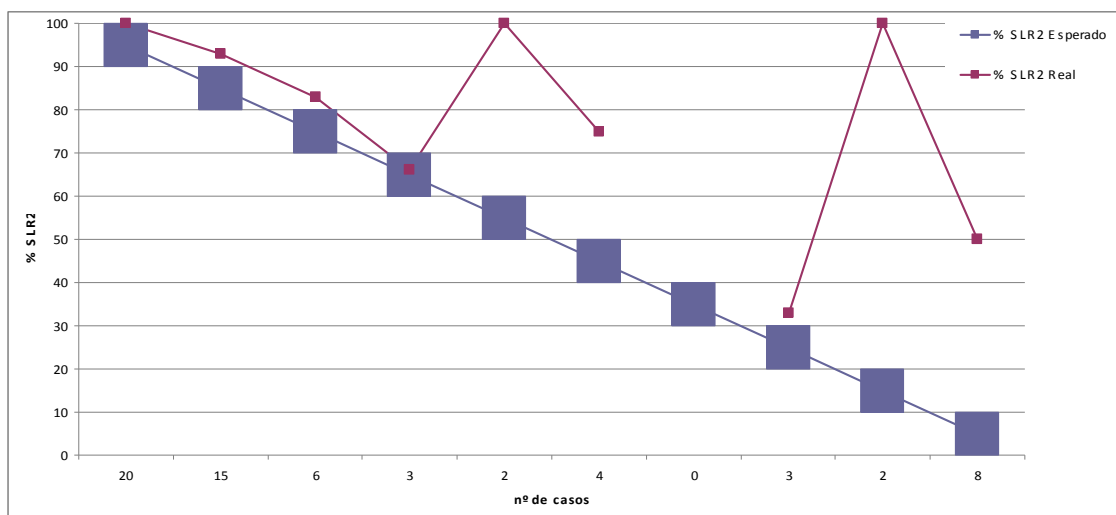
Estómago (n=33)	33	16	7	4	1	0	0
ID (n=34)	34	20	9	5	2	1	0

**Fig.101** Curvas de supervivencia libre de recurrencia en función de la localización (ID=intestino delgado).

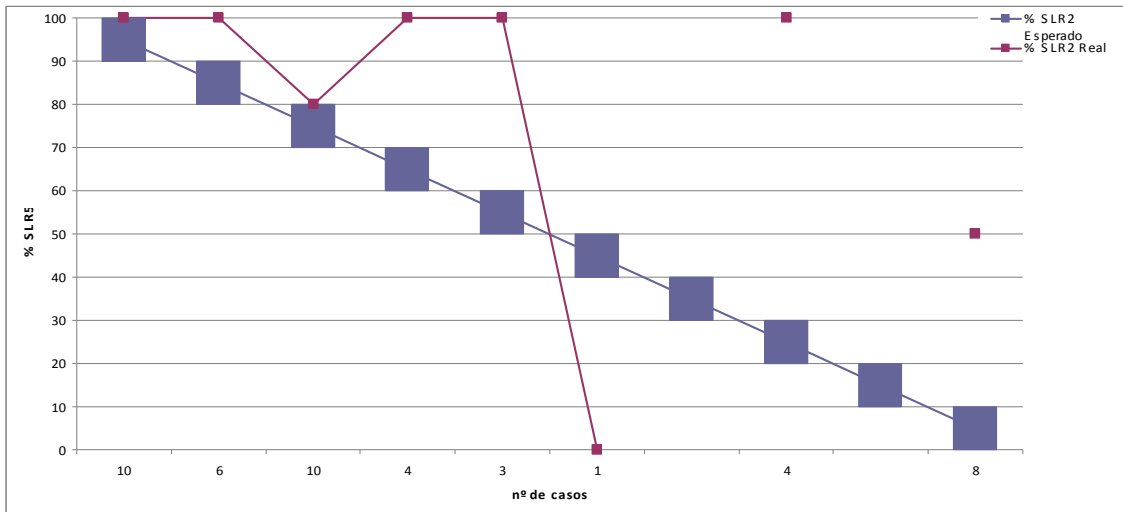
## 11. VALIDACIÓN EN NUESTRA SERIE DE LA PREDICCIÓN DEL NOMOGRAMA:

Comparamos la predicción de SLR2 y SLR5 obtenida de aplicar el nomograma del MSKCC con lo que sucede en nuestra serie. Para llevar a cabo dicha comparación realizamos subgrupos de probabilidad, a intervalos del 10%, y analizamos como se distribuyen los casos en función de la probabilidad esperada (% obtenida del nomograma) y la observada (% real). Observamos que las predicciones tienden a cumplirse en los casos con alta probabilidad de SLR2 (80-100%). No sucede así en los casos con baja probabilidad de SLR2, debido al pequeño tamaño de la muestra cuando realizamos subgrupos de probabilidad, a intervalos de 10%, para comparar el valor de SLR2 esperado con el valor de SLR2 real (Fig.102).

En la SLR5 no se demuestra correlación por el pequeño tamaño de la muestra, cuando el tiempo de seguimiento es de 5 años (Fig.103).



**Fig.102** Gráfico comparativo de la probabilidad de SLR2 según predicción del nomograma respecto a la realidad.



**Fig.103** Gráfico comparativo de la probabilidad de SLR5 según predicción del nomograma respecto a la realidad.



## **DISCUSIÓN**



## **1. PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS RELACIONADOS CON GIST:**

Estudios de población recientes han indicado que los GISTs son más frecuentes de lo que se consideraba. La incidencia de GISTs en España se estima en 457 nuevos casos al año, es decir 1,11 casos por cada 100.000 habitantes (119).

En nuestra serie, se observa que los GISTs predominan ligeramente en hombres (54%) respecto a las mujeres (46%). Afectan con más frecuencia a pacientes de edades comprendidas entre 51 y 80 años, con una edad media de 65 años (rango 27-90 años). No hemos registrado ningún caso en menores de 20 años, coincidiendo con las observaciones de diferentes autores tras estudiar largas series de GISTs (42, 130).

Los síntomas de presentación de los GISTs suelen ser inespecíficos, y muchas veces dependen del tamaño y la localización. En general, se presentan con astenia, dolor abdominal u oclusión; cuando se realizan estudios diagnósticos complementarios se detecta anemia secundaria a hemorragia digestiva (130). En nuestra serie el síntoma más frecuente de debut fue la hemorragia digestiva en 32,9% de los casos, seguido de dolor abdominal o epigastralgia en el 15,7% y clínica de suboclusión intestinal en el 7,1%. Según describen estudios del grupo de Ueyama y Foo hay casos de GISTs de pequeño tamaño que se descubren de forma incidental (27, 120). En nuestra serie el diagnóstico de GIST fue un hallazgo incidental durante el control o cirugía por otra causa no relacionada en el 22,9% de los casos.

La localización tumoral, parámetro de valor pronóstico incorporado en los criterios de Miettinen 2006, observada en los GISTs de nuestra serie difiere ligeramente de la recogida en la bibliografía por los grupos de Miettinen y Corless, que observan el estómago como localización más frecuente (25, 29, 44, 130-131). En nuestra serie no sucede así, encontramos un ligero predominio de GISTs localizados en intestino delgado, el 46%, respecto al 42,5% en estómago. Las otras localizaciones observadas, 5,74% a nivel colorectal y 5,74% a nivel extragastrointestinal (peritoneo, epiplón y pelvis), sí concuerdan con las observaciones de los grupos anteriormente citados.

El tamaño tumoral, parámetro clásico con valor pronóstico, es variable y puede oscilar entre 0,3 y 38 cm (27-28). En nuestra serie oscila entre 1 y 26 cm, con una media de 7,87 cm. Siguiendo la clasificación de Miettinen la mayoría de

casos presentan un tamaño entre 5 y 10 cm. Todos los casos se han presentado como tumores únicos.

El recuento de mitosis en 50 CGA microscópicos, en nuestra serie oscila entre 0 y 110 mitosis/50CGA, con una media de 7, y la mayoría de casos se distribuyen en el intervalo de menos de 5 mitosis/50CGA.

Según los grupos de riesgo determinados a partir de criterios de Miettinen en 2006, la mayoría de GISTs en nuestra serie pertenecen al grupo de alto riesgo (35,4%), seguidos de riesgo intermedio (23,2%) y bajo riesgo (23,2%), y menos frecuente el grupo de muy bajo riesgo (18,3%), influido por el predominio de casos localizados en intestino delgado y tamaño tumoral comprendido entre 5-10 cm. Los 5 casos de GISTs extraintestinales, en función del tamaño y recuento de mitosis, cumplen criterios para incluirlos dentro del grupo de alto riesgo.

Los GISTs pueden presentar un amplio espectro histológico en función de la morfología celular (28). En nuestra serie predomina el tipo fusocelular (48,3%) seguido del mixto (32,2%) y el epitelioides (19,5%), tal y como describen Miettinen y Lasota (25). Se han descrito múltiples parámetros histológicos que pueden presentar los GISTs, destacan por orden de frecuencia: marcada vascularización (82,7%), necrosis (54%), empalizadas nucleares (47,2%), atipia (40,2%), vacuolización citoplasmática (31%), matriz mixoide (25,2%) y fibras esquinoides (15%), entre otros. En nuestra serie observamos que los GISTs localizados en intestino delgado se asocian a morfología de tipo mixto ( $p=0,006$ ), a diferencia de lo observado por el grupo de Fletcher, que asocia la localización intestinal con morfología fusocelular (1, 16, 31, 132).

Suster describe en GISTs con morfología epitelioides la presencia de matriz mixoide y vacuolización citoplasmática y en los de morfología fusocelular la presencia de empalizadas (40, 133). Estas asociaciones se confirman en los casos de nuestra serie. Los casos de GISTs que en nuestra serie han presentado morfología epitelioides se asocian a matriz mixoide ( $p=0,001$ ) y vacuolización citoplasmática ( $p=0,004$ ). Ambos hallazgos han sido mucho más frecuentes en tumores localizados en el estómago (45,9 y 51,4% respectivamente) que en los tumores de intestino delgado (10 y 15%) ( $p=0,001$ ).

Adicionalmente, observamos que los GISTs que presentan matriz mixoide ( $p=0,028$ ) y vacuolización citoplasmática ( $p=0,035$ ) se asocian a grupo de alto riesgo, hallazgo no descrito en la bibliografía consultada. Aunque podría explicarse de forma indirecta, si como observa Haller, la morfología epitelioides se asocia a curso evolutivo más agresivo, y nosotros observamos que la matriz mixoide y la vacuolización citoplasmática se asocian con frecuencia al tipo histológico epitelioides (111).

Por otra parte, hemos visto que los GISTs con morfología fusocelular se asocian a la presencia de empalizadas nucleares. Este hallazgo también fue observado por Miettinen en su serie de 1765 de GISTs gástricos (92). Además, en nuestra serie, observamos que los GISTs que presentan empalizadas nucleares suelen tener atipia nuclear ( $p=0,048$ ), a diferencia de los hallazgos descritos por Miettinen en la citada serie de GISTs gástricos, que describe atipia nuclear asociada a la morfología epitelioides (92).

La necrosis ha sido considerada como un parámetro pronóstico para clasificar los GISTs en grupos de bajo y alto riesgo, además de la morfología, celularidad, atipia, tamaño, número de mitosis e índice proliferativo (39-41). Encontramos que los GISTs que pertenecen a grupos de riesgo intermedio y alto riesgo presentan con más frecuencia necrosis ( $p=0,0001$ ), que los grupos de bajo y muy bajo riesgo.

En esta serie se ha intentado estudiar la posible asociación de los parámetros clínico-patológicos con expresión de marcadores inmunohistoquímicos, estado mutacional, niveles de expresión de miRNA, evolución y pronóstico de los GISTs, tal y como se comenta a continuación.

## **2. MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS RELACIONADOS CON GIST:**

Todos los casos de la serie han mostrado positividad para c-kit. Si valoramos la intensidad de tinción observamos que el 78,2% muestra una positividad intensa (3+), el 11,5% positividad moderada (2+) y 10,3% positividad débil (1+) (2, 4, 32-33). El patrón de tinción se puede observar como detalla Hornick, a nivel de membrana, citoplasma y paranuclear (Golgi) (134). Miselli y Emile relacionan el patrón de tinción paranuclear con la acumulación de proteína c-kit alterada, que permanece secuestrada en el retículo endoplásmico, en GISTs con mutaciones

activadoras, y proponen que pueda ser utilizado como marcador de mutaciones de *c-KIT* (34-35). En nuestra serie 37,9% de los GISTs presentan patrón de tinción Golgi (22,9% de forma difusa y 14,9% de forma focal). Se ha observado que los casos que presentan positividad para *c-kit* con patrón de Golgi pertenecen con más frecuencia al grupo de alto riesgo ( $p=0,021$ ). Otros autores han observado este patrón de tinción tanto en GISTs con mutaciones en *c-KIT* como *PDGFRA* y wild-type. Jaramillo observa asociación estadísticamente significativa con mutaciones en el exón 11 y 9 de *c-KIT*. Sin embargo, en nuestra serie no se han observado diferencias estadísticamente significativas cuando se estudia la asociación entre expresión de *c-kit* con patrón de Golgi y mutaciones de *c-KIT* o *PDGFRA* (36).

Observamos que los GISTs localizados en intestino delgado ( $p=0,016$ ), así como los GISTs con morfología fusocelular ( $p=0,035$ ), presentan con frecuencia positividad con marcada intensidad (3+) para *c-kit*.

Se ha observado positividad para CD34 en el 80,5% de los GISTs de la serie, hallazgo que concuerda con la frecuencia descrita en la literatura por Miettinen y Lasota (4, 6, 29, 42). Los casos localizados en estómago se asocian con más frecuencia a expresión de CD34 ( $p=0,0001$ ) que los localizados en intestino delgado, tal y como describen los grupos de Miettinen y Hasegawa (135).

Observamos que los GISTs con expresión de CD34 tienen tendencia a acumularse en el grupo de alto riesgo, aunque no se demuestran diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,091$ ).

La tinción para otros marcadores muestra gran variabilidad según la bibliografía consultada. En nuestra serie observamos expresión para enolasa en el 77% de los GISTs, actina en el 11%, y desmina y proteína S-100 en el 9,2% respectivamente, que concuerda con los hallazgos del grupo de Lielg (38).

### **3. VALOR DEL ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN Ki-67 EN GIST:**

Diferentes estudios han confirmado el valor pronóstico de Ki-67(anticuerpo monoclonal MIB-1) en GISTs (51-52). Las diferencias entre estudios publicados se encuentran en establecer el valor de corte del índice Ki-67, que varía entre 4,5 y 10%. Nakamura propone la utilidad del índice de proliferación Ki-67 en la predicción de la evolución clínica (53); mientras que para Wong la

determinación del índice de proliferación nuclear con Ki-67 es más fiable que el número de mitosis (54). Se han asociado valores de expresión >10% se asocian a peor pronóstico, con más probabilidad de presentar metástasis y mortalidad asociada al tumor (55, 136-137).

En nuestra serie la determinación de Ki-67 se ha realizado con el anticuerpo monoclonal MM-1 de Novocastra. El rango de expresión de Ki-67 se encuentra entre 1-25%, con una media de 4%. Los casos se distribuyen con más frecuencia en el intervalo entre 1-2%. En 7 casos (8%) la tinción no fue valorable, 35 casos (40,2%) mostraron una expresión del 1%, 16 casos (18,4%) del 2%, 17 casos (19,5%) entre 3-5%, y 12 casos (13,6%) una expresión superior al 5%.

Observamos que GISTs del grupo de AR se asocian con más frecuencia a expresión elevada de Ki-67 ( $p=0,0001$ ), con una expresión media de 8,04%. Estos hallazgos serían concordantes con los del grupo de Rudolph que reporta que determinaciones >10% se asocian a peor pronóstico (138). Sin embargo, tal y como describe Liang, resulta difícil establecer un valor de corte absoluto para Ki-67 (55). Este autor encuentra en su serie GISTs de bajo riesgo con expresión elevada de KI-67, que evolucionan de forma desfavorable.

#### **4. ESTADO MUTACIONAL:**

Desde que en 1998 el grupo de Hirota (5) descubrió las mutaciones del gen *c-KIT* y su relación patogénica con los GIST, se han realizado numerosos estudios en esta misma dirección (76-77, 139-140), con resultados variables en cuanto al estudio molecular de las mutaciones y la incidencia sobre el pronóstico, comportamiento del tumor y correlación con los diferentes parámetros clínicos (61, 98, 141). Muchas de las diferencias son debidas a la heterogeneidad metodológica del estudio planteado por cada grupo: algunos estudios no incluyen estudio mutacional de *PDGFRA*; uso de técnicas con menor sensibilidad que la secuenciación; falta de selección del tejido tumoral (microdissección), etc. Estos factores influyen de forma directa en la detección de mutaciones, y por tanto podrían justificar la variabilidad de resultados reportados en la bibliografía.

Los resultados obtenidos en nuestra serie, al realizar el estudio mutacional, concuerdan con las observaciones de Lasota y Heinrich sobre que las mutaciones de *c-KIT* y *PDGFRA* son mutuamente excluyentes (66, 142). Aunque Emile describe mutaciones dobles en el exón 11 de *c-KIT* en el 9% de los casos de su serie (143), otros autores atribuyen sus hallazgos a artefactos de la PCR cuando se trabaja con DNA extraído de parafina (69). En nuestra serie de 87 GISTs diagnosticados todos en nuestro centro, la frecuencia total de mutaciones detectada es del 87,3%, similar a la descrita en la bibliografía por los grupos de Lasota y Taniguchi. Las mutaciones detectadas se distribuyen: 74,7% en el gen *c-KIT* y 12,6% en el gen *PDGFRA*. Cuando analizamos el exón mutado observamos la siguiente distribución de mutaciones: 63,2% en el exón 11 de *c-KIT*, 11,5% en el exón 9 de *c-KIT*, 1% en el exón 12 de *PDGFRA* y 11,5% en el exón 18 de *PDGFRA*. Estos resultados también concuerdan con los publicados, de manera que el exón 11 de *c-KIT* es el que se encuentra mutado con mayor frecuencia. Se observa que la frecuencia de mutaciones en el exón 18 de *PDGFRA* es ligeramente superior a la descrita en la bibliografía (6, 144). Si nos centramos en las mutaciones del exón 11, caracterizado por la heterogeneidad de las mutaciones encontradas, observamos que según el tipo de mutación, las más frecuentes son el grupo de deleciones/deleciones-inserciones en un 63,6% de los casos, seguido de mutaciones puntuales en el 29,1% de los casos, duplicaciones en el 5,5% y tan sólo un 1,8% representando el grupo de inserción/inversión. Estas mutaciones afectan codones de la región hot-spot, codones 557-559, en el 21,8% de los casos con mutación en el exón 11. Estos resultados concuerdan con los descritos en la bibliografía (6, 69, 74, 139, 145-146). Dentro del grupo de deleciones la más frecuente detectada en nuestra serie ha sido *p.W557\_K558del* en 4 casos y *p.D579del*, tal y como describen Antonescu y Lasota (68-69). Como mutaciones puntuales se detectan con más frecuencia *p.L576P* en 4 casos y *p.V560D* en 3 casos, que concuerda con las halladas por Lasota (6).

Aunque la integración clínico-patológica de los datos del estudio mutacional de los genes *c-KIT* y *PDGFRA* es compleja, muchos grupos demuestran que los resultados pueden estar relacionados con diferencias en el comportamiento clínico y evolutivo de los tumores (145, 147-148).



En nuestra serie se han comparado las mutaciones por separado de los diferentes exones afectados y los grupos de mutaciones que en diferentes estudios han demostrado un comportamiento más agresivo, resistencia al tratamiento o mayor índice de recidiva: la delección en codones de la región *hot spot* 557\_559 del exón 11 de *c-KIT* (74, 146), la duplicación de p.A502\_Y503 del exón 9 de *c-KIT* (68) y la mutación p.D842V del exón 18 del gen *PDGFRA* (66, 144).

Cuando estudiamos la asociación de las mutaciones con otros parámetros observamos una asociación estadísticamente significativa entre el grupo de GISTs con mutación del exón 11 y el grupo de edad más avanzada ( $p=0,023$ ), coincidiendo con las observaciones del estudio de Taniguchi(77).

La mutación del exón 11 es más frecuente en mujeres ( $p=0,036$ ), en GISTs localizados en intestino delgado ( $p=0,056$ ), y de morfología fusocelular ( $p=0,006$ ), estos dos últimos hallazgos coinciden con los observados por el grupo de Waldermann; y Lasota observa además, que es más frecuente sobre todo cuando se afecta el codón 558 (71, 75). Como dato curioso, en nuestra serie, observamos que las mujeres tienen 2,6 veces más riesgo de presentar mutación del exón 11 que los hombres, hallazgo no reportado en la bibliografía. Respecto al tipo de mutación, las delecciones/indel tienen más tendencia a distribuirse en GISTs localizados en intestino delgado, mientras que las mutaciones puntuales se asocian a GISTs de localización gástrica ( $p=0,481$ ) (72-76). Las delecciones/indel las encontramos asociadas a GISTs de alto riesgo ( $p=0,043$ ), como describe la literatura (73), principalmente cuando afectan los codones *Trp557* y *Lys558*. Este tipo de mutaciones son más frecuentes en GISTs con morfología fusocelular y de tipo mixto, aunque en nuestra serie no encontramos diferencias estadísticamente significativas (76).

Cabe señalar que no observamos diferencias estadísticamente significativas cuando estudiamos la mutación del exón 11 en función de los diferentes grupos de riesgo, aunque observamos que los casos con mutación en la región *hot-spot* tienen tendencia a distribuirse en GISTs de riesgo intermedio o alto riesgo. Este hallazgo concuerda con las descripciones de la literatura que señalan que las mutaciones del exón 11 se asocian a malignidad como edad avanzada, tamaño tumoral grande, índice mitótico elevado, presencia de necrosis tumoral, hemorragia intratumoral y supervivencia reducida a los 5 años (76-77). Quizá la

gran heterogeneidad de mutaciones que puede presentar el exón 11 podría influir en los resultados cuando se analiza su distribución según los grupos de riesgo. Dado que existen mutaciones asociadas a evolución favorable o desfavorable, si no se estudian por separado, en función del tipo predominante en cada serie podría ser responsable de la variabilidad de resultados.

Hemos observado que los GISTs con mutación en el exón 11 se asocian a una expresión de c-kit con intensidad marcada ( $p=0,001$ ), con respecto al resto de mutaciones y GISTs wild-type.

Si nos centramos en el exón 9, vemos que se trata de un grupo homogéneo, en que todos los casos han presentado la mutación *p.A503\_Y504dup*. En nuestra serie observamos que estos casos se localizan con más frecuencia en intestino delgado ( $p=0,001$ ) y presentan morfología de tipo mixto ( $p=0,02$ ), tal y comenta el grupo de Antonescu (65, 68). Los grupos de Lasota, Hirota y Sakurai describen que la mutación del exón 9 se asociada a peor evolución clínica (65, 114). Aunque en nuestra serie no observamos diferencias al comparar los grupos de riesgo, destaca que no se observa ningún caso en el grupo de muy bajo riesgo.

Los GISTs con mutación del exón 9 se asocian a valores de expresión de Ki-67 elevados ( $p=0,007$ ), con una media de 7%, con respecto a las otras mutaciones.

Sólo encontramos 1 caso con mutación del exón 12 de *PDGFRA* con la delección *p.S566\_E571*.

En 10 GISTs se detecta mutación en el exón 18 de *PDGFRA*, 8 de ellos presentan la mutación *p.D842V*, 1 caso la mutación *p.D842\_H845* y otro caso la mutación *p.D842Y*. Estos hallazgos concuerdan con los descritos en la literatura. En nuestra serie observamos, como curiosidad, que los hombre tienen más riesgo ( $OR=11,5$ ) de presentar la mutación del exón 18 que las mujeres ( $p=0,017$ ), sin haber encontrado descripciones al respecto en la literatura.

Los GISTs con mutación en el exón 18 se localizan con más frecuencia en estómago ( $p=0,017$ ) y se asocia a morfología epitelioide ( $p=0,002$ ), con respecto al resto de mutaciones, tal y como describen Heinrich y Debiec-Rychter 2004 (66, 121). Los casos de nuestra serie con esta mutación muestran una tendencia a distribuirse en el grupo de MBR, aunque no se

demuestran diferencias estadísticamente significativas. Estos hallazgos coinciden con los descritos por Kontogianni-Katsarou y Waldermann (74, 81).

Los casos con mutación en el exón 9 de *c-KIT* y en el 18 de *PDGFRA* tienen más tendencia a expresar CD34 que el resto de mutaciones, aunque no se demuestran diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,052$ ).

Miettinen 1999 y Lasota 2008 describen que los GISTs de localización extraintestinal se asocian a morfología epitelioide o mixta y mutaciones en el gen *PDGFRA*, y tienen una evolución desfavorable. En nuestra serie sólo tenemos 5 casos de GISTs extraintestinal, muy pocos casos para poder extraer conclusiones. Todos son de alto riesgo, tres muestran morfología fusocelular y mutación en el exón 11 de *c-KIT* y dos muestran morfología epitelioide y mutación en el exón 18 de *PDGFRA*.

En nuestra serie los casos con mutación en el exón 18 no se asocian a una intensidad específica de c-kit, ni se observan diferencias estadísticamente significativas cuando comparamos la expresión de Ki-67 con respecto a otras mutaciones. Se asocian a la presencia de matriz mixoide ( $p=0,003$ ) cuando comparamos con casos que presentan mutación del exón 11 de *c-KIT*.

En nuestra serie el 12,6% de los GISTs han resultado wild-type para las mutaciones estudiadas. Se observa que los GISTs wild-type se localizan con más frecuencia en estómago ( $p=0,010$ ), cuando los comparamos con el resto de mutaciones, coincidiendo con la descripción de Kontogianni-Katsarou y Hornick (74, 83). También observamos que los GISTs WT presentan con más frecuencia morfología fusocelular ( $p=0,002$ ) que la mutación del exón 9 de *c-KIT* y 18 de *PDGFRA*. Se asocian a vacuolización citoplasmática ( $p=0,008$ ) cuando comparamos con casos que presentan mutación del exón 11 de *c-KIT*.

En la bibliografía se encuentra mutación en el gen *BRAF* p.V600E en el 4% de los casos en series de 87, 70 y 28 casos de GISTs wild-type (85, 102-103), principalmente en mujeres y GISTs localizados en intestino delgado. Sin embargo en nuestra serie, no detectamos mutación de BRAF en ninguno de los 11 casos WT.

Uno de los problemas cuando se estudia las posibles implicaciones clínicas de las diferentes mutaciones, es la dificultad de prever el comportamiento asociado a cada mutación. Quizá se necesiten realizar estudios

conformacionales para predecir, en cada mutación, que efectos pueden tener los cambios estructurales a nivel proteico (149-150).

Actualmente hay varias recomendaciones sobre cuando realizar el estudio de las mutaciones de *c-KIT* y *PDGFRA*. Los grupos de NCCC y EORTC sugieren realizar estudio mutacional en casos de GISTs irresecables o metastásicos en el momento del diagnóstico, en pacientes jóvenes, morfología epitelioide y resistencia primaria a imatinib (120). Además de los casos que presentan mutaciones con baja respuesta al tratamiento convencional, que se benefician de tratamiento con fármacos de segunda línea, se acepta que pacientes con mutación en el exón 9 de *c-KIT* se benefician de dosis mayores imatinib de inicio (800mg/d de imatinib). Por tanto, es importante realizar estudio mutacional de cara a una buena selección terapéutica. Además, el grupo de la ESMO recomienda la incorporación del estudio molecular sistemático al procedimiento diagnóstico de todos los GISTs, sobre todo en los GISTs avanzados, dada la relevancia que este tipo de información está teniendo desde el punto de vista predictivo y pronóstico, y sobre todo en casos con histología compatible con GIST, sin expresión de CD117 y DOG1 (151).

##### **5. NIVELES DE EXPRESIÓN DE microRNA:**

Se estudia la diferencia de niveles de expresión de miRNA-221, 222 y 494 en tejido tumoral de GISTs con respecto a tejido no tumoral de los casos de nuestra serie. Cumplen criterios para poder realizar el estudio 63 casos. Se eligieron estos miRNA a partir de estudios realizados por Haller, Koelz, Kim y Niinuma, tal y como se ha comentado en la introducción (104, 108-110).

Observamos que en general los niveles de los miRNA estudiados presentan valores inferiores a 1. Los niveles de expresión de miRNA-221 y 222 presentan medias similares, mientras que miRNA-494 presenta una media más elevada. La mayoría de los GISTs presentan niveles de expresión disminuidos, tal y como comenta el grupo Koelz (110).

En los casos de nuestra serie no hemos observado diferencias estadísticamente significativas al comparar los niveles de expresión de miRNA-221, 222 y 494 con las diferentes mutaciones de *c-KIT* y *PDGFRA*. Tampoco encuentra diferencias el grupo de Koelz (110).

Se ha realizado estudio de niveles de expresión de miRNA en 6 de los 11 casos de GISTs wild-type, observando que miRNA-221 y 222 presentan en todos los casos niveles  $<0,4$  y miRNA-494  $<0,7$ , aunque sin demostrar diferencias estadísticamente significativas. Ninguno muestra niveles de expresión con valor igual a 1 o superior, aunque miRNA-494 presenta valores próximos a 1, a diferencia de algún caso de GISTs con mutación en *c-KIT* o *PDGFRA* que muestra valores iguales a 1 o superiores.

Los GISTs localizados en estómago presentan con mayor frecuencia niveles muy bajos de expresión de miRNA-221 ( $p=0,008$ ) y 222 ( $p=0,037$ ), cuando los comparamos con los niveles de expresión que presentan los GISTs localizados en intestino delgado. El grupo de Haller obtiene estos mismos resultados (111). Cuando comparamos las medias de los niveles de expresión de miRNA-221, 222 y 494 con el resto de parámetros clínico-patológicos no observamos diferencias estadísticamente significativas, a diferencia de Haller que encuentran menor expresión de miRNA-221 y 222 en GISTs con mutaciones en *c-KIT* en comparación con los WT (111). Cuando categorizamos los niveles de expresión de los miRNA estudiados en 6 grupos: (1)  $\leq 0,05$ ; (2)  $>0,05 \leq 0,12$ ; (3)  $>0,12 \leq 0,25$ ; (4)  $>0,25 \leq 0,5$ ; (5)  $>0,5 \leq 0,99$  y (6)  $>1$ , observamos que los GISTs de los grupos de riesgo intermedio y alto riesgo tienen tendencia a presentar niveles de expresión de miRNA-494 muy bajos (categorías 1 y 2) respecto a los grupos de muy bajo y bajo riesgo, aunque no se demuestran diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,066$ ). Los GISTs con morfología fusocelular tienen tendencia a presentar niveles de expresión de miRNA-221 y 222 muy bajos (categorías 1 y 2) y niveles de expresión de miRNA-494 próximos a 1 (categoría 5), respecto a los GISTs de morfología epitelioide o mixta, aunque no se demuestran diferencias estadísticamente significativas. En GISTs con morfología epitelioide no se han observado niveles de miRNA-221  $>1$ .

GISTs con niveles de expresión de miRNA-221 próximos, iguales o superiores a 1 (categorías 5 y 6) presentan con poca frecuencia vacuolización citoplasmática ( $p=0,045$ ). GISTs con niveles de expresión de miRNA-494 próximos, iguales o superiores a 1 (categorías 4, 5 y 6) presentan con poca frecuencia matriz mixoide ( $p=0,016$ ). El significado de esta asociación no se ha

descrito en la bibliografía, y tampoco resulta fácil encontrar una explicación a esta asociación.

Los casos de nuestra serie con expresión de c-kit con patrón de Golgi presentan con más frecuencia niveles de expresión de miRNA-221 próximos a valores de 1 (categoría 5). Koelz encuentra niveles disminuidos de miRNA-221 y 222 en GIST con marcada intensidad de tinción inmunohistoquímica para c-kit y a la inversa, expresión aumentada en casos de intensidad de c-kit focal o ausente (110). En nuestra serie observamos que GISTs con expresión de c-kit con marcada intensidad (3+) muestran una tendencia a presentar niveles de expresión de miRNA-494 elevados (categorías 4, 5 y 6), aunque no se demuestran diferencias estadísticamente significativas. A diferencia del grupo de Kim, que observan una correlación de forma inversa entre la expresión de miRNA-494 y la expresión de c-kit (108).

Encontramos como niveles de expresión de miRNA-221 muy bajos (categorías 1 y 2) muestran con más frecuencia positividad para CD-34 ( $p=0,023$ ) si lo comparamos con el resto de categorías.

En síntesis, los datos obtenidos del estudio de niveles de expresión de miRNA y su comparación con el resto de parámetros analizados no permiten establecer asociaciones que contribuyan a perfilar el pronóstico de los GISTs ni a establecer hipótesis sobre su patogenia a nivel molecular ni su posible aplicación como diana terapéutica.

## **6. SEGUIMIENTO:**

Reciben tratamiento adyuvante con imatinib 18 casos, 4 por metástasis en el momento del diagnóstico, 8 por aparición de metástasis durante el seguimiento y 6 casos por pertenecer a grupos de riesgo con indicación de tratamiento (5 de alto riesgo y 1 de riesgo intermedio), de cuales ninguno presentó metástasis durante el seguimiento.

Cuando estudiamos el estado de los pacientes tratados observamos que los 6 pacientes de riesgo intermedio-alto sin metástasis se encuentran vivos sin enfermedad en el último seguimiento. De los 8 pacientes que reciben tratamiento por presentar metástasis durante el seguimiento, 3 han fallecido con enfermedad y 5 están vivos, 3 con enfermedad y 2 libres de enfermedad. De los 4 pacientes con metástasis en el momento del diagnóstico, 2 han

fallecido con enfermedad y 2 están vivos con enfermedad. La evolución (estado) de los casos de GISTs tratados no presenta diferencias estadísticamente significativas cuando se estudia su relación con el exón mutado y los niveles de expresión de miRNA, respecto a los GISTs que no han recibido tratamiento.

### **METÁSTASIS:**

Tal como describe Miettinen y DeMatteo la presencia de metástasis en el momento del diagnóstico confiere un peor pronóstico, asociado a supervivencias más cortas (46, 62).

En nuestra serie se presentan como GISTs metastásicos 7 casos y 15 casos presentan metástasis a partir de 3 meses postdiagnóstico y la fecha de último seguimiento. Si analizamos la presencia de metástasis en función del exón mutado observamos que los GISTs con mutación del exón 11 de *c-KIT* no acostumbran a presentar metástasis, aunque no se demuestran diferencias estadísticamente significativas respecto al resto de mutaciones.

Al analizar la presencia de metástasis en función de la localización observamos que los GISTs localizados en intestino delgado se asocian a la presencia de metástasis en el momento del diagnóstico y a los 3 meses postdiagnóstico ( $p=0,02$ ), si los comparamos con los GISTs de localización gástrica. Este hallazgo confirma el mal pronóstico atribuido a esta localización y su valor como parámetro para establecer el riesgo de los GISTs (152).

Con respecto a los grupos de riesgo, los GISTs de AR se asocian con más frecuencia a metástasis en el momento de los diagnóstico y a los 3 meses postdiagnóstico ( $p=0,0001$ ), hecho que concuerda con la evolución esperada para este grupo.

### **NEOPLASIAS INTERCURRENTES:**

El grupo de Agaimy describe que hasta un tercio de los GISTs (10-30%) se diagnostican de forma incidental, durante el tratamiento o control de neoplasias benignas o malignas y en su estudio observa otra neoplasia asociada sincrónica o metacrónica, con una frecuencia de neoplasias malignas de 13,4% (93). Encuentra que los GISTs gástricos son los que con más frecuencia se asocian a otra neoplasia maligna sincrónica. En nuestra serie se observa otra

neoplasia asociada en 20 casos (22,9%), en 5 casos se trata de neoplasia sincrónica y en 15 casos metacrónica.

Dentro de las neoplasias sincrónicas: 3 casos presentaron adenocarcinoma gástrico y 2 casos adenocarcinoma de colon. Como observa Agaimy, en nuestra serie la intervención de los tres adenocarcinomas gástricos comportan el diagnóstico incidental de de GISTs gástricos de muy bajo riesgo, mientras que el diagnóstico de los dos casos de adenocarcinomas de colon se realiza de forma sincrónica al diagnóstico de dos GISTs de riesgo intermedio y alto riesgo. Las neoplasias metacrónicas fueron: 4 casos adenocarcinoma de próstata, 2 casos adenocarcinoma pulmonar, 2 neoplasias de esófago, 2 tumores de vejiga urinaria, 1 carcinoma hepatocelular, 1 linfoma de Hodgkin, 1 neoplasia mielodisplásica refractaria al tratamiento y 1 tumor neuroendocrino mediastínico. En su estudio Agaimy no encuentra asociación entre GISTs y un tipo de neoplasia concreta, y tampoco describe mayor incidencia de ninguna neoplasia en particular.

## **7. SUPERVIVENCIA:**

### **SUPERVIVENCIA GLOBAL:**

Si analizamos la influencia del tipo de mutación sobre la supervivencia global a partir de curvas de Kaplan-Meier, observamos que los GISTs con delección/indel del exón 11 de c-KIT tienen tendencia a presentar menor supervivencia que los GISTs con mutaciones puntuales, aunque no se demuestran diferencias estadísticamente significativas.

Para analizar la influencia del grupo de riesgo según Miettinen-2006 sobre la supervivencia global a partir de curvas de Kaplan-Meier, agrupamos las categorías MBR, BR y RI y las comparamos con el grupo de AR. Observamos que el grupo de AR se asocia con menor supervivencia ( $p=0,019$ )

Si analizamos la influencia del tipo histológico sobre la supervivencia global a partir de curvas de Kaplan-Meier, observamos que los GISTs con morfología fusocelular tienen tendencia a presentar menor supervivencia que los GISTs con morfología epitelioide, aunque no se demuestran diferencias estadísticamente significativas.



### **SUPERVIVENCIA ESPECÍFICA:**

Para analizar la influencia del grupo de riesgo según Miettinen-2006 sobre la supervivencia específica a partir de curvas de Kaplan-Meier, agrupamos las categorías MBR, BR y RI y las comparamos con el grupo de AR. Observamos que el grupo de AR se asocia con menor supervivencia ( $p=0,036$ )

GISTs con niveles de expresión de miRNA-494  $>1$  se asocian a mayor riesgo de fallecer a causa de la enfermedad ( $p=0,003$ ), cuando comparamos con el resto de categorías con niveles de expresión inferiores a 1.

### **SUPERVIVENCIA LIBRE DE RECURRENCIA:**

Si analizamos la supervivencia libre de recurrencia en función del exón mutado observamos la siguiente distribución de los GISTs: GISTs con mutación en exón 18 de *PDGFRA* no presentan metástasis, GISTs con mutación en el exón 11 de *c-KIT* presentan un aparición de metástasis tardía y GISTs con mutación en el exón 9 de *c-KIT* o WT presentan aparición de metástasis más temprana, aunque no se demuestran diferencias estadísticamente significativas.

Observamos que el grupo de AR se asocia a menor supervivencia libre de recurrencia ( $p=0,0001$ ).

Observamos que los GISTs con morfología mixta tienen tendencia a presentar metástasis (menor SLR), aunque no se demuestran diferencias estadísticamente significativas

Los GISTs localizados en intestino delgado tienen tendencia a presentar más metástasis ( $<SLR$ ) que los localizados en estómago, aunque no se demuestran diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,08$ ).

## **8. VALIDACIÓN EN NUESTRA SERIE DE LA PREDICCIÓN DEL NOMOGRAMA:**

El nomograma propuesto por SKCC está validado de forma interna y externa. Comparamos la predicción de SLR2 y SLR5 hecha por el nomograma con lo que sucede en nuestra serie. Observamos que las predicciones tienden a cumplirse en los casos con alta probabilidad de SLR2 (80-100%), aunque no se demuestran diferencias estadísticamente significativas, debido al pequeño tamaño que la muestra cuando realizamos los subgrupos para comparar el valor de SLR esperado (% del nomograma) con el valor de SLR real. El grupo

de seguimiento a 5 años todavía se reduce más y por tanto es difícil poder realizar comparaciones.

## **9. COMENTARIOS ADICIONALES:**

En nuestro estudio hemos detectado casos aislados con mutaciones que según la bibliografía se relacionan con cierto valor pronóstico, como por ejemplo los casos 2, 17, 29:

- Caso 2: deleción en el exón 11 de 24 nucleótidos, correspondiente a nivel proteico a p. *Q556\_1573del*. Esta homocigosis puede ser debida tanto a la doble mutación como a la pérdida del alelo wild-type, aunque está publicado que la presencia del alelo mutante wild-type tiene peor pronóstico, independientemente del mecanismo que provoca la homocigosis (78, 153). El paciente en un período de 2 años desarrolló metástasis peritoneales y falleció por diseminación de la enfermedad. El tumor pertenecía al grupo de alto riesgo.
- Caso 17: tres mutaciones puntuales que comportaban cambios de aminoácidos en la cadena proteica, que se podría relacionar con peor pronóstico. El paciente falleció a los 5 años por otra causa, no debida a la enfermedad. El tumor pertenecía al grupo de alto riesgo.
- Caso 29: inserción en el extremo 3' del exón 11 de *c-KIT* (p.591\_592ins), descrita como una mutación con curso indolente y buen pronóstico (72). El paciente al cabo de 10 años del diagnóstico está vivo sin enfermedad. El tumor corresponde al grupo de alto riesgo.

Sorprende la evolución del caso 68, localizado en estómago, que presenta 110 mitosis/50 CGA e índice proliferativo Ki67 del 25% de las células tumorales. Cumple criterios de alto riesgo de malignidad. Presenta morfología fusocelular, expresión de c-kit con marcada intensidad y patrón de Golgi. En el estudio mutacional ha resultado wild-type para las mutaciones estudiadas y no se pudo realizar determinación de niveles de expresión de miRNA. En el momento del diagnóstico infiltraba el páncreas por continuidad. Recibe tratamiento adyuvante, 1 un año después del diagnóstico presenta metástasis hepáticas que se resecan. Actualmente, después de 3 años de seguimiento está vivo sin enfermedad.

Como reflexión final tiene gran importancia aportar información sobre parámetros clínico-patológicos y moleculares de estos tumores, con el fin de mejorar el conocimiento sobre su comportamiento biológico, necesario por otra parte para desarrollar nuevas dianas terapéuticas. Posiblemente existan otros factores, todavía no descubiertos, que influyan en el comportamiento biológico de los GISTs. El grupo de tumores wild-type es especialmente interesante de cara a identificar otras eventuales alteraciones moleculares con incidencia en el curso evolutivo de los GISTs. La intención sería ampliar la serie para obtener resultados significativos que permitan obtener más conclusiones.



## **CONCLUSIONES**



## **CONCLUSIONES:**

El estudio realizado sobre la serie de 87 casos de tumores estromales del tracto gastrointestinal (GIST) ha permitido obtener las siguientes conclusiones:

En relación a la asociación entre parámetros clínico-patológicos, hemos encontrado diferencias en función del tipo histológico y los grupos de riesgo:

- La presencia de necrosis, positividad de intensidad marcada (3+) para c-kit, positividad para c-kit con patrón de Golgi, expresión elevada de Ki-67 y elevada tendencia a presentar metástasis, se asocian con más frecuencia a GISTs del grupo de alto riesgo.
- Los GISTs con morfología fusocelular y mixta se asocian a peor comportamiento biológico que los GISTs con morfología epitelioide.

En relación a las mutaciones de los genes *c-KIT* y *PDGFRA*, hemos encontrado diferencias de asociación:

- La mutación en el exón 11 se asocia con más frecuencia a pacientes de edad más avanzada, mujeres, localización en intestino delgado, morfología fusocelular y positividad con intensidad marcada (3+) para c-kit.
- Los tipos de mutación deleción/indel tienen más tendencia a distribuirse en GISTs localizados en intestino delgado, de alto riesgo y muestran menor supervivencia global que los GISTs con mutaciones puntuales.
- La mutación en el exón 9 se asocia con más frecuencia a GISTs localizados en intestino delgado, de morfología de tipo mixto y con valores de expresión de Ki-67 elevados.
- Los casos con mutación en el exón 9 de *c-KIT* y en el 18 de *PDGFRA* tienen más tendencia a expresar CD34 que el resto de mutaciones.
- La mutación en el exón 18 se asocia con más frecuencia a sexo masculino, localización gástrica, morfología epitelioide, matriz mixoide y grupo de muy bajo riesgo.
- Los GISTs wild-type se localizan con más frecuencia en estómago, presentan morfología fusocelular y vacuolización citoplasmática.

En relación a los niveles de expresión de miRNAs: la mayoría de casos presentan niveles de expresión inferiores a 1. Diferencias de expresión en los distintos miRNAs se han asociado a parámetros clínico-patológicos y evolutivos como: localización, positividad para CD34, grupos de riesgo, tipo histológico, intensidad y patrón de c-kit y supervivencia específica.

- Todos los casos de GISTs wild-type de nuestra serie han mostrado niveles de expresión de miRNAs inferiores a 0,7.

Aplicado el nomograma a nuestra serie se observa que las predicciones tienden a cumplirse en los casos con alta probabilidad de supervivencia libre de recurrencia a los 2 años (80-100%), aunque no se demuestran diferencias estadísticamente significativas.



## **BIBLIOGRAFÍA**



## BIBLIOGRAFÍA:

1. Fletcher CD, Berman JJ, Corless C, Gorstein F, Lasota J, Longley BJ, et al. Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: A consensus approach. *Hum Pathol.* 2002 May;33(5):459-65.
2. Sarlomo-Rikala M, Kovatich AJ, Barusevicius A, Miettinen M. CD117: a sensitive marker for gastrointestinal stromal tumors that is more specific than CD34. *Mod Pathol.* 1998 Aug;11(8):728-34.
3. Miettinen M, Virolainen M, Maarit Sarlomo R. Gastrointestinal stromal tumors--value of CD34 antigen in their identification and separation from true leiomyomas and schwannomas. *Am J Surg Pathol.* 1995 Feb;19(2):207-16.
4. Kindblom LG, Remotti HE, Aldenborg F, Meis-Kindblom JM. Gastrointestinal pacemaker cell tumor (GIPACT): gastrointestinal stromal tumors show phenotypic characteristics of the interstitial cells of Cajal. *Am J Pathol.* 1998 May;152(5):1259-69.
5. Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S, et al. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science.* 1998 Jan 23;279(5350):577-80.
6. Lasota J, Miettinen M. Clinical significance of oncogenic KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumours. *Histopathology.* 2008 Sep;53(3):245-66.
7. Weiss RA, Mackay B. Malignant smooth muscle tumors of the gastrointestinal tract: an ultrastructural study of 20 cases. *Ultrastruct Pathol.* 1981 Jul-Sep;2(3):231-40.
8. Mazur MT, Clark HB. Gastric stromal tumors. Reappraisal of histogenesis. *Am J Surg Pathol.* 1983 Sep;7(6):507-19.
9. Rosai J. *Ackerman's Surgical Pathology.* 8th ed. St. Louis: Elsevier-Health Sciences Division; 1995.
10. Traweek ST, Kandalaf PL, Mehta P, Battifora H. The human hematopoietic progenitor cell antigen (CD34) in vascular neoplasia. *Am J Clin Pathol.* 1991 Jul;96(1):25-31.
11. van de Rijn M, Hendrickson MR, Rouse RV. CD34 expression by gastrointestinal tract stromal tumors. *Hum Pathol.* 1994 Aug;25(8):766-71.
12. Miettinen M, Monihan JM, Sarlomo-Rikala M, Kovatich AJ, Carr NJ, Emory TS, et al. Gastrointestinal stromal tumors/smooth muscle tumors (GISTs) primary in the omentum and mesentery: clinicopathologic and immunohistochemical study of 26 cases. *Am J Surg Pathol.* 1999 Sep;23(9):1109-18.
13. APPLEMAN. Mesenchymal tumors of the gut: histological perspectives, new approaches, new results, and does it make a difference. *Monogr Pathol* 1990;31:26.
14. Herrera GA, Pinto de Moraes H, Grizzle WE, Han SG. Malignant small bowel neoplasm of enteric plexus derivation (plexosarcoma). Light and electron microscopic study confirming the origin of the neoplasm. *Dig Dis Sci.* 1984 Mar;29(3):275-84.
15. Lee JR, Joshi V, Griffin JW, Jr., Lasota J, Miettinen M. Gastrointestinal autonomic nerve tumor: immunohistochemical and molecular identity with gastrointestinal stromal tumor. *Am J Surg Pathol.* 2001 Aug;25(8):979-87.
16. Sircar K, Hewlett BR, Huizinga JD, Chorneyko K, Berezin I, Riddell RH. Interstitial cells of Cajal as precursors of gastrointestinal stromal tumors. *Am J Surg Pathol.* 1999 Apr;23(4):377-89.

17. Robinson TL, Sircar K, Hewlett BR, Chorneyko K, Riddell RH, Huizinga JD. Gastrointestinal stromal tumors may originate from a subset of CD34-positive interstitial cells of Cajal. *Am J Pathol.* 2000 Apr;156(4):1157-63.
18. Ramon y Cajal S. Sur les ganglions et plexos nerveux de l'intestine. *C R Soc Biol* 1893;45:6.
19. Thuneberg L. Interstitial cells of Cajal: intestinal pacemaker cells? *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 1982;71:1-130.
20. Barajas-Lopez C, Berezin I, Daniel EE, Huizinga JD. Pacemaker activity recorded in interstitial cells of Cajal of the gastrointestinal tract. *Am J Physiol.* 1989 Oct;257(4 Pt 1):C830-5.
21. Thomsen L, Robinson TL, Lee JC, Farraway LA, Hughes MJ, Andrews DW, et al. Interstitial cells of Cajal generate a rhythmic pacemaker current. *Nat Med.* 1998 Jul;4(7):848-51.
22. Maeda H, Yamagata A, Nishikawa S, Yoshinaga K, Kobayashi S, Nishi K. Requirement of c-kit for development of intestinal pacemaker system. *Development.* 1992 Oct;116(2):369-75.
23. Huizinga JD, Thuneberg L, Kluppel M, Malysz J, Mikkelsen HB, Bernstein A. W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature.* 1995 Jan 26;373(6512):347-9.
24. Komuro T, Seki K, Horiguchi K. Ultrastructural characterization of the interstitial cells of Cajal. *Arch Histol Cytol.* 1999 Oct;62(4):295-316.
25. Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors--definition, clinical, histological, immunohistochemical, and molecular genetic features and differential diagnosis. *Virchows Arch.* 2001 Jan;438(1):1-12.
26. Komuro T. Comparative morphology of interstitial cells of Cajal: ultrastructural characterization. *Microsc Res Tech.* 1999 Nov 15;47(4):267-85.
27. Ueyama T, Guo KJ, Hashimoto H, Daimaru Y, Enjoji M. A clinicopathologic and immunohistochemical study of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer.* 1992 Feb 15;69(4):947-55.
28. Suster S. Gastrointestinal stromal tumors. *Semin Diagn Pathol.* 1996 Nov;13(4):297-313.
29. Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: review on morphology, molecular pathology, prognosis, and differential diagnosis. *Arch Pathol Lab Med.* 2006 Oct;130(10):1466-78.
30. Graadt van Roggen JF, van Velthuysen ML, Hogendoorn PC. The histopathological differential diagnosis of gastrointestinal stromal tumours. *J Clin Pathol.* 2001 Feb;54(2):96-102.
31. Min KW. Small intestinal stromal tumors with skeinoid fibers. Clinicopathological, immunohistochemical, and ultrastructural investigations. *Am J Surg Pathol.* 1992 Feb;16(2):145-55.
32. Chan JK. Mesenchymal tumors of the gastrointestinal tract: a paradise for acronyms (STUMP, GIST, GANT, and now GIPACT), implication of c-kit in genesis, and yet another of the many emerging roles of the interstitial cell of Cajal in the pathogenesis of gastrointestinal diseases? *Adv Anat Pathol.* 1999 Jan;6(1):19-40.
33. Miettinen M, Sarlomo-Rikala M, Sobin LH, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors and leiomyosarcomas in the colon: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 44 cases. *Am J Surg Pathol.* 2000 Oct;24(10):1339-52.

34. Miselli F, Millefanti C, Conca E, Negri T, Piacenza C, Pierotti MA, et al. PDGFRA immunostaining can help in the diagnosis of gastrointestinal stromal tumors. *Am J Surg Pathol.* 2008 May;32(5):738-43.
35. Emile JF, Stock N, Corless CL, Sciort R, Schildhaus HU, Brahimi S, et al. Dotlike or Golgi-like KIT and PDGFRA Staining in GISTs. *Am J Surg Pathol.* 2009 Jan;33(1):157-8; author reply -9.
36. Jaramillo S, Rios-Moreno MJ, Hernandez A, Amerigo J, Trigo-Sanchez I, Gonzalez-Campora R. Gastrointestinal stromal tumors (GISTs): role of CD 117 and PDGFRA Golgi-like staining pattern in the recognition of mutational status. *Rev Esp Enferm Dig.* 2012 Mar;104(3):128-33.
37. West RB, Corless CL, Chen X, Rubin BP, Subramanian S, Montgomery K, et al. The novel marker, DOG1, is expressed ubiquitously in gastrointestinal stromal tumors irrespective of KIT or PDGFRA mutation status. *Am J Pathol.* 2004 Jul;165(1):107-13.
38. Liegl B, Hornick JL, Corless CL, Fletcher CD. Monoclonal antibody DOG1.1 shows higher sensitivity than KIT in the diagnosis of gastrointestinal stromal tumors, including unusual subtypes. *Am J Surg Pathol.* 2009 Mar;33(3):437-46.
39. Franquemont DW. Differentiation and risk assessment of gastrointestinal stromal tumors. *Am J Clin Pathol.* 1995 Jan;103(1):41-7.
40. Suster S, Sorace D, Moran CA. Gastrointestinal stromal tumors with prominent myxoid matrix. Clinicopathologic, immunohistochemical, and ultrastructural study of nine cases of a distinctive morphologic variant of myogenic stromal tumor. *Am J Surg Pathol.* 1995 Jan;19(1):59-70.
41. Emory TS, Sobin LH, Lukes L, Lee DH, O'Leary TJ. Prognosis of gastrointestinal smooth-muscle (stromal) tumors: dependence on anatomic site. *Am J Surg Pathol.* 1999 Jan;23(1):82-7.
42. Miettinen M, Sobin LH, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors of the stomach: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 1765 cases with long-term follow-up. *Am J Surg Pathol.* 2005 Jan;29(1):52-68.
43. Miettinen M, Makhlof H, Sobin LH, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors of the jejunum and ileum: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 906 cases before imatinib with long-term follow-up. *Am J Surg Pathol.* 2006 Apr;30(4):477-89.
44. Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: pathology and prognosis at different sites. *Semin Diagn Pathol.* 2006 May;23(2):70-83.
45. Gold JS, Gonen M, Gutierrez A, Broto JM, Garcia-del-Muro X, Smyrk TC, et al. Development and validation of a prognostic nomogram for recurrence-free survival after complete surgical resection of localised primary gastrointestinal stromal tumour: a retrospective analysis. *Lancet Oncol.* 2009 Nov;10(11):1045-52.
46. DeMatteo RP, Lewis JJ, Leung D, Mudan SS, Woodruff JM, Brennan MF. Two hundred gastrointestinal stromal tumors: recurrence patterns and prognostic factors for survival. *Ann Surg.* 2000 Jan;231(1):51-8.
47. Miettinen M, Sobin LH, Sarlomo-Rikala M. Immunohistochemical spectrum of GISTs at different sites and their differential diagnosis with a reference to CD117 (KIT). *Mod Pathol.* 2000 Oct;13(10):1134-42.

48. Newman PL, Wadden C, Fletcher CD. Gastrointestinal stromal tumours: correlation of immunophenotype with clinicopathological features. *J Pathol.* 1991 Jun;164(2):107-17.
49. Trojani M, Contesso G, Coindre JM, Rouesse J, Bui NB, de Mascarel A, et al. Soft-tissue sarcomas of adults; study of pathological prognostic variables and definition of a histopathological grading system. *Int J Cancer.* 1984 Jan 15;33(1):37-42.
50. Goldblum JR, Appelman HD. Stromal tumors of the duodenum. A histologic and immunohistochemical study of 20 cases. *Am J Surg Pathol.* 1995 Jan;19(1):71-80.
51. Gumurdulu D, Erdogan S, Kayaselcuk F, Seydaoglu G, Parsak CK, Demircan O, et al. Expression of COX-2, PCNA, Ki-67 and p53 in gastrointestinal stromal tumors and its relationship with histopathological parameters. *World J Gastroenterol.* 2007 Jan 21;13(3):426-31.
52. Huang HY, Huang WW, Lin CN, Eng HL, Li SH, Li CF, et al. Immunohistochemical expression of p16INK4A, Ki-67, and Mcm2 proteins in gastrointestinal stromal tumors: prognostic implications and correlations with risk stratification of NIH consensus criteria. *Ann Surg Oncol.* 2006 Dec;13(12):1633-44.
53. Nakamura N, Yamamoto H, Yao T, Oda Y, Nishiyama K, Imamura M, et al. Prognostic significance of expressions of cell-cycle regulatory proteins in gastrointestinal stromal tumor and the relevance of the risk grade. *Hum Pathol.* 2005 Jul;36(7):828-37.
54. Wong NA, Young R, Malcomson RD, Nayar AG, Jamieson LA, Save VE, et al. Prognostic indicators for gastrointestinal stromal tumours: a clinicopathological and immunohistochemical study of 108 resected cases of the stomach. *Histopathology.* 2003 Aug;43(2):118-26.
55. Liang YM, Li XH, Li WM, Lu YY. Prognostic significance of PTEN, Ki-67 and CD44s expression patterns in gastrointestinal stromal tumors. *World J Gastroenterol.* 2012 Apr 14;18(14):1664-71.
56. Qiu FH, Ray P, Brown K, Barker PE, Jhanwar S, Ruddle FH, et al. Primary structure of c-kit: relationship with the CSF-1/PDGF receptor kinase family--oncogenic activation of v-kit involves deletion of extracellular domain and C terminus. *EMBO J.* 1988 Apr;7(4):1003-11.
57. Besmer P, Murphy JE, George PC, Qiu FH, Bergold PJ, Lederman L, et al. A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene v-kit with the protein kinase gene family. *Nature.* 1986 Apr 3-9;320(6061):415-21.
58. Williams DE, Eisenman J, Baird A, Rauch C, Van Ness K, March CJ, et al. Identification of a ligand for the c-kit proto-oncogene. *Cell.* 1990 Oct 5;63(1):167-74.
59. Flanagan JG, Leder P. The kit ligand: a cell surface molecule altered in steel mutant fibroblasts. *Cell.* 1990 Oct 5;63(1):185-94.
60. Ma Y, Cunningham ME, Wang X, Ghosh I, Regan L, Longley BJ. Inhibition of spontaneous receptor phosphorylation by residues in a putative alpha-helix in the KIT intracellular juxtamembrane region. *J Biol Chem.* 1999 May 7;274(19):13399-402.
61. Longley BJ, Reguera MJ, Ma Y. Classes of c-KIT activating mutations: proposed mechanisms of action and implications for disease classification and therapy. *Leuk Res.* 2001 Jul;25(7):571-6.

62. Miettinen M, Majidi M, Lasota J. Pathology and diagnostic criteria of gastrointestinal stromal tumors (GISTs): a review. *Eur J Cancer*. 2002 Sep;38 Suppl 5:S39-51.
63. Rubin BP, Singer S, Tsao C, Duensing A, Lux ML, Ruiz R, et al. KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res*. 2001 Nov 15;61(22):8118-21.
64. Lux ML, Rubin BP, Biase TL, Chen CJ, Maclure T, Demetri G, et al. KIT extracellular and kinase domain mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Am J Pathol*. 2000 Mar;156(3):791-5.
65. Lasota J, Wozniak A, Sarlomo-Rikala M, Rys J, Kordek R, Nassar A, et al. Mutations in exons 9 and 13 of KIT gene are rare events in gastrointestinal stromal tumors. A study of 200 cases. *Am J Pathol*. 2000 Oct;157(4):1091-5.
66. Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, McGreevey L, Chen CJ, Joseph N, et al. PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science*. 2003 Jan 31;299(5607):708-10.
67. Corless CL, Fletcher JA, Heinrich MC. Biology of gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol*. 2004 Sep 15;22(18):3813-25.
68. Antonescu CR, Sommer G, Sarran L, Tschernyavsky SJ, Riedel E, Woodruff JM, et al. Association of KIT exon 9 mutations with nongastric primary site and aggressive behavior: KIT mutation analysis and clinical correlates of 120 gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res*. 2003 Aug 15;9(9):3329-37.
69. Lasota J, Miettinen M. KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *Semin Diagn Pathol*. 2006 May;23(2):91-102.
70. Loughrey MB, Trivett M, Beshay V, Dobrovic A, Kovalenko S, Murray W, et al. KIT immunohistochemistry and mutation status in gastrointestinal stromal tumours (GISTs) evaluated for treatment with imatinib. *Histopathology*. 2006 Jul;49(1):52-65.
71. Lasota J, Kuban W, Wardelmann E, Debiec-Rychter M, Merkelbach-Bruse S, Sciot R, et al. KIT codon 558 insertions in gastrointestinal stromal tumors. Analysis of 17 rare KIT mutants. *Hum Pathol*. 2008 Dec;39(12):1728-36.
72. Lasota J, Dansonka-Mieszkowska A, Stachura T, Schneider-Stock R, Kallajoki M, Steigen SE, et al. Gastrointestinal stromal tumors with internal tandem duplications in 3' end of KIT juxtamembrane domain occur predominantly in stomach and generally seem to have a favorable course. *Mod Pathol*. 2003 Dec;16(12):1257-64.
73. Wardelmann E, Losen I, Hans V, Neidt I, Speidel N, Bierhoff E, et al. Deletion of Trp-557 and Lys-558 in the juxtamembrane domain of the c-kit protooncogene is associated with metastatic behavior of gastrointestinal stromal tumors. *Int J Cancer*. 2003 Oct 10;106(6):887-95.
74. Kontogianni-Katsarou K, Dimitriadis E, Lariou C, Kairi-Vassilatou E, Pandis N, Kondi-Paphiti A. KIT exon 11 codon 557/558 deletion/insertion mutations define a subset of gastrointestinal stromal tumors with malignant potential. *World J Gastroenterol*. 2008 Mar 28;14(12):1891-7.
75. Wardelmann E, Neidt I, Bierhoff E, Speidel N, Manegold C, Fischer HP, et al. c-kit mutations in gastrointestinal stromal tumors occur preferentially in the spindle rather than in the epithelioid cell variant. *Mod Pathol*. 2002 Feb;15(2):125-36.

76. Lasota J, Jasinski M, Sarlomo-Rikala M, Miettinen M. Mutations in exon 11 of c-Kit occur preferentially in malignant versus benign gastrointestinal stromal tumors and do not occur in leiomyomas or leiomyosarcomas. *Am J Pathol.* 1999 Jan;154(1):53-60.
77. Taniguchi M, Nishida T, Hirota S, Isozaki K, Ito T, Nomura T, et al. Effect of c-kit mutation on prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res.* 1999 Sep 1;59(17):4297-300.
78. Lasota J, vel Dobosz AJ, Wasag B, Wozniak A, Kraszewska E, Michej W, et al. Presence of homozygous KIT exon 11 mutations is strongly associated with malignant clinical behavior in gastrointestinal stromal tumors. *Lab Invest.* 2007 Oct;87(10):1029-41.
79. Lasota J, Corless CL, Heinrich MC, Debiec-Rychter M, Sciot R, Wardelmann E, et al. Clinicopathologic profile of gastrointestinal stromal tumors (GISTs) with primary KIT exon 13 or exon 17 mutations: a multicenter study on 54 cases. *Mod Pathol.* 2008 Apr;21(4):476-84.
80. Hirota S, Ohashi A, Nishida T, Isozaki K, Kinoshita K, Shinomura Y, et al. Gain-of-function mutations of platelet-derived growth factor receptor alpha gene in gastrointestinal stromal tumors. *Gastroenterology.* 2003 Sep;125(3):660-7.
81. Wardelmann E, Hrychuk A, Merkelbach-Bruse S, Pauls K, Goldstein J, Hohenberger P, et al. Association of platelet-derived growth factor receptor alpha mutations with gastric primary site and epithelioid or mixed cell morphology in gastrointestinal stromal tumors. *J Mol Diagn.* 2004 Aug;6(3):197-204.
82. Hoeben A, Schoffski P, Debiec-Rychter M. Clinical implications of mutational analysis in gastrointestinal stromal tumours. *Br J Cancer.* 2008 Feb 26;98(4):684-8.
83. Hornick JL, Fletcher CD. The role of KIT in the management of patients with gastrointestinal stromal tumors. *Hum Pathol.* 2007 May;38(5):679-87.
84. Miettinen M, Wang ZF, Sarlomo-Rikala M, Osuch C, Rutkowski P, Lasota J. Succinate dehydrogenase-deficient GISTs: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 66 gastric GISTs with predilection to young age. *Am J Surg Pathol.* 2011 Nov;35(11):1712-21.
85. Hosten I, Faur N, Primois C, Boury F, Denard J, Emile JF, et al. BRAF mutation status in gastrointestinal stromal tumors. *Am J Clin Pathol.* 2010 Jan;133(1):141-8.
86. Wang JH, Lasota J, Miettinen M. Succinate Dehydrogenase Subunit B (SDHB) Is Expressed in Neurofibromatosis 1-Associated Gastrointestinal Stromal Tumors (Gists): Implications for the SDHB Expression Based Classification of Gists. *J Cancer.* 2011;2:90-3.
87. Thalheimer A, Schlemmer M, Bueter M, Merkelbach-Bruse S, Schildhaus HU, Buettner R, et al. Familial gastrointestinal stromal tumors caused by the novel KIT exon 17 germline mutation N822Y. *Am J Surg Pathol.* 2008 Oct;32(10):1560-5.
88. Miettinen M, Fetsch JF, Sobin LH, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors in patients with neurofibromatosis 1: a clinicopathologic and molecular genetic study of 45 cases. *Am J Surg Pathol.* 2006 Jan;30(1):90-6.
89. Carney JA. Gastric stromal sarcoma, pulmonary chondroma, and extra-adrenal paraganglioma (Carney Triad): natural history, adrenocortical component, and possible familial occurrence. *Mayo Clin Proc.* 1999 Jun;74(6):543-52.



90. Carney JA, Stratakis CA. Familial paraganglioma and gastric stromal sarcoma: a new syndrome distinct from the Carney triad. *Am J Med Genet.* 2002 Mar 1;108(2):132-9.
91. Zhang L, Smyrk TC, Young WF, Jr., Stratakis CA, Carney JA. Gastric stromal tumors in Carney triad are different clinically, pathologically, and behaviorally from sporadic gastric gastrointestinal stromal tumors: findings in 104 cases. *Am J Surg Pathol.* 2010 Jan;34(1):53-64.
92. Miettinen M, Lasota J, Sobin LH. Gastrointestinal stromal tumors of the stomach in children and young adults: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 44 cases with long-term follow-up and review of the literature. *Am J Surg Pathol.* 2005 Oct;29(10):1373-81.
93. Agaimy A, Wunsch PH, Sobin LH, Lasota J, Miettinen M. Occurrence of other malignancies in patients with gastrointestinal stromal tumors. *Semin Diagn Pathol.* 2006 May;23(2):120-9.
94. Heinrich MC, Rubin BP, Longley BJ, Fletcher JA. Biology and genetic aspects of gastrointestinal stromal tumors: KIT activation and cytogenetic alterations. *Hum Pathol.* 2002 May;33(5):484-95.
95. Debiec-Rychter M, Lasota J, Sarlomo-Rikala M, Kordek R, Miettinen M. Chromosomal aberrations in malignant gastrointestinal stromal tumors: correlation with c-KIT gene mutation. *Cancer Genet Cytogenet.* 2001 Jul 1;128(1):24-30.
96. El-Rifai W, Sarlomo-Rikala M, Andersson LC, Miettinen M, Knuutila S. High-resolution deletion mapping of chromosome 14 in stromal tumors of the gastrointestinal tract suggests two distinct tumor suppressor loci. *Genes Chromosomes Cancer.* 2000 Apr;27(4):387-91.
97. El-Rifai W, Sarlomo-Rikala M, Andersson LC, Knuutila S, Miettinen M. DNA sequence copy number changes in gastrointestinal stromal tumors: tumor progression and prognostic significance. *Cancer Res.* 2000 Jul 15;60(14):3899-903.
98. Medeiros F, Corless CL, Duensing A, Hornick JL, Oliveira AM, Heinrich MC, et al. KIT-negative gastrointestinal stromal tumors: proof of concept and therapeutic implications. *Am J Surg Pathol.* 2004 Jul;28(7):889-94.
99. Gunawan B, von Heydebreck A, Sander B, Schulten HJ, Haller F, Langer C, et al. An oncogenetic tree model in gastrointestinal stromal tumours (GISTs) identifies different pathways of cytogenetic evolution with prognostic implications. *J Pathol.* 2007 Mar;211(4):463-70.
100. Pylkkänen L, Sarlomo-Rikala M, Wessman M, Hamalainen E, Sainio M, Husgafvel-Pursiainen K, et al. Chromosome 22q alterations and expression of the NF2 gene product, merlin, in gastrointestinal stromal tumors. *Hum Pathol.* 2003 Sep;34(9):872-9.
101. Duensing A, Medeiros F, McConarty B, Joseph NE, Panigrahy D, Singer S, et al. Mechanisms of oncogenic KIT signal transduction in primary gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *Oncogene.* 2004 May 13;23(22):3999-4006.
102. Agaram NP, Wong GC, Guo T, Maki RG, Singer S, Dematteo RP, et al. Novel V600E BRAF mutations in imatinib-naive and imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors. *Genes Chromosomes Cancer.* 2008 Oct;47(10):853-9.

103. Agaimy A, Terracciano LM, Dirnhofer S, Tornillo L, Foerster A, Hartmann A, et al. V600E BRAF mutations are alternative early molecular events in a subset of KIT/PDGFR $\alpha$  wild-type gastrointestinal stromal tumours. *J Clin Pathol*. 2009 Jul;62(7):613-6.
104. Haller F, von Heydebreck A, Zhang JD, Gunawan B, Langer C, Ramadori G, et al. Localization- and mutation-dependent microRNA (miRNA) expression signatures in gastrointestinal stromal tumours (GISTs), with a cluster of co-expressed miRNAs located at 14q32.31. *J Pathol*. 2010 Jan;220(1):71-86.
105. Sassen S, Miska EA, Caldas C. MicroRNA: implications for cancer. *Virchows Arch*. 2008 Jan;452(1):1-10.
106. Felli N, Fontana L, Pelosi E, Botta R, Bonci D, Facchiano F, et al. MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Dec 13;102(50):18081-6.
107. Subramanian S, Lui WO, Lee CH, Espinosa I, Nielsen TO, Heinrich MC, et al. MicroRNA expression signature of human sarcomas. *Oncogene*. 2008 Mar 27;27(14):2015-26.
108. Kim WK, Park M, Kim YK, Tae YK, Yang HK, Lee JM, et al. MicroRNA-494 downregulates KIT and inhibits gastrointestinal stromal tumor cell proliferation. *Clin Cancer Res*. 2011 Dec 15;17(24):7584-94.
109. Niinuma T, Suzuki H, Nojima M, Nosho K, Yamamoto H, Takamaru H, et al. Upregulation of miR-196a and HOTAIR drive malignant character in gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res*. 2012 Mar 1;72(5):1126-36.
110. Koelz M, Lense J, Wrba F, Scheffler M, Dienes HP, Odenthal M. Down-regulation of miR-221 and miR-222 correlates with pronounced Kit expression in gastrointestinal stromal tumors. *Int J Oncol*. 2011 Feb;38(2):503-11.
111. Haller F, Cortis J, Helfrich J, Cameron S, Schuler P, Schwager S, et al. Epithelioid/mixed phenotype in gastrointestinal stromal tumors with KIT mutation from the stomach is associated with accelerated passage of late phases of the cell cycle and shorter disease-free survival. *Mod Pathol*. 2011 Feb;24(2):248-55.
112. Subramanian S, West RB, Corless CL, Ou W, Rubin BP, Chu KM, et al. Gastrointestinal stromal tumors (GISTs) with KIT and PDGFR $\alpha$  mutations have distinct gene expression profiles. *Oncogene*. 2004 Oct 14;23(47):7780-90.
113. Choi HJ, Lee H, Kim H, Kwon JE, Kang HJ, You KT, et al. MicroRNA expression profile of gastrointestinal stromal tumors is distinguished by 14q loss and anatomic site. *Int J Cancer*. 2010 Apr 1;126(7):1640-50.
114. Hirota S. Gastrointestinal stromal tumors: their origin and cause. *Int J Clin Oncol*. 2001 Feb;6(1):1-5.
115. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med*. 1996 May;2(5):561-6.
116. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2001 Apr 5;344(14):1031-7.
117. Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, Resta DJ, Reese SF, Ford JM, et al. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med*. 2001 Apr 5;344(14):1038-42.

118. Liegl B, Kepten I, Le C, Zhu M, Demetri GD, Heinrich MC, et al. Heterogeneity of kinase inhibitor resistance mechanisms in GIST. *J Pathol*. 2008 Sep;216(1):64-74.
119. Poveda A, Rivera F, Martin J. SEOM guidelines for gastrointestinal stromal sarcomas (GIST). *Clin Transl Oncol*. 2012 Jul;14(7):536-40.
120. Foo WC, Liegl-Atzwanger B, Lazar AJ. Pathology of gastrointestinal stromal tumors. *Clin Med Insights Pathol*. 2012;5:23-33.
121. Debiec-Rychter M, Sciot R, Le Cesne A, Schlemmer M, Hohenberger P, van Oosterom AT, et al. KIT mutations and dose selection for imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumours. *Eur J Cancer*. 2006 May;42(8):1093-103.
122. Blay JY, Bonvalot S, Casali P, Choi H, Debiec-Richter M, Dei Tos AP, et al. Consensus meeting for the management of gastrointestinal stromal tumors. Report of the GIST Consensus Conference of 20-21 March 2004, under the auspices of ESMO. *Ann Oncol*. 2005 Apr;16(4):566-78.
123. Sattler M, Salgia R. Targeting c-Kit mutations: basic science to novel therapies. *Leuk Res*. 2004 May;28 Suppl 1:S11-20.
124. Nannini M, Biasco G, Maleddu A, Pantaleo MA. New molecular targets beyond KIT and PDGFRA in gastrointestinal stromal tumors: present and future. *Expert Opin Ther Targets*. 2011 Jul;15(7):803-15.
125. Yip L, Kelly L, Shuai Y, Armstrong MJ, Nikiforov YE, Carty SE, et al. MicroRNA signature distinguishes the degree of aggressiveness of papillary thyroid carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2011 Jul;18(7):2035-41.
126. Schaefer A, Jung M, Mollenkopf HJ, Wagner I, Stephan C, Jentzmik F, et al. Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma. *Int J Cancer*. 2010 Mar 1;126(5):1166-76.
127. Galardi S, Mercatelli N, Giorda E, Massalini S, Frajese GV, Ciafre SA, et al. miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27Kip1. *J Biol Chem*. 2007 Aug 10;282(32):23716-24.
128. Gee HE, Buffa FM, Camps C, Ramachandran A, Leek R, Taylor M, et al. The small-nucleolar RNAs commonly used for microRNA normalisation correlate with tumour pathology and prognosis. *Br J Cancer*. 2011 Mar 29;104(7):1168-77.
129. Schaefer A, Jung M, Miller K, Lein M, Kristiansen G, Erbersdobler A, et al. Suitable reference genes for relative quantification of miRNA expression in prostate cancer. *Exp Mol Med*. 2010 Nov 30;42(11):749-58.
130. Corless CL, Heinrich MC. Molecular pathobiology of gastrointestinal stromal sarcomas. *Annu Rev Pathol*. 2008;3:557-86.
131. Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors (GISTs): definition, occurrence, pathology, differential diagnosis and molecular genetics. *Pol J Pathol*. 2003;54(1):3-24.
132. Fletcher CD. Clinicopathologic correlations in gastrointestinal stromal tumors. *Hum Pathol*. 2002 May;33(5):455.
133. Suster S, Fletcher CD. Gastrointestinal stromal tumors with prominent signet-ring cell features. *Mod Pathol*. 1996 Jun;9(6):609-13.
134. Hornick JL, Fletcher CD. The significance of KIT (CD117) in gastrointestinal stromal tumors. *Int J Surg Pathol*. 2004 Apr;12(2):93-7.
135. Hasegawa T, Matsuno Y, Shimoda T, Hirohashi S. Gastrointestinal stromal tumor: consistent CD117 immunostaining for diagnosis, and prognostic

classification based on tumor size and MIB-1 grade. *Hum Pathol.* 2002 Jun;33(6):669-76.

136. Miettinen M, El-Rifai W, L HLS, Lasota J. Evaluation of malignancy and prognosis of gastrointestinal stromal tumors: a review. *Hum Pathol.* 2002 May;33(5):478-83.

137. Nagasako Y, Misawa K, Kohashi S, Hasegawa K, Okawa Y, Sano H, et al. Evaluation of malignancy using Ki-67 labeling index for gastric stromal tumor. *Gastric Cancer.* 2003;6(3):168-72.

138. Rudolph P, Gloeckner K, Parwaresch R, Harms D, Schmidt D. Immunophenotype, proliferation, DNA ploidy, and biological behavior of gastrointestinal stromal tumors: a multivariate clinicopathologic study. *Hum Pathol.* 1998 Aug;29(8):791-800.

139. Martin J, Poveda A, Llombart-Bosch A, Ramos R, Lopez-Guerrero JA, Garcia del Muro J, et al. Deletions affecting codons 557-558 of the c-KIT gene indicate a poor prognosis in patients with completely resected gastrointestinal stromal tumors: a study by the Spanish Group for Sarcoma Research (GEIS). *J Clin Oncol.* 2005 Sep 1;23(25):6190-8.

140. Braconi C, Bracci R, Cellerino R. Molecular targets in Gastrointestinal Stromal Tumors (GIST) therapy. *Curr Cancer Drug Targets.* 2008 Aug;8(5):359-66.

141. Singer S, Rubin BP, Lux ML, Chen CJ, Demetri GD, Fletcher CD, et al. Prognostic value of KIT mutation type, mitotic activity, and histologic subtype in gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol.* 2002 Sep 15;20(18):3898-905.

142. Lasota J, Wang ZF, Sobin LH, Miettinen M. Gain-of-function PDGFRA mutations, earlier reported in gastrointestinal stromal tumors, are common in small intestinal inflammatory fibroid polyps. A study of 60 cases. *Mod Pathol.* 2009 Aug;22(8):1049-56.

143. Emile JF, Theou N, Tabone S, Cortez A, Terrier P, Chaumette MT, et al. Clinicopathologic, phenotypic, and genotypic characteristics of gastrointestinal mesenchymal tumors. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2004 Jul;2(7):597-605.

144. Corless CL, Schroeder A, Griffith D, Town A, McGreevey L, Harrell P, et al. PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors: frequency, spectrum and in vitro sensitivity to imatinib. *J Clin Oncol.* 2005 Aug 10;23(23):5357-64.

145. Tzen CY, Wang MN, Mau BL. Spectrum and prognostication of KIT and PDGFRA mutation in gastrointestinal stromal tumors. *Eur J Surg Oncol.* 2008 May;34(5):563-8.

146. Bachet JB, Hostein I, Le Cesne A, Brahimi S, Beauchet A, Tabone-Eglinger S, et al. Prognosis and predictive value of KIT exon 11 deletion in GISTs. *Br J Cancer.* 2009 Jul 7;101(1):7-11.

147. Kim TW, Lee H, Kang YK, Choe MS, Ryu MH, Chang HM, et al. Prognostic significance of c-kit mutation in localized gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res.* 2004 May 1;10(9):3076-81.

148. Haller F, Happel N, Schulten HJ, von Heydebreck A, Schwager S, Armbrust T, et al. Site-dependent differential KIT and PDGFRA expression in gastric and intestinal gastrointestinal stromal tumors. *Mod Pathol.* 2007 Oct;20(10):1103-11.

149. Corless CL, Barnett CM, Heinrich MC. Gastrointestinal stromal tumours: origin and molecular oncology. *Nat Rev Cancer.* 2011 Dec;11(12):865-78.

150. Laine E, Chauvot de Beauchene I, Perahia D, Auclair C, Tchertanov L. Mutation D816V alters the internal structure and dynamics of c-KIT receptor

cytoplasmic region: implications for dimerization and activation mechanisms. PLoS Comput Biol. 2011 Jun;7(6):e1002068.

151. Casali PG, Blay JY. Gastrointestinal stromal tumours: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. 2010 May;21 Suppl 5:v98-102.

152. Miettinen M, Lasota J. Histopathology of gastrointestinal stromal tumor. J Surg Oncol. 2011 Dec;104(8):865-73.

153. Emile JF, Bachet JB, Tabone-Eglinger S, Terrier P, Vignault JM. GIST with homozygous KIT exon 11 mutations. Lab Invest. 2008 May;88(5):456-7.

