

DEPARTAMENT D'ANATOMIA PATOLÒGICA

SIGNIFICADO CLÍNICO-PATOLÓGICO DE LAS
MUTACIONES DE LOS GENES *c-KIT* Y *PDGFR α* EN
TUMORES DEL ESTROMA DEL TRACTO
GASTROINTESTINAL.

SILVIA CALABUIG FARIÑAS

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2010

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 21 de desembre de 2009 davant un tribunal format per:

- Dr. Xavier Matias- Guiu
- Dr. Guzmán Ortuño Pacheco
- Dr. Andrés Cervantes Ruizpérez
- Dr. Antonio Martínez Lorente
- Dr. Samuel Navarro Fos

Va ser dirigida per:

Dr. Antonio Llombart Bosch

Dr. José Antonio López Guerrero

Dr. Antonio Pellín Pérez

©Copyright: Servei de Publicacions
Silvia Calabuig Fariñas

Dipòsit legal: V-1051-2011

I.S.B.N.: 978-84-370-7787-1

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Arts Gràfiques, 13 baix

46010 València

Spain

Telèfon:(0034)963864115



VNIVERSITATĪ VALÈNCIA

Departamento de Patología

Facultad de Medicina y Odontología

**SIGNIFICADO CLÍNICO-PATOLÓGICO DE
LAS MUTACIONES DE LOS GENES c-KIT Y
PDGFR α EN TUMORES DEL ESTROMA DEL
TRACTO GASTROINTESTINAL.**

Memoria para optar al
grado de Doctor presentada
por:

Silvia Calabuig Fariñas

Valencia, Octubre de 2009

D. Antonio Llombart Bosch, Catedrático de Anatomía Patológica, Histología y Embriología General. Profesor emérito de la Universitat de València.

D. José Antonio López Guerrero, Jefe Clínico del Laboratorio de Biología Molecular de la Fundación Instituto Valenciano de Oncología.

D. Antonio Pellín Pérez, Catedrático de Biología del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València.

CERTIFICAN QUE:

La presente tesis doctoral “Significado clínico-patológico de las mutaciones de los genes *c-KIT* y *PDGFR α* en tumores del estroma del tracto gastrointestinal” ha sido realizada por Silvia Calabuig Fariñas en el Departamento de Patología bajo nuestra dirección, y reúne todos los requisitos para su depósito y lectura.

Y para que así conste, firman la presente en Valencia, Octubre de 2009.

Fdo: D. Antonio Llombart Bosch

Fdo: D. José Antonio López Guerrero

Fdo: D. Antonio Pellín Pérez

- Becaria de la Fundación del Hospital Clínico Universitario de Valencia, subvencionada por la AECC (Junta Provincial asociada de Valencia).

- La presente tesis doctoral se ha financiado parcialmente por La Fundación Instituto Valenciano de Oncología.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a la persona que más admiro por su fuerza y voluntad de superación constante. Por enseñarme que cuánto mayor es la caída más rápido y con más fuerza hay que levantarse; por ser el referente a seguir, no tengo palabras suficientes para agradecer a mi padre todo lo que ha hecho por mí.

A mi madre por su apoyo y amor incondicional.

Al profesor D. Antonio Llombart por darme la oportunidad de hacer mi tesis y formarme en el Departamento de Anatomía Patológica; además de brindarme ayuda y comprensión siempre que la he necesitado.

A José Antonio por estar desde el primer día que llegué hasta el día de hoy siempre dispuesto a ayudarme, apoyarme y enseñarme. Porque no sé si es mejor persona que biólogo; pero para mi es insuperable en los dos aspectos. Tampoco puedo expresar con palabras la admiración que siento por él.

A la persona que ocupa mi corazón, que más ha aguantado mis llantos y desesperaciones en la tesis; a mi apoyo moral. Gracias por perdonarme todo el tiempo perdido entre nosotros.

A toda mi familia por creer en mí, en especial a mi hermano. Además a dos personas que ya no están y que admiro profundamente por enseñarme que hay que dar amor y no esperar nada a cambio; y que hay que luchar siempre hasta el final. Allá donde estéis no os hemos olvidado.

A mis apoyos incondicionales en el departamento: M^a Jesús y Jaume. Mje por ser como eres, por estar siempre dispuesta a ayudarme; por enseñarme y hacerme ver muchos aspectos erróneos tanto en el trabajo como en la vida. A Jaume por ser devoción para mí y por sorprenderme siempre en cada nueva frase que dice.

A dos adquisiciones nuevas: Nuria y Liria. Porque sin saberlo me apoyaron en un momento malo y me animan a diario con su alegría.

A dos personas de batalla: Morelva y Beatriz; por todas las horas pasadas en el departamento con ellas. Porque de dos compañeras de trabajo me llevé dos buenas amigas.

A adjuntos como Carlos Monteagudo, Samuel Navarro, Antonio Fernández y Octavio porque a su manera me han ayudado y apoyado.

A mis amigos en Valencia. A las gemelas por ayudarme en mis inicios en esta ciudad y transformar una amistad de verano en una verdadera amistad (Gloria siempre has estado ahí cuando te he necesitado, te lo agradezco muchísimo). Al resto: Mer, Livi y en especial a Lucía y José por dejarme ser una más del grupo y brindarme su amistad.

A mis amigos de Tarragona y de Facultad. En especial a Mireia, Silvia y Raúl porque aún habiendo muchos kilómetros siempre estáis ahí. Espero que los sueños que teníamos en la cafetería de la facultad se vayan cumpliendo.

A todas las personas del departamento que me han ayudado en algún momento. En especial a Rosario y Concha por su preocupación y ayuda hacia mí. A José Benavente por descubrirme la cara oculta del Word y Photoshop. A técnicos como Estela y Laura por su ayuda en el laboratorio; en especial a Elisa por abrirme los ojos y ayudarme a madurar (aún no lo he conseguido del todo). A la nueva adquisición, Lara, porque sin conocerme a penas siempre está dispuesta a echarme una mano. A los residentes, a Isidro, a Ana Clari y al resto de personal docente e investigador del departamento.

A las chicas de Calderón por enseñarme, sin saberlo, tantas cosas de la vida. En especial a Ana y Cristina por su ayuda y apoyo en los malos momentos; gracias a vosotras no tiré la toalla.

A todos aquellos que no he mencionado pero que en algún momento me han ayudado a hacer posible esta tesis.

Gracias a todos.

ÍNDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<u>I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	14
1.1. INTRODUCCIÓN	15
1.2. VISIÓN HISTÓRICA.....	16
1.3. EPIDEMIOLOGIA Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS	20
1.4. CARACTERIZACIÓN HISTOPATOLÓGICA, MORFOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DE LOS GIST	24
1.4.1. Histología de los GISTs	25
1.4.2. Inmunohistoquímica.....	26
A) Marcadores inmunohistoquímicos para el diagnóstico de GIST	26
B) Estatus de c-KIT y PDGFR α en otros tumores	34
1.4.3. Diagnóstico diferencial de los GISTs versus otros tumores.....	34
1.5. FACTORES PRONÓSTICOS	37
1.6. SÍNDROMES ASOCIADOS Y FAMILIARES DE GIST.....	43
1.7. TRATAMIENTO.....	44
1.7.1. Cirugía	44
1.7.2. Quimioterapia y Radioterapia	45
1.7.3. Tratamiento farmacológico	46
A) IMATINIB MESILATO (Glivec).....	46
B) SU01248 (SUTENT).....	52
1.8. BIOLOGÍA MOLECULAR.....	53
1.8.1. Receptores tirosina quinasa tipo III.....	53
A) c-KIT	55
• Expresión normal	58
• Mecanismos de activación y señalización intracelular.....	59
• Vías de regulación en la señal de c-KIT	61
• Patogénesis de <i>c-KIT</i>	62
• Mutaciones de <i>c-KIT</i> y pronóstico tumoral	68
• Modelos animales	69
B) SCF.....	70
C) PDGFR α	70
• Mutaciones en <i>PDGFRα</i>	72
1.8.2. Respuesta a Glivec.....	72

1.9. CITOGENÉTICA Y FISH.....	75
II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	79
2.1. HIPÓTESIS	80
2.2. OBJETIVOS	80
III. MATERIAL Y MÉTODOS	82
3.1. PACIENTES Y MUESTRAS.....	83
3.2. REVISIÓN CLÍNICO-PATOLÓGICA DE LOS CASOS.....	85
3.3. TÉCNICAS HISTOPATOLÓGICAS.....	86
3.3.1. Tinción de hematoxilina-eosina	86
3.3.2. Estudio inmunohistoquímico	87
3.3.3. Evaluación histopatológica	89
3.3.4. Micromatrices tisulares	92
3.4. ESTUDIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR	96
3.4.1. Extracción de ADN.....	97
3.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa de <i>c-KIT</i> y <i>PDGFRα</i>	99
3.4.3. Polimorfismo conformacional de ADN de cadena simple	105
3.4.4. Electroforesis en geles de agarosa.....	107
3.4.5. Secuenciación	108
A) Preparación de las muestras para la secuenciación, purificación de las amplificaciones.....	108
B) Reacción de secuenciación	110
C) Precipitación ETANOL/EDTA	110
3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	111
IV. RESULTADOS	115
4.1. CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS	116
4.1.1. Descripción de la serie de casos incluidos en el estudio	116
4.1.2. Hallazgos clínicos	120
4.1.3. Hallazgos anatomopatológicos	122
4.2. ASOCIACIONES DE LOS PARÁMETROS CLÍNICOS Y ANATOMOPATOLÓGICOS.	132

4.2.1. Variables de pronóstico clínicas	132
4.2.2. Variables de pronóstico anatomopatológicas	133
A) Parámetros macroscópicos	133
I) Tamaño	133
II) Tumores irresecables	135
B) Parámetros microscópicos	137
I) Necrosis y pleomorfismo	137
II) Clasificación según los criterios de Fletcher y Miettinen.....	139
4.3. ASOCIACIONES DE LA PROGRESIÓN TUMORAL CON LOS PARÁMETROS CLÍNICOS Y ANATOMOPATOLÓGICOS	140
4.3.1. Parámetros clínicos	140
4.3.2. Parámetros anatomopatológicos	143
A) Parámetros macroscópicos	143
B) Parámetros microscópicos	146
4.4. HALLAZGOS INMUNOHISTOQUÍMICOS.	152
4.4.1. Expresión de c-KIT	153
4.4.2. Expresión de CD34.....	155
4.4.3. Expresión de AML.....	156
4.4.4. Expresión de desmina	156
4.4.5. Expresión de vimentina.....	157
4.4.6. Expresión de S-100	157
4.4.7. Expresión de PDGFR α	158
4.4.8. Expresión de Ki-67.....	159
4.4.9. Expresión de cromogranina	161
4.4.10. Expresión de sinaptofisina	161
4.4.11. Expresión de PGP 9.5	162
4.4.12. Expresión de CD 99.....	162
4.4.13. Expresión de p53	163
4.4.14. Expresión de MDM2	66
4.5. PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD CORRELACIONADA CON LOS MARCADORES IHQ	167
4.6. HALLAZGOS EN BIOLOGÍA MOLECULAR.....	172
4.6.1. Gen <i>c-KIT</i>	173
A) Mutaciones en el exón 11.....	173
B) Mutaciones en el exón 9.....	181

C) Mutaciones en el exón 13 y 17	182
4.6.2. Gen <i>PDGFRα</i>	182
4.7. ASOCIONES DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	183
4.8. CORRELACIONES DE LAS MUTACIONES DE <i>c-KIT</i> Y <i>PDGFRα</i> CON LA PROGRESIÓN TUMORAL	191
4.9. CASOS PARTICULARES	199
4.9.1. Casos con doble mutación.....	199
4.9.2. <i>c-KIT</i> negativos	200
4.10. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA	205
4.10.1. Funciones de supervivencia según el intervalo libre de progresión	205
A) Asociación del tiempo a la progresión con los parámetros clínico-histopatológicos	206
B) Funciones de supervivencia de los hallazgos anatomopatológicos	210
C) Funciones de supervivencia en los hallazgos IHQ	216
D) Funciones de supervivencia en los hallazgos de biología molecular	219
4.10.2. Análisis multivariable de supervivencia según progresión en la serie global	228
4.10.3. Funciones de supervivencia según la supervivencia global.....	229
A) Funciones de supervivencia en los hallazgos clínicos.....	230
B) Funciones de supervivencia en los hallazgos anatomopatológicos.....	233
C) Funciones de supervivencia en los hallazgos IHQ.....	238
D) Funciones de supervivencia en los hallazgos de biología molecular.....	240
4.10.4. Análisis multivariable de supervivencia en la serie global.....	241
4.10.5. Supervivencia de los casos no tratados con Glivec.....	242
A) Funciones de supervivencia en los hallazgos clínicos de los casos no tratados	242
B) Funciones de supervivencia en los hallazgos anatomopatológicos de los casos no tratados	245

C) Funciones de supervivencia en los hallazgos IHQ de los casos no tratados.....	248
D) Funciones de supervivencia en los hallazgos de biología molecular en los casos no tratados con Glivec.....	250
4.10.6. Análisis multivariable en los casos no tratados con Glivec.....	251
4.10.7. Supervivencia de los casos tratados tratado con Glivec.....	252
A) Funciones de supervivencia en los hallazgos clínicos.....	252
B) Funciones de supervivencia en los hallazgos anatomopatológicos de los casos tratados con Glivec.....	254
C) Funciones de supervivencia en los hallazgos inmunohistoquímicos de los casos tratados con Glivec.....	255
D) Funciones de supervivencia en los hallazgos biología molecular en los casos tratados con Glivec.....	257
4.10.8. Análisis multivariable en los casos tratados con Glivec.....	262
<u>V. DISCUSIÓN</u>	263
5.1. EN RELACIÓN CON LOS HALLAZGOS CLÍNICOS.....	264
5.2. EN RELACIÓN CON LOS HALLAZGOS ANATOMOPATOLÓGICOS	273
5.3. EN RELACIÓN CON LOS HALLAZGOS DE LOS MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS	276
5.4. EN RELACIÓN CON LOS HALLAZGOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	284
5.5. EN RELACIÓN CON LOS HALLAZGOS DEL ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA	303
<u>VI. CONCLUSIONES</u>	315
<u>VII. BIBLIOGRAFÍA</u>	318

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

A: adenina

Aa: aminoácido

Ac: anticuerpo

ADN: ácido nucleico desoxiribonucleico

AML: actina del músculo liso

Arg: Arginina

ARN: ácido ribonucleico

ATP: adenosina trifosfato

Bcl-2: B-cell CLL / lymphoma 2

C: citosina

CIC: Células Intersticiales de Cajal.

Cl²Mg: cloruro de magnesio

cm: centímetros

cols: colaboradores

DLT: toxicidad limitante de dosis.

DMT: dosis máxima tolerada

DNTPs: dinucleotidodifosfato

EDTA: ácido etilendiaminetetracético

EGIST: tumores estromales extragastrointestinales

EMEA: agencia europea de medicamentos

EORTC: Organización europea de investigación y tratamiento del Cáncer
(european organisation for Research and treatment of Cancer)

Ex: exón

FDA: administración de alimentos y fármacos (Food and Drugs Administration)

FISH: hibridación in situ con fluorescencia

g: gramo

G: guanina

GANT: tumores gastrointestinales del sistema nervioso autónomo.

GI: gastrointestinal

GIST: tumores del estroma gastrointestinal.

HE: hematoxilina-eosina

ID: Intestino delgado

IGF-I: factor de crecimiento similar a la insulina

IHQ: inmunohistoquímica

ILP: intervalo libre de progresión

JM: juxtamembrana

KDa: kilo dalton

LMC: leucemia mieloide crónica.

MAPK: quinasa de proteínas activadas por mitógenos

MDM2: murine double minute 2
mg: miligramos
ml: mililitro
mm: milímetros
μ: micras
μg: microgramos
μl: microlitros
μmol: micromolar
NaCl: cloruro de sodio
NF1: neurofibromina I
ng: nanogramos
NIH: Instituto nacional de la Salud (national Institutes of Health)
NV: No valorable
OMS: organización mundial de la salud
PA: progresión acumulada que sobreviven hasta el momento.
PAS: ácido periódico de Schiff
Pb: pares de bases
PBS: solución salina tamponada
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PDGFRα: receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas
PET: tomografía por emisión de positrones
PFI: pólipo fibroide inflamatorio
PI3K: fosfatidil inositol 3-kinasa
PKCθ: proteína cinasa C theta
Pro: prolina:
Rb: Retinoblastoma
r.p.m: revoluciones por minuto
SA: supervivencia acumulada
SCF: factor de célula madre (stem cell factor)
SDS: dodecil sulfato sódico
SG: supervivencia global
SSPC: polimorfismo conformacional de ADN de cadena simple
T: timina
TAC: tomografía axial computarizada
TBE: Tris, borato y EDTA
TK: dominio tirosina quinasa
Tto: tratados con Glivec.
No ttto: No tratados con Glivec.
UV: ultravioleta
v: voltios

I.-REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 INTRODUCCIÓN

Los **tumores del estroma gastrointestinal (GIST)** han tenido una de las historias recientes más asombrosas de la oncología. Probablemente no existe otro caso en el que una enfermedad cancerosa haya sufrido tal revolución en tan escaso tiempo. A ello han contribuido en gran medida el descubrimiento de un fármaco, utilizado para la leucemia mieloide crónica aparentemente sin relación alguna con el GIST, que permite controlar la enfermedad con una eficacia inusitada.

Los **GIST** fueron desconocidos en su etiología, evolución clínica y mecanismos moleculares hasta hace unas décadas. Habiendo sido relegados durante mucho tiempo, al grupo de las llamadas "neoplasias huérfanas", ya que eran tumores sin una estirpe definida. En pocos años se ha descubierto que centenares de personas diagnosticadas de otros tumores mesenquimales como los leiomiomas, leiomiomas y leiomioblastomas padecían, en realidad, GIST. Las numerosas investigaciones llevadas a cabo han permitido que sean reconocidos como identidades independientes, ya que recientemente ha sido descubierta la patogénesis molecular de estos tumores con el marcador **c-KIT (CD 117)** implicado; el cual se encuentra mutado a nivel del gen e hiperexpresado a nivel proteico en una importante proporción de casos. La hiperexpresión de c-KIT constituye una diana eficaz frente a inhibidores específicos de actividad tirosina quinasa como el **STI 571** (Imatinib mesilato, Glivec), y que en el caso concreto del GIST ha supuesto un cambio radical en el manejo clínico de estos pacientes debido a la mala evolución y agresividad de estos tumores.

1.2 VISIÓN HISTÓRICA

Entre las décadas de los 30 a los 50 del siglo XX, los tumores mesenquimales primarios gastrointestinales fueron clasificados como leiomiomas o leiomiosarcomas, y los tumores con rasgos epitelioides fueron designados como leiomioblastomas o leiomiosarcomas epitelioides, siendo clasificados por la OMS y AFIP bajo el epígrafe de Tumores estromales/músculo liso. Las primeras clasificaciones datan de mediados del siglo XX, cuando Dudley y cols. (1942) así como Ravinovich y cols. (1949) realizando los primeros ensayos que les llevaron a considerar esencialmente estas neoplasias como procesos de evolución benigna. La contrapartida maligna de algunos de estos casos fue estudiada por France y Brines (1950), así como por Martín (1960) sugiriendo una naturaleza mioide y posible carácter muscular liso de dicho tumores ¹.

Posteriormente, en la década de los 60-70, los estudios ultraestructurales con microscopía electrónica demostraron la ausencia de diferenciación muscular lisa en los llamados “leiomiomas gástricos”. Arthur Purdy Stout (1962) ² recogió 69 casos de estas neoplasias, designándolas con el término de “leiomioblastomas”; término que incluye los tumores con diferenciación mioide y epitelioides que presentan evolución clínica dudosa (benignos, malignos y de potencial no determinable); clasificación que ha perdurado hasta épocas muy recientes.

La aplicación de la inmunohistoquímica a principios de los 80 confirmó lo que se observaba en la microscopía electrónica. La expresión de marcadores musculares (desmina y actina) era muy variable en estos tumores, en comparación con neoplasias del músculo liso propiamente derivadas de la pared vascular o el miometrio. Además, algunos tumores estromales eran positivos para marcadores neuronales (S-100, enolasa específica neuronal y PGP 9.5) que no se expresan en tumores del músculo liso.

El término de tumores del estroma gastrointestinales (GIST) fue introducido por Mazur y Clark ³ en 1983. Trabajando con técnicas inmunohistoquímicas y microscopía electrónica determinaron que los leiomiomas gástricos eran

negativos para S-100 y que ultraestructuralmente no tenían características de leiomiocitos (células musculares lisas). Contrariamente, los GIST eran ocasionalmente positivos para este marcador, postulando su posible origen schwanniano a partir del plexo nervioso mientérico. Un año después (1984), Herrera y cols.⁴ confirmaron, utilizando las mismas técnicas, la naturaleza neural de una neoplasia maligna intestinal denominándola “plexosarcoma”; término que fue substituido por el de tumor del sistema nervioso autónomo del tracto gastrointestinal (GANT) a causa de coincidir con la publicación de Walker y Dvorall (1986)¹; fueron clasificados dentro de los GIST pero considerando una posible diferenciación neuroendocrina.

En 1987, Barker y cols.⁵ consiguieron clonar **c-KIT** usando células somáticas híbridas de humano - ratón; localizando dicho gen en el cromosoma 4. Dos años más tarde Mattei y cols. localizaron el gen en la región **4q11-q12** por hibridación in situ⁶⁻⁸.

En 1990 y gracias a la inmunohistoquímica, se pudo reafirmar el origen mesenquimal de estas neoplasias observando que entre el 60-70% eran positivas para **CD34** (antígeno celular progenitor de la hematopoyesis); siendo éste el primer marcador considerado relativamente específico para el diagnóstico de los GIST.

Kindblom y cols en 1998⁹ postularon que los GIST estaban relacionados no con las células musculares sino con una población de células menos estudiadas, de morfología fusiforme y que se encuentran distribuidas a lo largo de todo el tracto gastrointestinal, las Células Intersticiales de Cajal (**CIC**) del plexo mientérico, responsables de los movimientos peristálticos del tracto digestivo. Las CIC fueron descritas a finales del siglo XIX por Santiago Ramón y Cajal (1893)¹⁰; éstas establecían una red localizada en el plexo de Auerbach regulando la comunicación entre neuronas y fibras musculares lisas, necesarias para controlar los movimientos peristálticos intestinales.

Actualmente sabemos que las CIC están conectadas a los leiomiocitos mediante uniones gap y adecuadamente cercanas a los axones de las neuronas motoras entéricas. Estos hechos sugieren que las CIC actúan como

células marcapaso, controladoras de la peristalsis y la contracción muscular y posiblemente como mediadores de neurotransmisores¹⁰. Histogénicamente, las CIC poseen un origen mesenquimal y se diferencian desde una célula progenitora precursora intestinal, la cual también podría dar origen a las células musculares lisas. La expresión del protooncogén KIT, el receptor del stem cell factor, sería necesaria para la diferenciación y proliferación de células precursoras hacia CIC^{11, 12}. Tanto las células del músculo liso como las células neuronales del tracto digestivo tienen una inmunohistoquímica y ultraestructura semejantes a las CIC¹³. Es más, en estudios in vitro se ha demostrado la capacidad de diferenciación de las CIC a células del músculo liso. En este sentido, los GISTs presentan características en común con las CIC del plexo mientérico que se encuentra en el estómago e intestino, entre las que se incluye una expresión frecuente de CD34, la cadena pesada de la miosina de músculo liso embrionario y la nestina¹⁴. En posteriores trabajos de laboratorio se ha demostrado que ratones deficientes en la expresión de c-KIT o de su ligando, carecen de las CIC del plexo mientérico, indicando que el eje c-KIT - SCF es esencial en el desarrollo de estas células¹²⁻¹⁵.

Por otra parte, la observación de que las CIC podían ser detectadas inmunohistoquímicamente con un anticuerpo frente a c-KIT que permitió confirmar que en los GISTs este marcador se expresaba intensamente^{2-4, 9-16}. Este descubrimiento no sólo reforzaba la hipótesis de que los GISTs podían originarse a partir de un progenitor “stem” o pluripotente común al de las CIC, sino que también significaba contar con un marcador más sensible y específico en el diagnóstico de los GIST. La ausencia de diferenciación neuroendocrina de las CIC, evidenciada con microscopía electrónica¹⁷, excluye el que estas células tengan una capacidad bifuncional neural y muscular como se ha postulado a partir de sus observaciones en tumores GIST¹⁰. Mientras que la posibilidad de que posean un predecesor biológicamente más inmaduro y pluripotencial común, como defienden entre otros Kindbloom e Hirota^{2-4, 9-16} y más recientemente por Kitamura y cols.¹⁸ sigue siendo un argumento válido en estos tumores, que está abierto a todas las proliferaciones malignas en general (células precursoras o células madre transformadas) pero no soluciona el debate de la génesis de los GIST que hoy por hoy no está resuelta.

El descubrimiento por parte de Hirota y cols. en 1998 de la ganancia de función por **mutaciones** en el protooncogén **c-KIT** y su **sobreexpresión** de **CD117** en GIST, abrió una nueva era para el diagnóstico de estos tumores ¹⁹. Este marcador, que se expresa en células madre hematopoyéticas, mastocitos, melanocitos y las propias CIC; pudo diferenciar a los leiomiomas, leiomiomas y schwannomas de los tumores del estroma gastrointestinal ya que estos últimos hiperexpresan esta proteína en un 95%. Además, en aproximadamente el 85% de los casos según las series, esta hiperexpresión es consecuencia de una serie de mutaciones activantes en los exones de *c-KIT* que codifican para la región yuxtamembrana y dominios tirosina quinasa del receptor ¹⁹. En posteriores estudios como el de Lasota y cols.²⁰ se demostró que las mutaciones activantes en *c-KIT* y la inmunopositividad para c-KIT ocurrían exclusivamente en GIST y nunca en aquellos tumores como los leiomiomas o leiomiomas; además parecía haber una asociación directa entre la presencia de mutaciones en *c-KIT* y el grado de malignidad de los GIST.

Pero sin duda el acontecimiento que revolucionó el manejo clínico de estos tumores fue el publicado por Joensuu y cols.²¹ en 2001. Estos autores describieron el primer caso de GIST metastásico tratado con el **STI-571** ²¹ (Glivec, Novartis, Basel, Suiza), un inhibidor específico de la actividad enzimática de las tirosinas quinasa, diseñado para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica (LMC) pero que puede actuar sobre otras proteínas con actividad tirosina quinasa como por ejemplo los receptores *c-KIT* y *PDGFR α* . Estos autores reportan el caso de una paciente que en 1996 presentó una masa abdominal, con múltiples recidivas y metástasis en los años siguientes hasta que en Marzo del 2000 se le ofrece la posibilidad de participar en el estudio con STI-571 en el Helsinki University Central Hospital. El tratamiento se inició con cuatro cápsulas de 100 mg de STI-571 una vez al día. Antes de empezar el tratamiento con STI-571 el tumor medía 112,5 cm² al cabo de ocho meses el tumor medía 28 cm² y además de no aparecer nuevas lesiones, de las 28 metástasis hepáticas desaparecieron 6. Con este estudio quedó demostrado que el STI-571 también es efectivo en tumores del estroma gastrointestinal ²¹.

Heinrich y cols.²² por su parte, en 2003, se plantearon la posibilidad de que existiera un segundo receptor tirosina quinasa implicado en la patogénesis del GIST y especialmente en aquellos que carecían de mutaciones en *c-KIT*²²⁻²⁴. Para poder descubrir si existía un segundo receptor para estos tumores realizaron inmunoprecipitaciones con antisera policlona (panRTK antisera) que se une a péptidos de las regiones de las secuencias fuertemente conservadas en los receptores tirosina quinasa; hallando como resultado una fosfoproteína alrededor de 150 y 170 kDa correspondiente con *PDGFRα*. Un análisis genético más exhaustivo demostró que como sucede en *c-KIT*, la hiperexpresión del regulador era consecuencia de las mutaciones activantes de las distintas regiones que codifican para el dominio yuxtamembrana y receptores tirosina quinasa del gen²⁵.

1.3-EPIDEMIOLOGIA Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Los GIST son los tumores mesenquimales más comunes del tracto digestivo y suponen el 0,1-3% de todos los tumores gastrointestinales. Sin embargo, estas cifras pueden variar significativamente²⁶. En un principio, se pensaba que, dentro de los sarcomas intestinales, los leiomiomas eran los más frecuentes y los GIST auténticas rarezas; pero cada vez más centros están revisando antiguas biopsias de leiomiomas que en su mayoría resultan ser GIST. La incidencia en todo el mundo de los tumores primarios GIST se encuentra entre un 20/10⁶ individuos /año; siendo malignos el 20-30% de los mismos^{27,28,29,30,31}. Se estima que cada año aparecen entre 5000 y 10000 nuevos casos en todo el mundo. Estas neoplasias presenta una ligera predilección por los varones (1,5/1) entre la quinta y la séptima década de vida; y rara vez ocurren en jóvenes^{32,78}.

Desde el punto de vista clínico, los GIST son tumores esporádicos y únicos; si bien, excepcionalmente, se han diagnosticado en una misma familia diferentes casos de estas neoplasias³³⁻³⁵. También se ha observado que hay

enfermedades que aumentan el riesgo de GIST como es el caso de la Neurofibromatosis tipo I (NF1) pero su comportamiento biológico es diferente, ya que en diversos estudios realizados no se ha detectado, a diferencia de los GIST puramente esporádicos, ninguna mutación en *c-KIT* o se han hallado mutaciones totalmente diferentes^{36, 37}.

En cuanto a su localización, la mayor incidencia de estos tumores se produce en el estómago (60-70%), seguido del intestino delgado (20-30%), el esófago (<5%)^{29, 38-43} y en otras localizaciones extragastrointestinales (<5%). como el mesenterio, el omento, retroperitoneo e incluso la pared vesical y la vesícula biliar⁴⁴⁻⁴⁸ (Tabla 1).

El tamaño de los GIST es muy variable con tumores comprendidos entre los 2 a 30 cm. y entre un 60-70% se presentan como una masa circunscrita y pseudo-encapsulada, pudiendo dar síntomas consecuencia del efecto masa como son la anemia o el sangrado por ulceración de la mucosa en función de su localización anatómica^{47, 49, 50, 51, 229}.

TABLA 1: Distribución en frecuencia de la localización de los tumores GIST.

LOCALIZACIÓN	FRECUENCIA %
Estómago	60-70%
I.Delgado	20-30%
Colón	<5%
Otros (epiplón, mesenterio, esófago, Apéndice, páncreas, retroperitoneo)	<5%

Sin embargo, muchos GIST son asintomáticos; lo que hace que su diagnóstico sea tardío y que los enfermos se presenten en estadios avanzados. En ocasiones también se han descrito series de GIST hallados de forma accidental en pruebas radiológicas, en las revisiones ginecológicas, urológicas, en endoscopias e incluso en necropsias. Los GIST agresivos a menudo metastatizan en uno o dos años; aunque haya habido una aparente resección completa. Sin embargo, hay GIST que se desarrollan después de 5 ó 15 años o más después de la primera escisión^{28, 52}.

En función de su localización la epidemiología y clínica puede variar:

- **Localización gástrica** La mayoría de los pacientes tienen entre 63 y 70 años. Sin embargo, también podemos encontrar GIST en niños (<1%) y menos de un 10% son diagnosticados en pacientes menores de 40 años. Se estima que entre un 20-25% de GIST gástricos tienen un comportamiento maligno. Suelen manifestarse con un dolor vago en el abdomen superior (50-70%) y hemorragias gastrointestinales (20-50%).

El tamaño de los tumores puede variar de pequeños nódulos de unos pocos cm. a más de 40 cm.; presentando de media un diámetro de 6-8cm. si bien, se ha observado que en intervenciones por otras patologías se han hallado más de un 10% de GIST gástricos incidentales de pequeño tamaño y sin clínica ^{41, 53}.

- **Los GIST de localización en intestino delgado** envuelven el yeyuno y el íleon, constituyendo aproximadamente el 30% de todos los GISTs con localización específica. Los GIST de localización intestinal, por lo general tienen un comportamiento más agresivo en comparación a los GIST de localización gástrica ⁴⁰. Aproximadamente entre un 4-5% de los tumores se localizan en la región duodenal; algunos de los cuales pueden envolver el páncreas y simular clínicamente un tumor pancreático ⁵⁴. Los GISTs del intestino delgado ocurren en adultos con una media de 59 años, siendo extremadamente raros en niños. El tamaño tumoral puede variar entre diminutos nódulos y tumores mayores de 20 cm. que se extienden por todo el abdomen y pueden presentar sangrado, obstrucción, dolor o perforación como principales síntomas ^{40, 55}.

- **GIST de localización esofágica** no son frecuentes (<2%). Son en una proporción 3:1 más frecuentes los leiomiomas. Presentan como síntoma más común la disfagia, pero a menudo constituyen masas mediastínicas asintomáticas; se suelen localizar, en la mayoría de los casos, en la porción distal del esófago ^{42, 56}.

- **GIST de localización colon:** Tienen una frecuencia entre el 1-2% de todos los GISTs, como el resto de GIST ocurren en adultos. Pueden presentar tenesmo, dolor local, estreñimiento, fiebre de origen desconocido y hemorragias digestivas bajas como síntomas principales ⁵⁰.

- **GIST de localización rectal:** Son aproximadamente un 4% del total de GISTs, en su mayoría correspondiéndose con tumores pequeños que se localizan durante una revisión prostática. Los tumores grandes presentan sintomatología de obstrucción rectal, sangrado o ambos ^{49, 57}.

- **Localización extragastrointestinal (EGIST):** La frecuencia de estos tumores es muy baja, sin superar el 5% de todos los GISTs ⁵⁸. Como ocurre con otras neoplasias de partes blandas, los EGIST probablemente se originan en células muy inmaduras pluripotenciales, que, en este caso, seguirían una línea de diferenciación hacia células c-KIT+ / tipo célula intersticial de Cajal. Se presentan en adultos, en epiplón o mesenterio y, menos frecuentemente en retroperitoneo ⁴⁷. Generalmente tienen gran tamaño (>10 cm. de diámetro) cuando se diagnostican y con frecuencia (50%) siguen un curso agresivo con recidivas o metástasis ^{47, 48}. Se han sugerido como criterios predictivos de evolución la densidad celular, el índice mitótico y la existencia de necrosis.

El pronóstico clínico de estos tumores presenta cierta asociación con la distribución anatómica (independiente del tamaño, del número de mitosis y de la edad del paciente) con una tendencia a ser de mayor malignidad los localizados en intestino delgado y más benignos los esofágicos ^{17, 46, 59, 60}. Cuando progresan tienden a hacerlo en la cavidad peritoneal en forma de múltiples metástasis hepáticas y con menor frecuencia en huesos. Los signos de malignidad más evidentes son la presencia de metástasis o la invasión de órganos vecinos.

1.4-CARACTERIZACIÓN HISTOPATOLÓGICA, MORFOLÓGICA E INMUNOHISTOQUÍMICA DE LOS GIST

El término GIST se aplica en la actualidad para designar a un grupo específico de tumores que comprenden la mayor parte de los tumores mesenquimales del tracto gastrointestinal que no derivan del músculo liso ni tienen un origen nervioso.

Los GIST son tumores del tejido conectivo del tubo digestivo pudiendo aparecer desde el esófago al ano. Macroscópicamente suelen tener una forma redondeada, lobulada o multilobulada, de bordes bien definidos y color blanquecino y suelen ser parcial o predominantemente extramurales, centrados en la submucosa, muscular propia o ambas. Su superficie al corte es carnosa y fibrosa, a veces granular, con frecuentes áreas de hemorragia y necrosis y, raramente, cambios quísticos. Los GIST gástricos suelen tener apariencia sólida, desarrollándose a partir de la subserosa, o en forma de masas polipoides intraluminales. Sin embargo, algunos GIST de mayor tamaño tienen formas protuberantes dando lugar a masas pedunculadas de la pared gástrica envueltas en muscular propia. Algunos se pueden extender al omento e hígado; e incluso llegar al páncreas y colon necesitando incluir estos órganos en su resección.

A nivel microscópico, una de las principales características, es que los GIST son histológicamente diferentes de los leiomiomas, leiomiosarcomas y schwannomas, destacando entre otras cosas, por ser mucho más celulares que otros sarcomas GI y presentar una actividad mitótica variable pero generalmente <5 mitosis/50HPF ^{41, 54}. Además muestran menor eosinofilia citoplasmática, lo cual es reflejo de su menor contenido en filamentos citoplasmáticos ⁵⁴. También dentro de los mismos GIST hay características distintivas entre un subtipo y otro, por ejemplo los GISTs intestinales son en su mayoría fusocelulares mostrando agregados eosinófilos PAS positivos de fibras de colágeno con frecuentes áreas anucleares intratumorales ^{10, 40, 61}.

1.4.1: HISTOLOGÍA DE LOS GIST

En los GIST podemos distinguir tres variantes histológicas: la variante fusocelular (70%), la variante epiteliode (20%) y los tipos mixtos (5%); muy rara vez se pueden observar también formas atípicas:

- **GIST con diferenciación fusocelular** se caracterizan por estar constituidos por células elongadas, uniformes, dispuestas en fascículos cortos, paralelos u ondulados. Dichas células poseen citoplasma pálido, eosinófilo, semejando células musculares lisas. Con aspecto fibrilar y márgenes citoplasmáticos imprecisos adoptando aspecto sincitial. El núcleo oval, elongado, tiene cromatina laxa y nucleolo poco prominente, siendo frecuentes las vacuolas paranucleares. Muestran cierta tendencia a la formación de empalizadas nucleares que pueden confundirse con cuerpos de Verocay característicos de los schwannomas. El componente estromático varía, siendo generalmente escaso y combinando áreas hialinas y focos mixoides. La vascularización capilar es fina. Hay frecuentes hemorragias intersticiales así como focos de infiltración linfocitaria polinuclear. Pueden observarse signos de reabsorción con transformación quística, en los tumores de gran tamaño (Fig.1).

- **Los GIST con diferenciación epiteliode** tienen células con un aspecto poligonal y citoplasma acidófilo bien definido. Mantienen una disposición homogénea, uniforme con núcleos redondos u ovals de cromatina laxa. Pueden incluso adoptar una disposición lobulada o en nidos que recuerdan a los tumores epiteliales. Carecen de secreción citoplasmática pero con frecuencia poseen vacuolas envueltas en densificación protoplasmática acidófila a modo de ribete. La apariencia epiteliode, que fue base de las primeras descripciones del término leiomioblastoma, ofrece una falsa apariencia de mayor malignidad por cuanto su polimorfismo es superior a la variante fusocelular ² (Fig.1).

- Por último, en los **GIST con variante mixta** se combinan áreas epitelioides y fusocelulares, incluso se encuentran células de transición que progresivamente van adoptando una apariencia epiteliode a partir de formas fusiformes o

viceversa. Básicamente carece de significado pronóstico y biológicamente su comportamiento es semejante a los tipos puros (Fig.1).

- En raras ocasiones también podemos hablar de **otras variantes** por ejemplo con presencia de fibras hialinas de tipo esquenoide en bandas gruesas fragmentadas en sus extremos y en agregados homogéneos o pseudofibrilares que suelen ser más frecuentes en los tumores intestinales y que son PAS+. No deben confundirse con tumores nerviosos de tipo schwanniano en donde también aparecen. Algunos casos presentan estroma mixoide más abundante y pseudomucinoso, que cuando corresponden a tipos epitelioides pueden ser motivo de confusión con carcinomas. Se han descrito además variantes anaplásicas semejantes a leiomiomas provistas de un fuerte pleomorfismo, necrosis y hemorragias. Éstas suelen corresponder con un número elevado de mitosis y por ello son de peor pronóstico clínico.

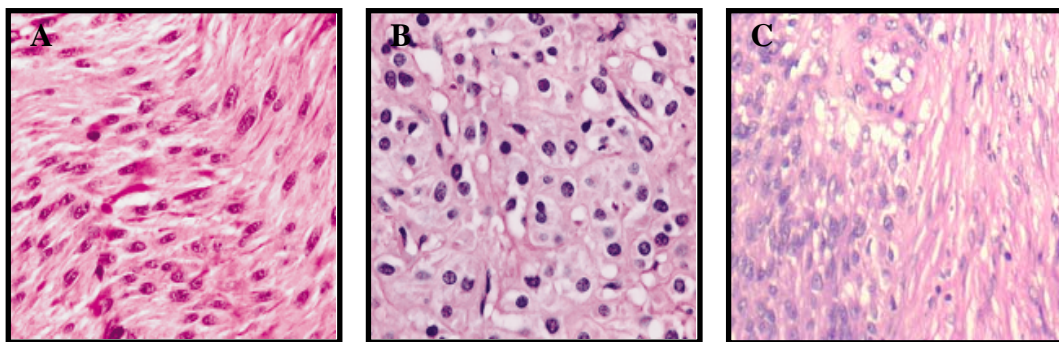


Figura 1: Ejemplos de histología fusiforme (A), epitelioides (B) y mixta (C).

1.4.2-INMUNOHISTOQUÍMICA

A) Marcadores inmunohistoquímicos para el diagnóstico de GIST.

El principal criterio histológico para incluir un GIST dentro de esta particular categoría es su positividad frente al **c-KIT (CD 117)** (DAKO). Esta positividad tiene que ser intensa, citoplasmática y membranosa, aunque se admite que algunos tumores expresan la positividad en forma de manchas con acúmulos perigolgianos coexistiendo con una tinción citoplásmica más débil y difusa. En uno u otro caso, la tinción alcanza al 90%-100% de las células tumorales ^{9, 14}(Fig.2).

Sin embargo, existen casos en que la tinción es más débil (como es el caso de los GISTs epitelioides) o sólo membranosa además de tener una distribución más irregular de células positivas (20%-30%). Estos casos pueden ser motivo de confusión y deben ser evaluados de modo riguroso. Por ello, es importante que la técnica sea siempre la misma utilizando un anticuerpo y una dilución constantes y empleando control externo y control interno. Los mastocitos intratumorales son un buen control interno positivo ⁶².

La mayoría de los autores refieren una positividad constante en los tumores GIST aunque otros como Medeiros admiten que probablemente pueda existir un pequeño número de tumores negativos (5%) ⁶³, no siendo, por tanto, un requisito imprescindible la positividad para c-KIT para diagnosticar un GIST. Además de que puedan existir GIST con ausencia de mutaciones y/o de sobreexpresión de c-KIT, una negatividad inmunohistoquímica para c-KIT puede obedecer a otros motivos, como escasez de representación tumoral en biopsias endoscópicas y en tumores con distribución irregular de la oncoproteína, pérdida de antigenicidad por manipulación inadecuada de la muestra o defecto en el procesamiento técnico o alteraciones postratamiento.

Además, algunos tumores GIST pueden mostrar una positividad no difusa sino limitada a un escaso porcentaje de células tumorales (5-20%), lo cual puede justificar algunos casos inmunohistoquímicamente negativos ⁶³.

Como la mayoría de tinciones se efectúan en cortes procedentes de tumores incluidos en parafina se deben tener en cuenta algunas circunstancias que pueden alterar el resultado dando lugar a un falso negativo o la negatividad real del marcador:

1. Mala fijación del tumor con formol. Excesivo calor en la elaboración del bloque de parafina. Prolongado almacenamiento de cortes de parafina.
2. Biopsias endoscópicas de tamaño pequeño en que el tejido es muy limitado y se produce difusión de la inmunotinción o mala distribución del anticuerpo.

3. Negatividad real debida a que se han producido mutaciones génicas que bloqueen la expresión de la proteína.
4. Negatividad real por falta de la mutación del gen *c-KIT* pero con la mutación de otra tirosina quinasa relacionada con el receptor KIT como el receptor del derivado del factor plaquetario alfa (*PDGFR α*).

En los casos dudosos en que el tumor es compatible con un GIST aunque no exprese la proteína debe hacerse un estudio mutacional con técnicas de biología molecular que de alguna forma confirmaría el diagnóstico de GIST, especialmente en los casos c-KIT negativos.

Los GIST tienen un inmunofenotipo característico más allá de la positividad para c-KIT, pudiendo ofrecer mayores garantías en el diagnóstico de GIST (Tabla 2):

- **BCL-2** (80%): protooncogen localizado en la membrana del retículo endoplasmático, en la envoltura nuclear y en otras membranas de las mitocondrias. La función de la proteína es evitar la apoptosis; por lo que en neoplasias su sobreexpresión evita la muerte celular^{64, 65}.
- **CD34** (60-70%): es un antígeno de células precursoras del sistema hematopoyético cuya detección a través de la inmunohistoquímica puede ser útil para identificar células leucémicas y tumores vasculares, pero igualmente ha servido para precisar el diagnóstico de numerosos tumores de partes blandas con apariencia fusocelular. El CD34 es una glicoproteína transmembranosa monomérica con una masa molecular de aproximadamente 115 kDa, localizada en 1q32; inicialmente se detectó en las células linfohematopoyéticas, precursoras de la serie mieloide y presentes en la médula ósea, este antígeno se observa también en el endotelio vascular, en las células dendríticas de la dermis superficial, en el endoneuro, en subpoblaciones de fibroblastos y en diversos tumores de partes blandas como sarcoma de Kaposi, 50% de angiosarcomas, dermatofibrosarcoma protuberans, GIST, lipomas atípicos y fusocelulares y tumor fibroso solitario. El tipo de marcaje es similar al del c-KIT. El CD34 es positivo en el 60-70% de los GIST, mayormente en casos esofágicos y rectales (casi 90% de ellos), sin que

haya diferencia de expresión entre benignos y malignos. Los GIST intestinales en general muestran la más baja positividad al CD34 (50%) ya sean benignos o malignos ^{40, 41} (Fig.2).

- **Actina del músculo liso (AML)** (30-40%): típicamente presente en las células musculares lisas ya sean neoplásicas o normales y en algunos miofibroblastos, localizado el gen en 10q22-q24. La expresión puede ser focal o global y suele ocurrir que los tumores AML positivos son CD34 negativos y al revés, sin embargo hay tumores que muestran un patrón mosaico ^{40, 41}. Se ha descrito que la positividad para AML en GIST puede ser estadísticamente favorable en el pronóstico de GIST gástricos y en intestino delgado ^{41, 66}(Fig.2).

- **S-100** (10%): factor neuronal que diferencia a los GANT de los GIST, aunque su expresión es rara en GIST, cuando se da es más frecuente en la localización intestinal que en la gástrica. Proteína ácida ligada de Ca⁺⁺ y Zn⁺⁺; se encuentra tanto en el citoplasma como en el núcleo y se detecta en los melanocitos, células de Langerhans y de Schwann, glándulas ecrinas y apocrinas, nervios, músculos, células mioepiteliales, condrocitos y sus contrapartidas malignas ⁵⁵. En base a un estudio de pocos casos, se ha descrito que la positividad de S100 es un factor pronóstico adverso en GIST gástricos pero no en intestinales ^{40, 41}(Fig.2).

- **Desmina** (5%): proteína de los filamentos intermedios típica de las células musculares lisas, esqueléticas y cardíacas, localizada en el cromosoma 2q. Raramente se expresa en GIST, en intestino delgado es muy poco frecuente (<1%) pero es habitual en los GIST epitelioides gástricos de manera focal. Se expresa en células musculares y en miofibroblastos. Este marcador es utilizado para tumores del músculo esquelético y liso. La positividad de desmina esta asociada con la negatividad a actina ⁶⁷. Se ha observado que el tratamiento con Glivec puede inducir la positividad de este marcador en GIST ⁶⁷ (Fig.2).

Existen otros marcadores, que sin formar parte del panel básico de diagnóstico, pueden aportar información al diagnóstico histopatológico de los GIST:

- **Vimentina:** es uno de los cinco mayores tipos de filamentos intermedios plasmáticos del citoesqueleto, estabilizando la arquitectura del citoplasma. El gen se localiza en la región 10p13. Característico tanto de células mesenquimales como los fibroblastos y células musculares lisas. Pero también se puede expresar en algunos tumores epiteliales o neurales.
- **Cromogranina:** la proteína se encuentra en 14q32, está relacionada con las catecolaminas para el almacenamiento de los gránulos neurosecretorios. Normalmente se encuentra en tumores neuroendocrinos como el feocromocitoma, adenoma de parótida, carcinoma medular de tiroides, cáncer de pulmón, tumores de las células de los islotes del páncreas y tumores glómicos. La positividad en GIST denota junto a la sinaptofisina una diferenciación neuroendocrina (GIST/ GANT).
- **Sinaptofisina:** es la mayor glicoproteína de transmembrana glicosilada que haya sido aislada de vesículas presinápticas neuronales. Normalmente se expresa en tumores neuroectodérmicos y neuroendocrinos.
- **P53:** gen supresor de tumores representativo de muchas alteraciones genéticas en diferentes neoplasias. El producto del gen es una proteína nuclear implicada en el control del ciclo celular, apoptosis y en el mantenimiento de la estabilidad genómica. La proteína mutada tiene una vida media mayor que la normal y es detectada por técnicas IHQ. Se encuentra sobreexpresada en muchos tumores, por la inactivación de p53, por la pérdida de un alelo o una mutación ⁶⁸. Aunque hay muy pocos estudios al respecto, en ellos se puede relacionar que a mayor expresión de p53 mayor malignidad; sin embargo p53 no está aceptado como criterio único de malignidad ⁶⁸. Los datos de pronósticos no se basan en marcadores del ciclo celular como son la p53, MDM2, p16, cuya expresión es variable ⁶⁹(Fig.2).
- **PDGFR α :** se expresa en los cuerpos ganglionares del plexo mientérico y en las células schwann pero no en las células intersticiales de Cajal, aunque quizás puede ser que se exprese en un nivel muy bajo y que no se pueda detectar por inmunohistoquímica. Existe un subgrupo de GIST que presenta mutaciones en *PDGFR α* ; el valor IHQ de este marcador todavía no está

establecido en el caso de GIST; si bien parece expresarse con mayor frecuencia en GIST de variante epitelioide ^{70,71} (Fig.2).

- **PGP 9.5:** La proteína producto del gen es conocida como ubiquitina carboxil-terminal hidrolasa-1. Es una proteína citosólica 24,8 kDa que elimina las ubiquitinas de otras proteínas y las protege de la degradación por proteasas. Es expresado fuertemente en neuronas de vertebrados y células neuroendocrinas, donde constituye entre un 1-5% del total de proteínas solubles. PGP 9.5 se expresa en adenomas de pituitaria, carcinoma medular de tiroides, tumores de células de los islotes pancreáticos, paraganglioma, neuroblastoma y tumor carcinoide ^{72,73}.

- **KI-67:** Es una fosfoproteína nuclear (395Kda, 1q25-qter) de función desconocida pero seguramente está relacionada con la reorganización de la cromatina, determinando la actividad proliferativa celular. Se expresa en todas las células en cualquier fase del ciclo celular, excepto la fase G0 (fase quiescente de la célula), así que constituye un marcador del potencial de las células a la división mitótica, indicando el índice de proliferación celular ^{74,75}. En el caso de GIST existe una muy buena correlación de la inmunohistoquímica para este marcador con el número de mitosis.

Se han propuesto varios estudios analizando el valor pronóstico del marcador de proliferación Ki67 ⁵³. Aunque es un excelente marcador nuclear de las células en ciclo proliferativo, los estudios comparativos frente al índice mitótico por conteo en tinción con Hematoxilina-Eosina, no ofrecen resultados ventajosos, siendo superponibles entre sí por lo que puede ser un medio de confirmación en aquellos casos en que el recuento del índice mitótico presente dificultades. (Fig.2).

- **CD99:** es una glicoproteína (32kD) de superficie celular implicada en el proceso de adhesión celular de las células T. El gen codifica un antígeno de superficie MIC2 localizado en la región pseudoautosomal (PAR) al final del brazo corto de la X y la Y. Es útil en leucemias de células T.

- **MDM2:** es una oncoproteína promotora de la supervivencia celular y progresión del ciclo celular por inhibición de p53. Su gen se localiza en

12q14.3q15. En los sarcomas MDM2 es aberrante, con una amplificación de éste la célula escapa del control de crecimiento por p53 y Rb.

Por otra parte cabría destacar que dentro de los GIST existen los llamados **GANT** (tumor gastrointestinal del sistema nervioso autónomo); los cuales presentan características ultraestructurales propias del sistema nervioso autónomo ^{4, 76} como serían la presencia de gránulos de neurosecreción, uniones celulares rudimentarias, así como la presencia de filamentos intermedios ^{76, 77,78}. De hecho se observa positividad para marcadores neuroendocrinos en aquellos casos que son clasificados como GANT, caracterizados por expresar sinaptofisina, cromogranina y enolasa neuronal específica. Los tumores GANT conforman un conjunto de neoplasias que incluyen tumores de variante fusocelular y/o epitelial y desde el punto de vista clínico patológico, la mayoría de los GANT presentan una evolución desfavorable. Actualmente los GIST y los GANT se consideran un mismo tumor, ya que los GANT también presentan mutaciones *c-KIT*, con la peculiaridad de que estos tumores expresan marcadores neuroendocrinos ⁷⁹.

-Nuevos marcadores de GIST:

- **Proteína quinasa C theta (PKC θ)**: es un efector “downstream” en la activación de la vía de c-KIT y se está sugiriendo como una posible diana inhibitoria. Es una molécula implicada en la activación de las células T, en la transducción de señales del músculo liso y en la diferenciación neuronal. La gran mayoría de los GIST (85%) son positivos para el marcador ^{80, 81}.
- **DOG1**: es un nuevo gen llamado como “discovered on GIST” en matrices de expresión, sin conocer la función que ejerce en su patología. Es independiente del estatus mutacional y está ausente en la inmensa mayoría de neoplasias no-GIST, con una mayor especificidad y sensibilidad que c-KIT ⁸²⁻⁸⁴.
- **P16**: es un gen supresor de tumores, regulador del ciclo celular como complejo inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 4 juntamente con p14 y p15. El p16 es un efector en la vía de la proteína supresora de tumores retinoblastoma; por lo que en células normales se expresa y en las cancerígenas se pierde, asociados a cambios genéticos en el locus; está pérdida se asocia a GIST de alto riesgo ⁸⁵.

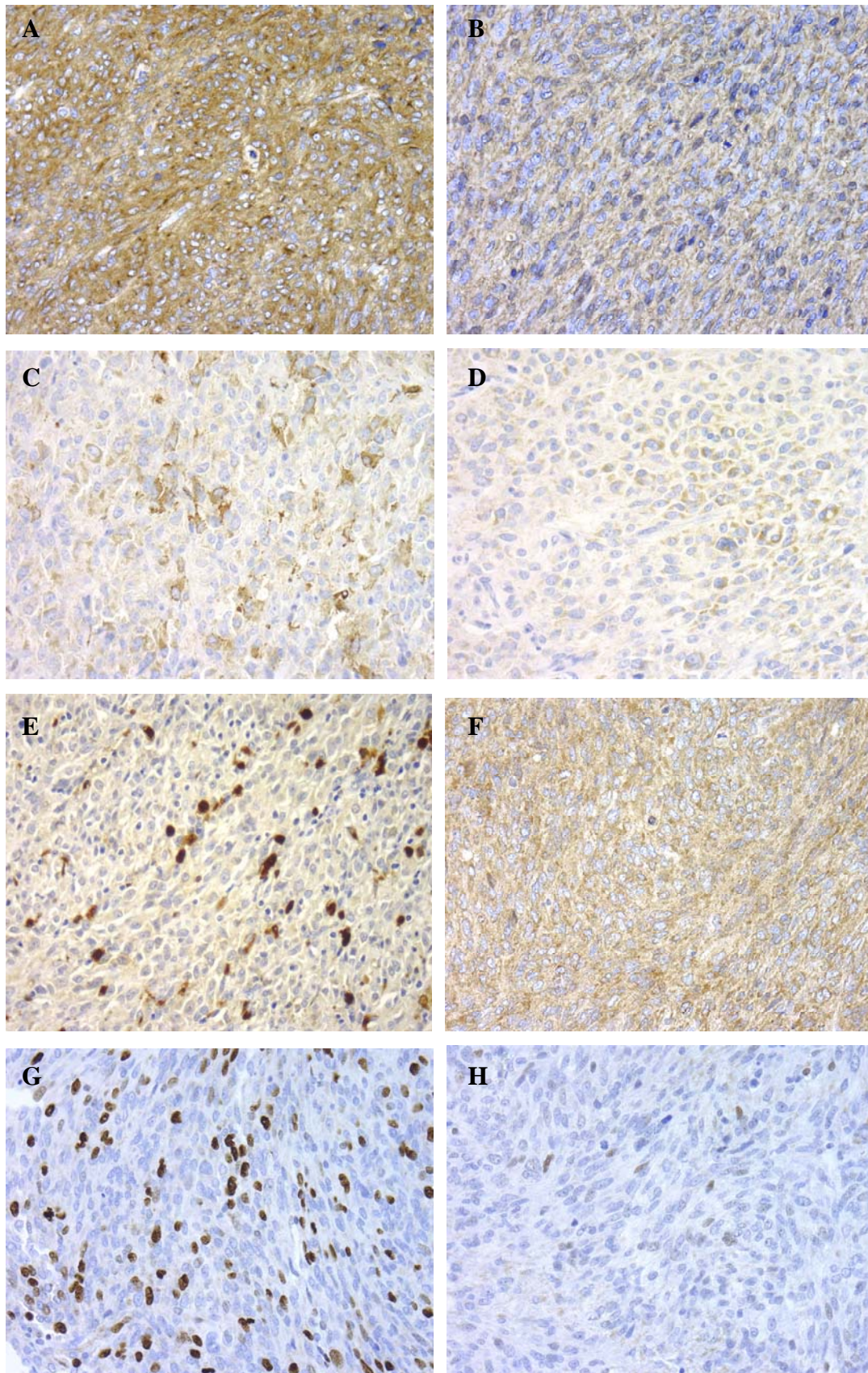


Figura 2. Ejemplos de marcadores utilizados en el diagnóstico de GIST. (A) c-KIT, (B) CD34, (C) AML, (D) desmina, (E) S-100, (F) PDGFR α , (G) Ki-67 y (H) P53.

TABLA 2: Porcentaje de expresión de los marcadores inmunohistoquímicos en GIST.

Anticuerpo	Frecuencia
C-KIT	90%
BCL-2	80%
CD34	70%
AML	35%
S-100	10%
DES	5%

B) Estatus de c-KIT y PDGFR α en otros tumores:

Los tumores de músculo liso (positividad para actina de músculo liso y desmina) y los schwannomas (positividad para S-100) son negativos para c-KIT.

Como ya hemos mencionado anteriormente otras neoplasias pueden expresar c-KIT como el dermatofibrosarcoma protuberans, hemangiopericitoma, el liposarcoma esclerosante bien diferenciado, el angiosarcoma y el sarcoma de Kaposi. En ocasiones son positivos focalmente también otros tumores para c-KIT como son melanomas y sarcomas de células claras (un tercio de los casos), carcinoma pulmonar de célula pequeña, sarcoma de Ewing, linfoma anaplásico de célula grande, seminoma, leucemia mieloide aguda, gliomas y carcinoma endometrial, pero morfológicamente no suelen plantear diagnóstico diferencial con GIST.

1.4.3-DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LOS GIST.

En el tracto gastrointestinal a parte de los GIST pueden darse otras neoplasias mesenquimales como los verdaderos leiomiomas, leiomiosarcomas, schwannomas, neurofibromas y tumores neuroendocrinos. Todas estas neoplasias surgen de la pared gástrica pudiendo dar el aspecto de GIST por lo

que es preciso abordar un adecuado diagnóstico diferencial. Los verdaderos leiomiomas y leiomiosarcomas son poco frecuentes en el estómago; igualmente ocurre con los schwannomas que se dan con menor frecuencia que los GIST en el estómago pero tienen rasgos radiológicos similares.

- *Leiomioma*: tumor benigno; de frecuente localización esofágica (el 75% de las neoplasias mesenquimales esofágicas) y pericolónica, siendo muy extraña la localización en el estómago o intestino delgado. Más frecuente en mujeres jóvenes. Es menos celular que el GIST. Expresa actina de músculo liso y desmina. En los del área pericolónica puede haber además expresión de receptores de estrógeno o progesterona.
- *Leiomiosarcoma*: suele ser extraño encontrarlos en el tracto gastrointestinal; al igual que los GIST ocurren en edades adultas. La localización más frecuente suele ser el colón, sin embargo son extremadamente extraños en el estómago. En contraste con los GISTs, los leiomiosarcomas suelen ser masas intraluminales polipoides. Están compuestos por células musculares con el núcleo en forma de puro y con citoplasma eosinofílico. En la localización retroperitoneal mantienen su carácter fusocelular. Además, inmunohistoquímicamente son positivos para actina y usualmente para desmina, siendo negativos para c-KIT.
- *Tumor glómico*: únicamente se localiza en el estómago, suele ocurrir en mujeres y suele ser benigno. Es positivo para actina del músculo liso, laminina y colágeno tipo IV, y es negativo para c-KIT.
- *Schwannoma*: Generalmente pequeño, amarillento, bien delimitado y localizado en submucosa, siendo más común en el estómago y colon. Su apariencia celular en empalizada se confirma con la positividad frente a S-100 así como ocasionalmente para GFAP.
- Los *carcinoides gástricos* solitarios suelen ser más comunes en el antro y característicamente presentan una ulceración central de la mucosa suprayacente.
- Los *adenocarcinomas y linfomas* ocasionalmente tienen una apariencia radiológica similar a la de los GIST (localización mural predominante y componente intramural). Los carcinomas gástricos y linfomas comúnmente

se asocian a la presencia adenopatías en perigastrio, ligamento hepatoduodenal que no suelen verse en GIST.

- *Fibromatosis mesentérica (tumor desmoide)*: ocurre esporádicamente o en asociación con el síndrome de Gardner, predominantemente en jóvenes o en edad media, con masas mayores de 10 a 20 cm. Microscópicamente muestran una interfase con la superficie externa de la pared intestinal y contiene característicamente fibras esquinoides. Suelen ser positivos para c-KIT pero no para CD34, pero puede ser focalmente positivo para actina y desmina.
- *Pólipo fibrinoide inflamatorio*: la localización más común es en el intestino delgado, especialmente en el íleon de pacientes adultos y en menor número en el estómago y colón. Estos pólipos constituyen un grupo heterogéneo morfológicamente y suelen ser positivos para CD34 y negativos para c-KIT.
- *Tumor miofibroblástico inflamatorio*: típicamente ocurre en niños o jóvenes, en el abdomen, y puede clínicamente simular a un GIST porque histológicamente las células son fusocelulares pero presenta característicamente un componente inflamatorio asociado. Es negativo para c-KIT y CD34 pero positivo para ALK.
- *Tumor fibroso solitario*: suele localizarse en el peritoneo o retroperitoneo. Está constituido por un estroma colágeno con células fusocelulares u ovaladas y zonas hialinizadas intercaladas muy parecidas a los GIST. Suele ser muy positivo para CD34 y negativo para AML, desmina y c-KIT, generalmente con control en los mastocitos.
- *Otros tumores mesenquimales*: sarcoma sinovial y angiosarcoma.

Una revisión exhaustiva del problema del diagnóstico diferencial ha sido llevada a cabo recientemente por Miettinen y cols así como por Rudolph y cols.^{86, 87}. Queda sin embargo pendiente de posicionar la presencia de expresión c-KIT en tumores distintos a los llamados GIST. Es creciente el número de publicaciones en las que se comunica la existencia de estos tipos tumorales c-KIT positivos como es el caso de la Fibromatosis desmoide⁸⁸, algunos angiosarcomas⁸⁹ o en tumores pediátricos malignos tipo sarcoma de Ewing, sarcoma sinovial, osteosarcomas, etc.^{90, 91}.

En este sentido hay todavía un amplio campo por analizar y se abre como opción una nueva perspectiva terapéutica que puede modificar sensiblemente el tratamiento de los tumores de estirpe mesenquimal maligna.

1.5- FACTORES PRONÓSTICOS

Hay muchos factores anatómicos, microscópicos y biológicos-moleculares que se han utilizado para diagnosticar y clasificar los GIST. A nivel clínico-patológico los dos parámetros estructurales de mayor valor de consenso son el **tamaño** tumoral y número de **mitosis** contadas en secciones histológicas (utilizando un objetivo de 40x y un ocular de 10x) ^{43, 52, 92, 93}. El número de mitosis sirve para establecer un criterio pronóstico importante, considerando dos grandes grupos: <5 mitosis por 50 campos 40x (HPF) y > 5 mitosis por 50 campos 40x (HPF) (Fig.3). Aun así persiste el problema de clasificar a los GIST en benignos o malignos o de potencial maligno indeterminado; ya que un GIST considerado benigno, de pequeño tamaño (<2cm de diámetro) y con escasas mitosis (menos de 5 mitosis), es igualmente capaz de recidivar localmente o metastatizar.

Por lo general, el tamaño tumoral, el **grado histológico** y el índice mitótico serían indicadores importantes de mal pronóstico (Tabla 3) pero únicamente la **recidiva** local y las **metástasis** a distancia son criterios definitivos de malignidad de GIST ⁹⁴. Los GIST deben ser vistos como tumores con un potencial metastásico, porque la evidencia es que alrededor de un 38% del total metastatizan; un 20% de los tumores con un diámetro menor de 5 cm. metastatizan y un 50% de los tumores recidivan dentro de los 5 años de seguimiento. Además, la supervivencia a cinco años es del 60% de pacientes, en los cuales se ha podido llevar a cabo una resección quirúrgica completa del tumor. A todo esto se suma la variabilidad por la localización anatómica, los tumores gástricos tienen mejor pronóstico que los del intestino delgado a igual tamaño e índice mitótico ⁹⁵. Aún así, es la resistencia a cualquier tratamiento

hasta ahora disponible si se excluye el imatinib, lo que condiciona en mayor medida un pronóstico infausto para estos enfermos.

Miettinen y cols. en 2004 ⁴³, postularon que el índice mitótico tiene más influencia si se relaciona con el tamaño tumoral (Tabla 5). En conjunto, se puede señalar que los tumores de menos de 2cm de tamaño y con un índice divisional menor de 5 mitosis por 50 HPF a 40x tienen un pronóstico evolutivo muy favorable en las localizaciones gástricas y rectales. Ello no es óbice para que se conozcan recidivas o metástasis.

Los GIST con >5 mitosis / 50 HPF se consideran malignos; se ha observado también, que todos los pacientes con un índice mitótico superior al 20 mitosis/ 50 HPF recurren; presentando el más alto riesgo de diseminación difusa intrabdominal y metástasis hepática, las dos principales vías de diseminación de los GIST ⁹⁶. Otros factores pronóstico clínico-patológicos adversos son las **aneuploidías**, el tamaño mayor de 5 cm, la presencia de **necrosis** de coagulación y un alto porcentaje de positividad para el **Ki-67** que se relaciona con la actividad divisional) (Fig.3).

Los GIST según su localización pueden tener un pronóstico más favorable o menor:

Los tumores gástricos tienen un ratio menor de metastatizar (<5%) cuando son menores de 10 cm, con menos de 5 mitosis, ausencia de infiltración de órganos adyacentes y diploidía del ADN por citometría de flujo. Sin embargo, aquellos GIST gástricos mayores de 10 cm. con pocas mitosis y menores de 2-5 cm. pero con más de 5 mitosis tienen un ratio de metástasis entre el 10-15%. En el estómago el GIST epitelioides cuando su índice divisional no supere las 5 mitosis por 50 campos, puede considerarse como benigno (de menor riesgo), este criterio sin embargo no es válido para los tumores de localización intestinal⁹⁷.

Los GIST de localización intestinal poseen una mortalidad elevada entre el 35-50%. Los tumores de localización duodenal histológicamente fusocelulares suelen presentar en un 20% de los casos proliferaciones vasculares y empalizada nuclear además de ser todos ellos c-KIT positivos, con un pronóstico excelente en aquellos GIST menores de 2 cm. y <5 mitosis

por 50 HPFs. Opuestamente, metastatizan casi siempre aquellos pacientes con tumores de 2-5 cm. con mayor índice mitótico. Por último aquellos tumores con más de 5 mitosis o mayores de 5cm tienen un alto índice de mortalidad ⁹⁸.

Los GIST esofágicos tienen mal pronóstico en general, son en un 75% de células fusocelulares y un 25% epitelioides, y en la mayoría de los casos descritos son mayores de 5 cm. y con más de 5 mitosis por 50 HPFs con una supervivencia a largo plazo escasa.

En la localización colorectal no se han podido confirmar los factores pronósticos pero se cree que un índice mitótico elevado y la infiltración de la mucosa suponen peor pronóstico. No obstante, en la localización rectal sólo los tumores menores de 2 cm. con un índice mitótico menor de 5 por 50 HPFs están libres de metástasis; mientras que aquellos GIST menores de 2 cm. pero con un índice mitótico superior a 5 mitosis tienen >50% de probabilidades de metastatizar ²⁷.

Hay parámetros comunes a cualquier localización que se pueden asociar a una malignidad elevada como son:

La presencia de necrosis coagulativa que es un criterio pronóstico de mayor malignidad y entraña un riesgo de metástasis más elevado ⁵².

La **ulceración** de la mucosa ⁵⁵.

Otros criterios pronósticos de mayor agresividad son la mayor celularidad y **polimorfismo** tumoral (aspecto sarcomatoide) que suele estar asociado a un mayor número de mitosis (Fig.3).

Una inmunoreacción al Ki-67 mayor al 10% es también un factor de peor pronóstico ⁹⁹ (Fig.3).

Por el contrario, la presencia de fibras de tipo esquenoide (Fig.3), que suelen verse en los tumores intestinales, indican un comportamiento más favorable menor riesgo ^{47, 62} (Tabla 4). La infiltración de la capa muscular lisa de la pared del tubo digestivo no puede considerarse como un factor pronóstico válido por cuanto que estos tumores suelen originarse en ella; salvo los tumores de menos de 1cm de diámetro que inician su crecimiento de modo expansivo, el resto presenta infiltración de la capa muscular lisa.

Se ha observado que la recidiva local se asocia a una extirpación incompleta del tumor y ésta puede venir acompañada de diseminación peritoneal o metástasis hepáticas (las metástasis óseas, pulmonares y a tejidos blandos son raras); por lo que es muy importante que se realice una cirugía completa, con bordes amplios y libres ⁹⁵. Cuando la neoplasia es considerada, atendida su aparente buena delimitación por parte del cirujano, como un “fibroma” benigno gástrico o intestinal, pueden no aplicarse estrictamente los criterios quirúrgicos oncológicos, dejando restos de cápsula tumoral sin reseca. El patólogo deberá, pintando los márgenes de resección, asegurarse de que éstos se encuentran libres de infiltración neoplásica. La mayor dificultad diagnóstica se da en biopsias endoscópicas en las que las muestras, por su pequeño tamaño y posible presencia de ulceración superficial, pueden presentar problemas de diagnóstico diferencial (tejido de granulación exuberante; infiltración linfocitaria- plasmocitaria intensa), enmascarando la verdadera naturaleza de la lesión.

También ha sido motivo de controversia la medida del tamaño macroscópicamente, atendiendo que aunque la resección sea completa, la masa neoplásica no necesariamente es homogénea y bien delimitada, sino que en ocasiones se oblonga, es irregular, se encuentra ulcerada o con bordes imprecisos y es también frecuente la existencia de necrosis o hemorragias intratumorales que disminuyen o aumentan artificialmente el volumen tumoral.

Por último, por lo que respecta al tratamiento, comentar brevemente que la actividad de la radioterapia es muy escasa pero se han descrito mejorías subjetivas en casos de GIST esofágicos o en casos rectales con bordes afectados. Por otra parte, la actividad de la quimioterapia en GIST ha sido muy baja, con remisiones globales por debajo del 10% de los casos; siendo muy probable que esta resistencia esté relacionada con la sobreexpresión que estos tumores muestran a proteínas ligadas a la resistencia a fármacos como el MDR P-gp, MRP-1 y LRP, así como el Bcl-2 ¹⁰⁰.

Tabla 3: Riesgo de los tumores GIST basándose en la medida y el número de mitosis. Guía consenso para el pronóstico de GIST NIH/NCI, Abril 2001 Fletcher y cols. Human Pathol 33:459-465, 2002 ⁹⁶.

Índice mitótico	Tamaño	Riesgo histológico
≤ 5 MITOSIS	≤2 cm.	Muy bajo riesgo
≤ 5 MITOSIS	>2 ≤5 cm.	Bajo riesgo
6-10 por 50 HPF	≤5 cm.	Moderado
<5 por 50HPF	>5 ≤10 cm.	
>5 por 50HPF	>5cm	Alto riesgo
cualquier cantidad mitosis > 10 por 50HPF	>10cm cualquier medida	

CGA: Campo a gran aumento: 40X.

- El tamaño representa la dimensión tumoral mayor cuya medida puede efectuarse tras la fijación aunque disminuye algo de volumen.
- De manera general, el recuento mitótico se realiza en campos a gran aumento (objetivo 40X, ocular 10X) y en realidad debería estandarizarse en función del área microscópica medida. Sin embargo, no se ha llegado, por parte de la comisión de consenso, a una decisión definitiva.

Tabla 4: Criterios mayores y menores para la clasificación de malignidad de los GIST dependiendo de características histopatológicas (adaptado de Bucher.)¹⁰¹.

CRITERIOS MENORES
Tumores mayores de 5cm Índice mitótico mayor de 5 mitosis por 50HPF Presencia de necrosis Infiltración de estructuras adyacentes Índice Ki-67 mayor o igual a 10%
CRITERIOS MAYORES
Presencia de invasión de ganglios linfáticos Presencia de metástasis de GIST
GIST con un potencial bajo de malignidad: GIST con menos de cuatro criterios menores
GIST con un potencial elevadamente maligno: GIST con 4 o 5 criterios menores o un criterio mayor

Tabla 5: Clasificación de riesgo según los criterios de Miettinen ¹⁰², teniendo en cuenta el índice mitótico, el tamaño y la localización del tumor.

Índice mitótico	Tamaño	Estómago	Intestino delgado	Intestino Grueso	Resto de localizaciones
≤ 5 Mitosis	≤2 cm.	Muy bajo riesgo	Muy bajo riesgo	Muy bajo riesgo	Muy bajo riesgo
	>2 ≤5 cm.	Muy bajo riesgo	Bajo riesgo	Bajo riesgo	Bajo riesgo
	>5 ≤10 cm.	Bajo riesgo	Moderado	Moderado	Moderado
	>10 cm.	Moderado	Alto riesgo	Alto riesgo	Alto riesgo
>5 Mitosis	≤2 cm.	Bajo riesgo	Alto riesgo	Alto riesgo	Alto riesgo
	>2 ≤5 cm.	Moderado	Alto riesgo	Alto riesgo	Alto riesgo
	>5 ≤10 cm.	Alto riesgo	Alto riesgo	Alto riesgo	Alto riesgo
	>10 cm.	Alto riesgo	Alto riesgo	Alto riesgo	Alto riesgo

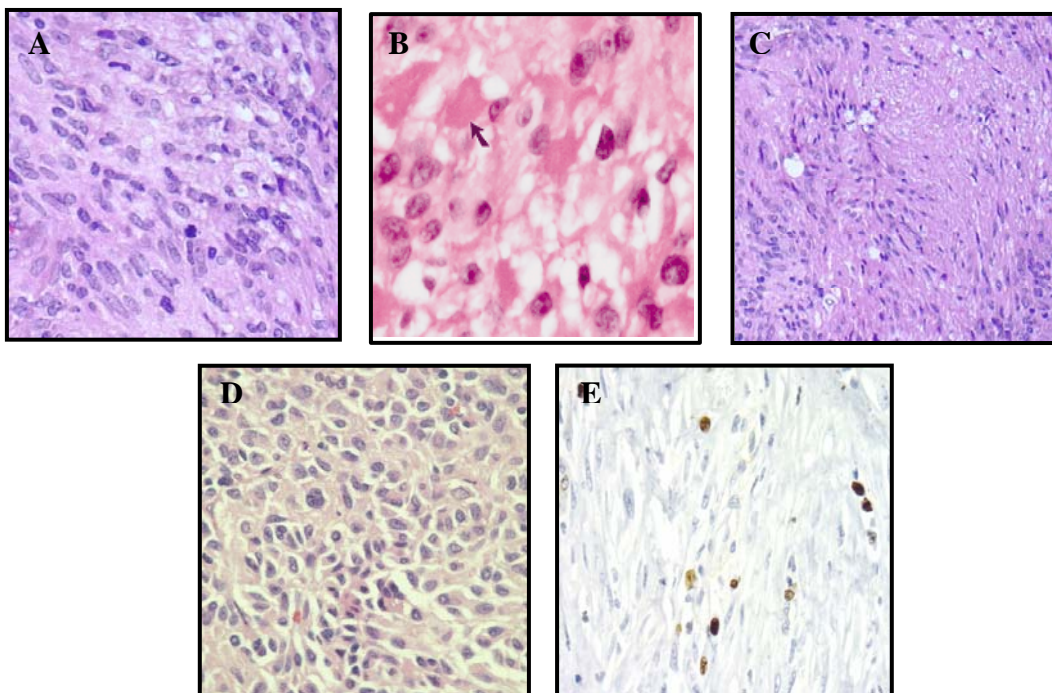


Figura 3: Imágenes de diferentes factores pronóstico. (A) Mitosis, (B) fibras esquenoides, (C) necrosis, (D) pleomorfismo y (E) Ki-67.

1.6-SINDROMES ASOCIADOS Y FAMILIARES DE GIST

Menos del 5% de GIST están asociados con síndromes, los cuales son:

En la **Neurofibromatosis múltiple tipo I** (NFI) se observa una predilección por los GIST en el intestino delgado; estos tumores se caracterizan por ser inactivos mitóticamente y por asociar hiperplasia de células intersticiales de Cajal ¹⁰³, con un genotipo "wild-type" produciéndose en niños con una ligera predilección por el sexo femenino. El curso suele ser indolente en muchos casos, sin embargo, entre un 10-15% de los pacientes presentan tumores con actividad mitótica y GIST clínicamente malignos, siendo de mayor potencial maligno los de localización duodenal ¹⁰⁴. Se han descrito casos de manera excepcional con mutación en *c-KIT* asociados a la NFI ¹⁰⁵.

El **síndrome de Carney** que ocurre predominantemente en mujeres jóvenes, está asociado con GIST gástrico, paragangliomas y condromas pulmonares múltiples ¹⁰⁶. Recientemente se ha llevado a cabo una revisión de 79 pacientes portadores de este síndrome en la que destaca una clara predominancia femenina (85%) y los tumores gástricos suelen ser pequeños y de crecimiento lento, con morfología epitelioide. Sin embargo un 41% de ellos sufrieron recurrencias y un 13% falleció como consecuencia de enfermedad metastásica.

Los GIST en niños son bastante infrecuentes (<1%) y suelen tener predilección por el estómago y el sexo femenino (90%). La mayoría (75%) tienen una morfología epitelioide y se suelen asociar con el Síndrome de Carney en combinación con condroma pulmonar, paraganglioma o ambos. Muchos investigadores no han hallado mutaciones ni en *c-KIT* ni en *PDGFR α* , sugestionando que la patogénesis de los GIST pediátricos difieren de los de GIST en adultos ^{107, 108}.

También se han recogido al menos doce familias portadoras de GIST múltiples a modo de **síndrome familiar hereditario**¹⁸. Estos enfermos no presentan síndrome de Carney o NFI, mostrando característicamente hiperpigmentación de la piel, particularmente en los labios, en el cuello, manos y axilas. En raros

casos, se han reportado anomalías de los mastocitos, como la urticaria pigmentosa o la enfermedad sistémica de los mastocitos sistémica. En todos ellos hay una clara hiperplasia de células de Cajal a lo largo del tracto intestinal a partir de la que se desarrollan GIST múltiples. El estudio de la clonalidad de las lesiones hiperplásicas, demuestra su naturaleza policlonal, mientras que el GIST desarrollado a partir de uno de estos focos hiperplásicos resulta monoclonal. Esto apoyaría la hipótesis de que los GIST derivan de las células intersticiales de Cajal³³. Los GIST familiares se caracterizan por mutaciones germinales en *c-KIT* o *PDGFRα* por transmisión constitucional dominante autosómica heterocigota^{109,110}. Se han descrito 11 familias con activación en *c-KIT* y una familia con mutación en *PDGFRα*; la mutación más frecuente es Val559Ala.

1.7-TRATAMIENTO

1.7.1- CIRUGÍA

El tratamiento de elección es la extirpación completa del tumor siempre que se pueda; siempre que se trate de una extirpación en bloque con márgenes microscópicos negativos, y las resecciones muy extensas no han mostrado ventajas sobre las resecciones en cuña. En ocasiones, puede ser necesario sacrificar órganos adyacentes para lograr la exéresis completa del tumor, pero no sería preciso extirpar estructuras vitales para conseguir unos márgenes adecuados cuando no se deja tumor macroscópico. La rotura del tumor (R1), antes o durante la intervención entraña mal pronóstico, por lo que es necesario diseccionar cuidadosamente el tumor; si esto ocurre, es recomendable el lavado de la cavidad peritoneal para eliminar la posible presencia de células tumorales. Del mismo modo, la biopsia percutánea comporta un riesgo de rotura del tumor o de sangrado, y debería evitarse. Debe intentarse la resección de las metástasis, o en el acto quirúrgico inicial, o bien después de un tratamiento con imatinib (Glivec).

1.7.2- QUIMIOTERAPIA Y RADIOTERAPIA

La radioterapia o la quimioterapia convencional después de la cirugía no tienen una eficacia probada. Se ha observado que la supervivencia a los 5 años en distintas series quirúrgicas, que incluyen tanto pacientes con enfermedad localizada como metastásica, oscila entre el 35 y el 65%, y la recaída ocurre en el 60% de los casos en los 2 primeros años de seguimiento. El rescate quirúrgico de las recaídas o de las metástasis es poco satisfactorio, y estaría indicado como tratamiento paliativo para alivio sintomático. Puede lograrse en un 33% de los casos, pero la supervivencia media ulterior es de unos 15 meses, por la presencia de enfermedad oculta diseminada que da lugar a nuevas recidivas cercanas.

Quimioterapia: Los GIST son tumores altamente quimiorresistentes. Los esquemas quimioterapéuticos utilizados en otros sarcomas de partes blandas, basados en antraciclinas e ifosfamida, consiguen respuestas objetivas en el 0-5% de los casos con medianas de tiempo para la progresión de enfermedad de 1,5-2 meses. En estas series la mediana de supervivencia descrita fue inferior a los dos años. Las causas específicas de resistencia a la quimioterapia son desconocidas; si bien se ha especulado que pudiera relacionarse con altos niveles de expresión de proteínas de multiresistencia, así como mecanismos de señalización antiapoptótica relacionados con la sobreexpresión de Bcl-2¹⁰⁰.

Radioterapia: aunque se considera un tratamiento de cierta eficacia en el manejo de la mayoría de los sarcomas de alto grado, incluso de forma adyuvante, su utilidad en los GIST es muy baja, siendo estas neoplasias prácticamente resistentes a la misma. Además, su localización abdominal y su amplia extensión limitan su indicación por la toxicidad secundaria. El empleo de la radioterapia intraoperatoria o de técnicas más novedosas como la radioterapia de intensidad modulada no han conseguido en la práctica mejorar los resultados de la radioterapia convencional¹⁷.

1.7.3- TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO

A) IMATINIB MESILATO (Glivec)

Las estrategias desarrolladas para bloquear la actividad quinasa de c-KIT han sido múltiples e incluyen la utilización de oligonucleótidos antisentido, la transfección de dominantes negativos y el uso de anticuerpos capaces de neutralizar el dominio de unión de SCF. Las dos primeras estrategias están limitadas por la eficiencia propia de la técnica y la incapacidad de inhibir totalmente la expresión o actividad de c-KIT, mientras que el uso de anticuerpos neutralizantes está condicionado por la afinidad de unión del anticuerpo. Ninguna de ellas es capaz de bloquear completamente la activación del sistema, por lo que su utilización ha quedado relegada a un segundo plano tras el descubrimiento de inhibiciones más específicas.

Todos los receptores con actividad quinasa utilizan el ATP como donador de grupos fosfato y sus dominios quinasa, particularmente los sitios de unión a ATP están muy conservados. Debido a este hecho se pensó durante mucho tiempo que los inhibidores de la actividad quinasa carecerían de suficiente especificidad como para ser clínicamente útiles.

Sin embargo en 1988 Yaish y cols.¹¹¹ publicaron una serie de compuestos derivados de la 2-fenilaminopirimidina, denominados tirfostinas, que inhibían la actividad quinasa de manera específica. A partir de esos compuestos, y gracias al estudio de la relación entre estructura y actividad, se desarrollaron fármacos capaces de inhibir la actividad quinasa de manera específica.

Dos de estas tirfostinas, AG1296 y AG1295 fueron utilizadas previamente como inhibidores de la actividad tirosina quinasa de c-KIT. No obstante, el uso de estos compuestos como inhibidores no pudo sistematizarse debido a la baja solubilidad y especificidad de los mismos.

Los receptores tirosina quinasa tipo III son candidatos de ser dianas terapéuticas para el *imatinib mesilato* (STI - 571, *Inhibidor de la transducción de señales número 571; Glivec; Novartis Pharma, Basel, Suiza*); éste es un derivado de 2-fenilpirimidina que compite con los trifosfatos adenosina en su unión a los dominios de activación de los receptores tirosina quinasa,

inhibiendo por tanto la fosforilación del sustrato y bloqueando la vía de señalización puesta en marcha por el receptor. Algunos estudios cristalográficos llevados a cabo recientemente han demostrado el mecanismo de autoinhibición estabilizado por el dominio yuxtamembrana del receptor.

Esta droga fue conocida rápidamente en el mundo por la gran efectividad que demostró en las leucemias mieloides crónicas (LMC); el producto de fusión de los genes *BCR-ABL* provoca la proliferación del tumor; ésta forma mutada es inhibida por el imatinib, respondiendo al tratamiento más de un 85% de pacientes con una completa respuesta hematológica y citogenética ²¹.

Este fármaco se une al dominio intracelular de las quinasa responsables de interaccionar con el adenosintrifosfato, interrumpiendo la cascada de señales.

El Imatinib mesilato también es eficaz para otros receptores tirosina quinasa III como *PDGFR α* , *PDGFR β* y *c-KIT*, siendo utilizada también para tumores como dermatofibrosarcoma protuberans, melanomas, fibromatosis, desmoides, sarcomas sinoviales, sarcomas de Ewing y GIST (Fig.4 y 5).

Los primeros ensayos pre-clínicos demostraron que el fármaco es capaz de inhibir de manera específica BCR-ABL, PDGFR y c-KIT. Tanto la inhibición de la fosforilación como la de la proliferación se daban a concentraciones del fármaco alcanzables in vivo en humanos (0.1-10 μ M) y en ambos casos las inhibiciones eran dosis dependientes. Se observó además que la toxicidad de Imatinib se limitaba a las células tumorales ya que eran éstas y no otras las que dependían del receptor para su supervivencia. Estos estudios demostraron también que el fármaco era efectivo in vivo ya que la administración oral de Glivec consiguió anular el crecimiento tumoral dependiente de BCR-ABL en ratones 'knock-out'.

A nivel molecular se conoce su interacción con vías de señalización intracelular implicadas en proliferación o supervivencia celular como las de MAP Quinasa, AKT, BCL-X, XIAP y Ciap.

A partir de 1999 se produjeron dos observaciones que indujeron a pensar que el Glivec podría ser útil en el tratamiento de los GIST. La primera observación

fue que el imatinib podía bloquear in vitro la actividad quinasa tanto de c-KIT nativo como una isoforma mutada que frecuentemente se encuentra en GIST (mutación puntual en el exón 11) ¹¹². La segunda observación fue la constatación de que el Glivec inhibía el crecimiento de una línea celular que contenía una mutación en *c-KIT* ¹¹³. Pero el Glivec no parece capaz de erradicar por completo los GIST, de manera que no es una alternativa a la cirugía en pacientes capaces de afrontarla. Si bien cualquier paciente con GIST inoperable o metastásico debe ensayar el tratamiento con Glivec, no importa cuán avanzado sea el estado de la enfermedad o cómo de grave esté el enfermo. En el 50 y el 60% de los casos tratados con Glivec, el tumor no crece y comienza a disminuir de tamaño. En otro 25-30% de los casos el tumor no crece y se estabiliza. La disminución de tamaño suele ser paulatina pero constante; en muchos casos el volumen del tumor y de las metástasis sigue disminuyendo poco a poco. La duración óptima del tratamiento es desconocida pero sí se sabe que si se deja el Glivec el tumor suele volver a crecer algún tiempo después.

En marzo del año 2000 se trató de forma pasiva a una paciente con GIST metastásico con Glivec. En el transcurso de dos semanas, las metástasis de esta paciente en hígado redujeron su tamaño un 75%, y 8 de las 28 lesiones hepáticas ya no fueron detectadas durante el seguimiento radiológico a los 8 meses de empezar el tratamiento. Una biopsia postratamiento mostró un acusado descenso de la celularidad del tumor así como una extensa degeneración mixoide. El imatinib fue bien tolerado en esta paciente y los síntomas asociados a la neoplasia desaparecieron. En Febrero del 2002, Glivec fue aprobado por la Administración de Drogas y comida para el tratamiento de GIST ¹¹⁴.

El éxito de este primer tratamiento dio pie al desarrollo de un ensayo clínico multicéntrico para el tratamiento de pacientes con GIST con el imatinib mesilato (CSTIB2222) ¹¹⁵. En este ensayo clínico que incluyó 27 pacientes tratados con imatinib 400 mg / 12 horas; sólo el 3 (11%) progresaron de entrada al tratamiento, y el 73% no había progresado al cabo de un año. En otro estudio se incluyeron 147 pacientes con GIST avanzado, inoperable y c-KIT positivos y

en él se establecieron dos brazos de tratamiento de 400 mg y 600 mg; con un seguimiento inicial de 6 meses se observaron respuestas parciales en un 54% de los casos y en un 28% adicional de casos se observó una estabilización de la enfermedad. Únicamente se observó progresión de la enfermedad en un 14% de los pacientes. También se recogieron resultados similares en los ensayos en fase I llevados a cabo por el grupo de Sarcomas y Partes Blandas de la EORTC en un grupo de sarcomas que incluían 36 GIST, en los que se observó un 53% de respuestas parciales a los 9 meses del inicio del tratamiento, no observándose ninguna respuesta en los otros sarcomas incluidos, a pesar de que también expresaban c-KIT.

En Febrero de 2002, Glivec fue aprobado por la FDA y en Mayo de 2002 por la EMEA, para tratamiento de GIST avanzado irresecable, en base a los resultados de los primeros estudios de fase II (CSTIBB2222) en los que se objetivan en torno a un 60% de respuestas, y un 20% adicional de estabilizaciones duraderas. Las tasas de supervivencia libre de progresión y supervivencia global a un año fueron del 70% y 88%, respectivamente. La dosis recomendada fue de 400 mg/día vía oral ininterrumpida, y se asoció a un favorable perfil de toxicidad.

Dos estudios de fase III posteriores, que incluyeron más de 1600 pacientes, confirmaron las tasas de remisión y de supervivencia mencionadas. En ambos estudios, se compararon dosis de Imatinib de 400 mg/día frente al doble. En los dos estudios la dosis inferior dio lugar a tasas comparables de supervivencia y fue mejor tolerada. Sin embargo, en el estudio de la EORTC la dosis de 800 mg/día se asoció a una mayor supervivencia libre de progresión, objetivo primario de este ensayo. Los investigadores de este grupo recomiendan, por tanto, el empleo de la pauta de Imatinib de 800 mg/día vía oral, particularmente en aquellos casos de peor pronóstico.

El fármaco es bien tolerado y sólo el 25% de los pacientes tratados presenta algún efecto adverso importante, cuya intensidad no parece relacionada con la dosis. Los efectos secundarios más frecuentes son anemia (92%), edema (84%), erupción cutánea (69%), cansancio (76%), náuseas (57%), neutropenia

(47%) o diarrea (47%). Algunos pacientes pueden presentar una hemorragia relacionada con la necrosis tumoral provocada por el fármaco y deben ser intervenidos para resolver el problema. La larga supervivencia esperable con el tratamiento justifica una actitud agresiva ante ésta u otra complicación que pueda surgir.

En la actualidad, se están llevando a cabo otros ensayos clínicos en el uso del Glivec en el tratamiento adyuvante y neoadyuvante de GIST ¹¹⁶.

Los resultados obtenidos hasta la fecha son muy buenos y ponen de manifiesto cómo el conocimiento de la biología tumoral da lugar a metodologías terapéuticas muy satisfactorias (Fig. 6 y 7) ¹¹⁷.

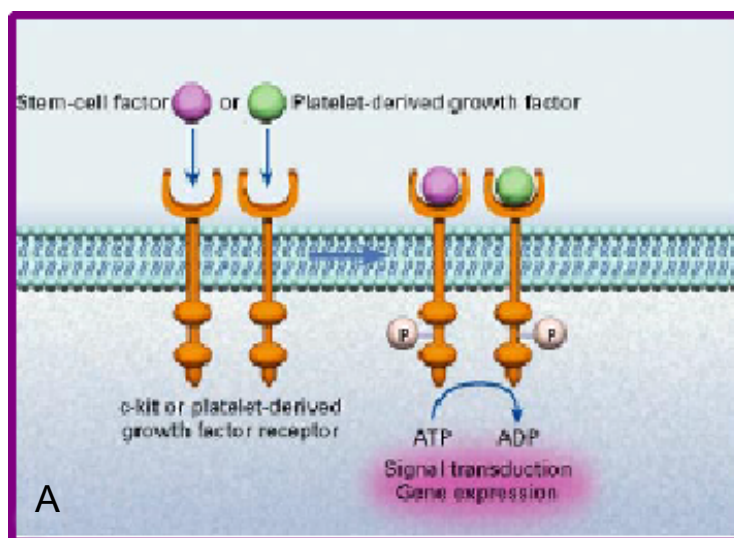


Figura 4. Imagen del funcionamiento de los receptores de *c-KIT* y *PDGFRα* en presencia de su ligando, en condiciones normales.

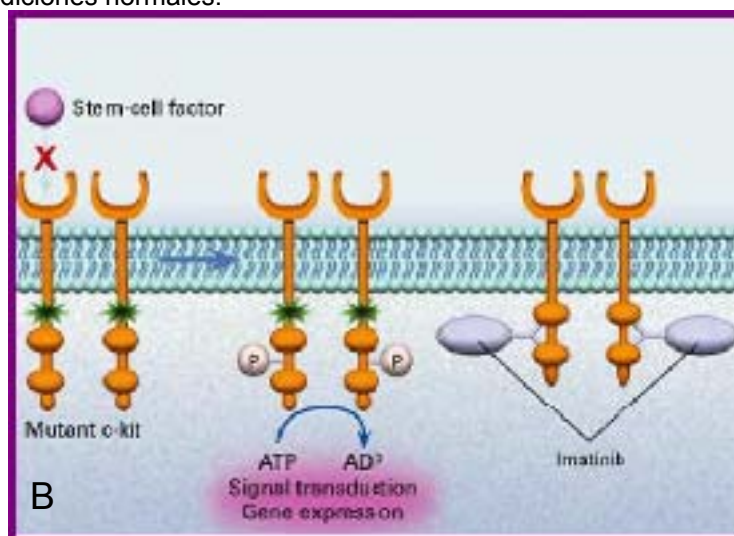
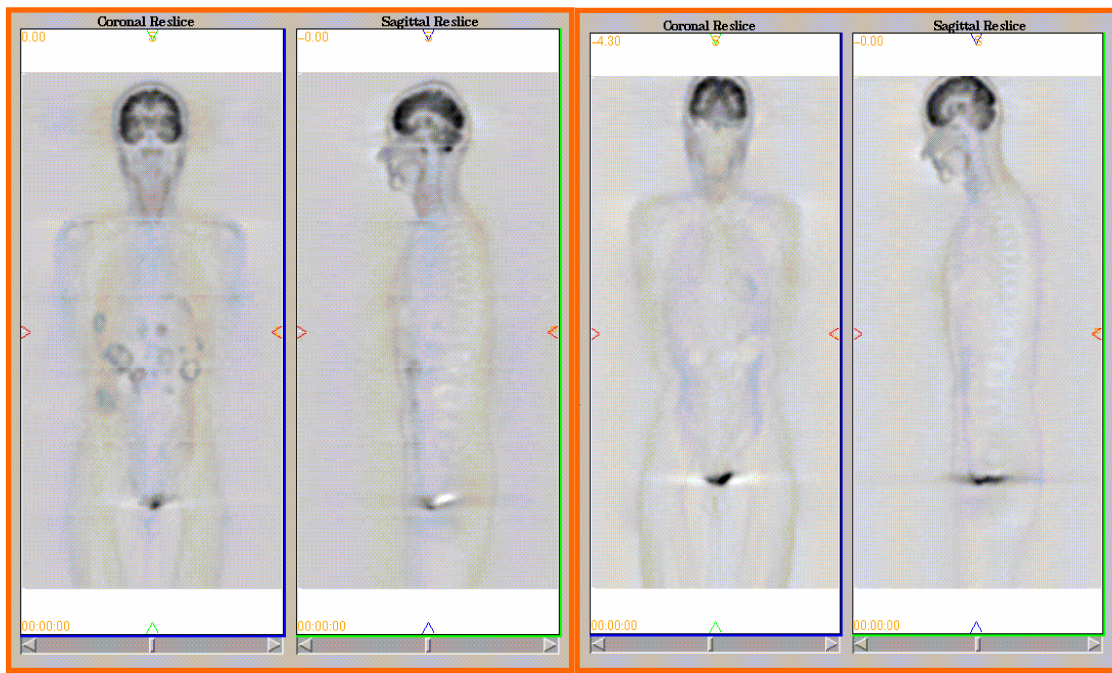


Figura 5. Modo de acción del Glivec cuando el receptor se encuentra mutado y como inhibe la cascada de señales después de unirse a los bolsillos de ATP. Imagen de Savage NEJM.



Múltiples masas metastásicas
en hígado y abdomen

Después de cuatro semanas con
tratamiento con Glivec.

Figura 6. PET de la primera paciente de GIST tratada con Glivec y su rápida respuesta al medicamento. Joensuu y cols., 2001, The New England Journal of Medicine ²¹.

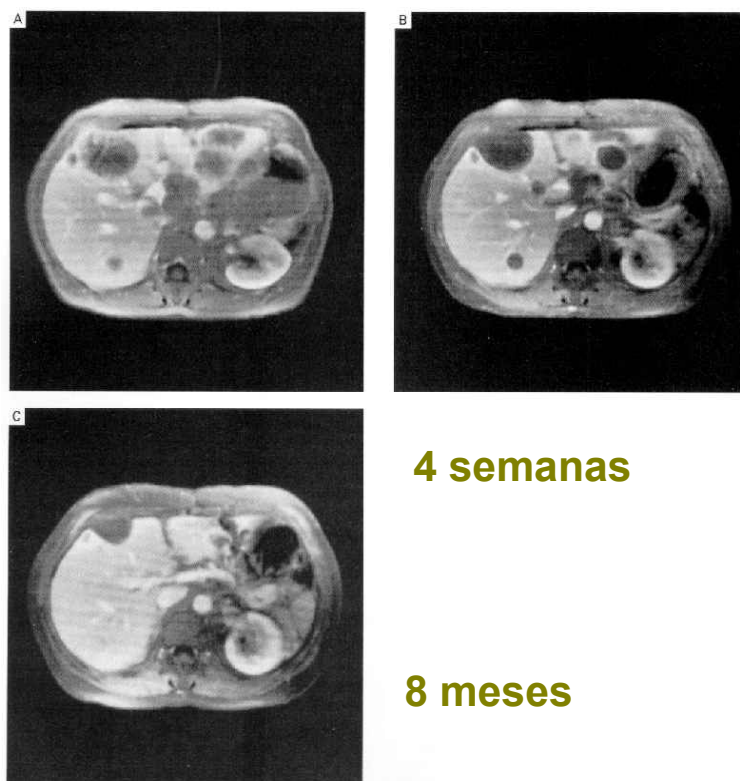


Figura 7: TAC con la evolución de la primera paciente GIST tratada con Glivec.

B) SU0 I 1248 (SUTENT ó SUNITINIB)

El SU0 I 1248 es una molécula pequeña de 930 KDa de peso molecular con buena disponibilidad oral. Presenta metabolismo hepático; tiene una cinética lineal y una vida media prolongada de 40 horas¹¹⁸. En estudios preclínicos se ha demostrado que es un potente inhibidor de las tirosina quinasas del receptor VEGF, el PDGF, FLT3 y c-KIT. Además de la actividad antitumoral directa por su actividad inhibidora de estas tirosina quinasa, el sunitinib actúa como agente antiangiogénico, reduciendo la densidad microvascular en neoplasias de diversos orígenes. En estudios preclínicos y en ensayos de fase I ha demostrado actividad en diversos tumores sólidos, incluidos los GIST, el carcinoma de células renales, el cáncer de mama metastásico y tumores endocrinos.

En los ensayos de fase I la dosis explorada ha oscilado entre los 25 y los 100 mg/día. La DMT (dosis máxima tolerada) propuesta es de 50 mg/día y la DLT (toxicidad limitante de dosis).

Hasta la fecha, el SU0 I 1248 ha sido estudiado en 11 ensayos clínicos de fase I-II; 3 en voluntarios sanos, 4 en pacientes con leucemia mieloide aguda y 1 en pacientes con GIST. En este último se incluyeron 97 pacientes con GIST irreseccable resistentes o intolerantes a imatinib. La mayoría de los pacientes, todos en la fase II, recibieron el tratamiento según la pauta 4/2 (4 semanas de tratamiento, dos de descanso). Se objetivó una tasa de respuesta global del 54% (15% respuesta parcial, 39% estabilización) según criterios RECIST y del 67% por PET. El 32% de los pacientes con respuesta inicial la mantienen a largo plazo (>6meses). Un subestudio de éste analizó el perfil de mutación en *c-KIT* y *PDGFR α* presente en estos pacientes y su correlación con la respuesta a sunitinib. El compuesto mostró mayor actividad en los GIST sin mutación de *c-KIT* o con mutaciones en el exón 9, con tasas de control de la enfermedad del 79% y 50% respectivamente, en comparación con tasas del 33% en aquellos tumores que presentan mutación en el exón 11. La mutación en el oncogén *PDGFR α* se relaciona asimismo con una elevada tasa de respuesta, del 100% en esta serie. Por tanto, de modo preliminar el patrón mutacional predictivo de eficacia con SU0 I 1248 parece ser la imagen especular de aquel que se aplica a Glivec.

En base a estos prometedores resultados un estudio aleatorizado doble ciego de fase III posterior comparó SU0 I 1248 frente a placebo en 300 pacientes con GIST resistentes o intolerantes a Glivec. Sus resultados, que han sido comunicados recientemente, mostraron un incremento significativo en la tasa de respuestas, en el tiempo hasta la progresión (7,8 meses de mediana) y en la supervivencia global (20 meses) para los pacientes tratados con SU0 I 1248.

El efecto adverso más común es la astenia, que afecta al 30% de los pacientes (severa en <5%). Tiende a aparecer a los 10-15 días de iniciado el ciclo, es acumulativa, y habitualmente revierte al suspender el tratamiento. Otros eventos adversos comunes son las alteraciones gastrointestinales, dermatológicas, y hematológicas. Con dosis máximas de 50 mg/día no se han detectado problemas cardiovasculares severos salvo hipertensión arterial.

1.8-BIOLOGÍA MOLECULAR

Un hecho histórico en el tratamiento y evolución de GIST fue el descubrimiento primero de *c-KIT* y posteriormente del *PDGFR α* . Ambos pertenecen a la misma familia de receptores de membrana: las TIROSINA QUINASA TIPO III.

1.8.1-RECEPTORES TIROSINA QUINASA TIPO III

Los receptores tirosina quinasa se pueden clasificar en más de 16 subfamilias estructurales, cada una de las cuales está relacionada con su familia complementaria de proteínas ligando (Fig. 8). La unión de una proteína señal al dominio de unión del ligando en el exterior de la célula, activa el dominio tirosina quinasa intracelular. Una vez activado, el dominio quinasa transfiere un grupo fosfato del ATP a determinadas cadenas laterales de tirosina, tanto de la propia proteína receptora como de otras proteínas de señalización intracelular, las cuales se unen posteriormente a los receptores fosforilados ¹¹⁹.

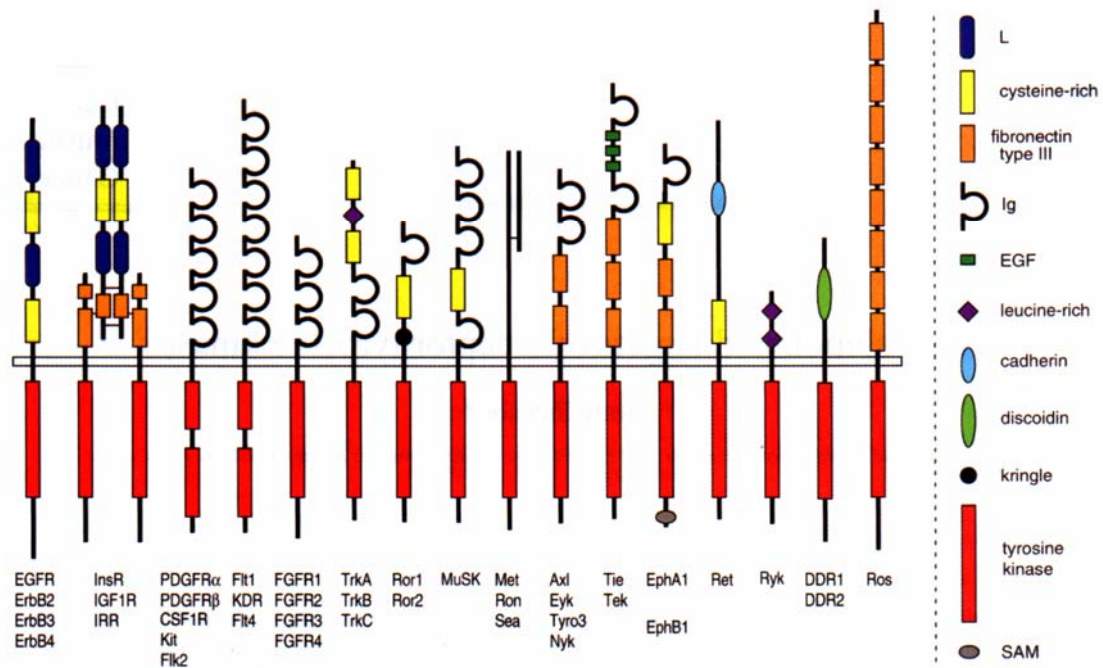


Figura 8: Representación de las diferentes tirosina quinasa que hay y los componentes por los que están formadas, en la tercera columna se encuentran *c-KIT* y *PDGFR α* .

Para que pueda haber un cambio de conformación, dos o más moléculas receptoras se encuentran juntas en la membrana formando un dímero o un oligómero. Está reorganización inducida en las fracciones citosólicas de los receptores inicia el proceso de señalización intracelular; en el caso concreto de los receptores tirosina quinasa, la reorganización permite a los dominios quinasa de las cadenas de receptores vecinas fosforilarse uno al otro en varios residuos tirosina (autofosforilación).

La autofosforilación de la fracción citosólica de los receptores tirosina quinasa contribuye de dos maneras a la activación del proceso. Primero, la fosforilación de residuos tirosina en el dominio quinasa incrementa la actividad de la enzima. Segundo, la fosforilación de residuos tirosina quinasa fuera del dominio quinasa genera lugares de unión para proteínas señalizadoras intracelulares de la célula diana. Cada una de estas proteínas se une a diferentes lugares fosforilados del receptor activado, reconociendo, además de la fosfotirosina, determinadas características del entorno de la cadena polipeptídica. Cuando se han unido al receptor, muchas de estas proteínas son fosforiladas en tirosinas y son activadas; alternativamente, la sola unión puede ser suficiente para activar la proteína señalizadora unida. La autofosforilación actúa como un interruptor

que desencadena el ensamblaje transitorio de un complejo señalizador intracelular, el cual difunde la señal a través de varias rutas hacia varios destinos en el interior de la célula.

Una colección completa de proteínas señalizadoras intracelulares pueden unirse a las fosfotirosinas de receptores tirosina quinasa activados contribuyendo a transmitir la señal hacia adelante.

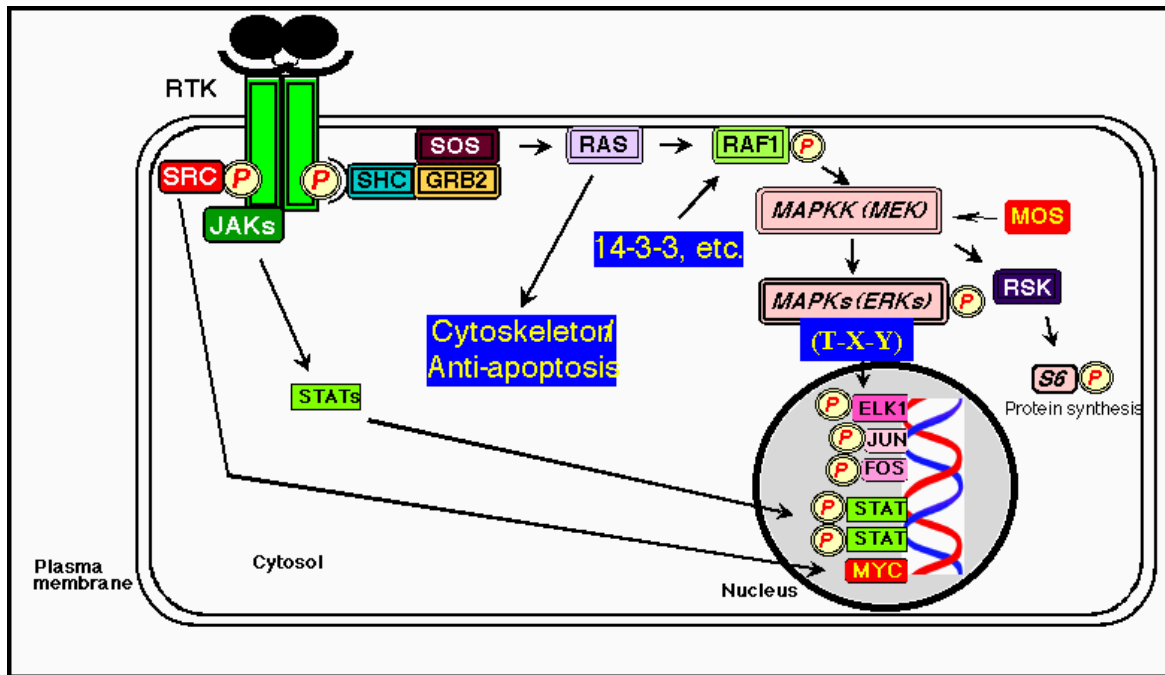


Figura 9: Vía de señalización de los receptores tirosina quinasa.

A) c-KIT

Como se ha indicado anteriormente, la expresión de *c-KIT* es una característica específica de los GIST¹⁹.

La proteína c-KIT, fue descrita por Yarden y cols. en 1987⁶, está codificada por el protooncogén *c-KIT*, el cual fue mapeado por Mattei y cols.⁷ localizando en cromosoma 4 (4q11-q12) y es el homólogo del producto del oncogen vírico v-kit del sarcoma felino 4 de Hardy- Zukerman.

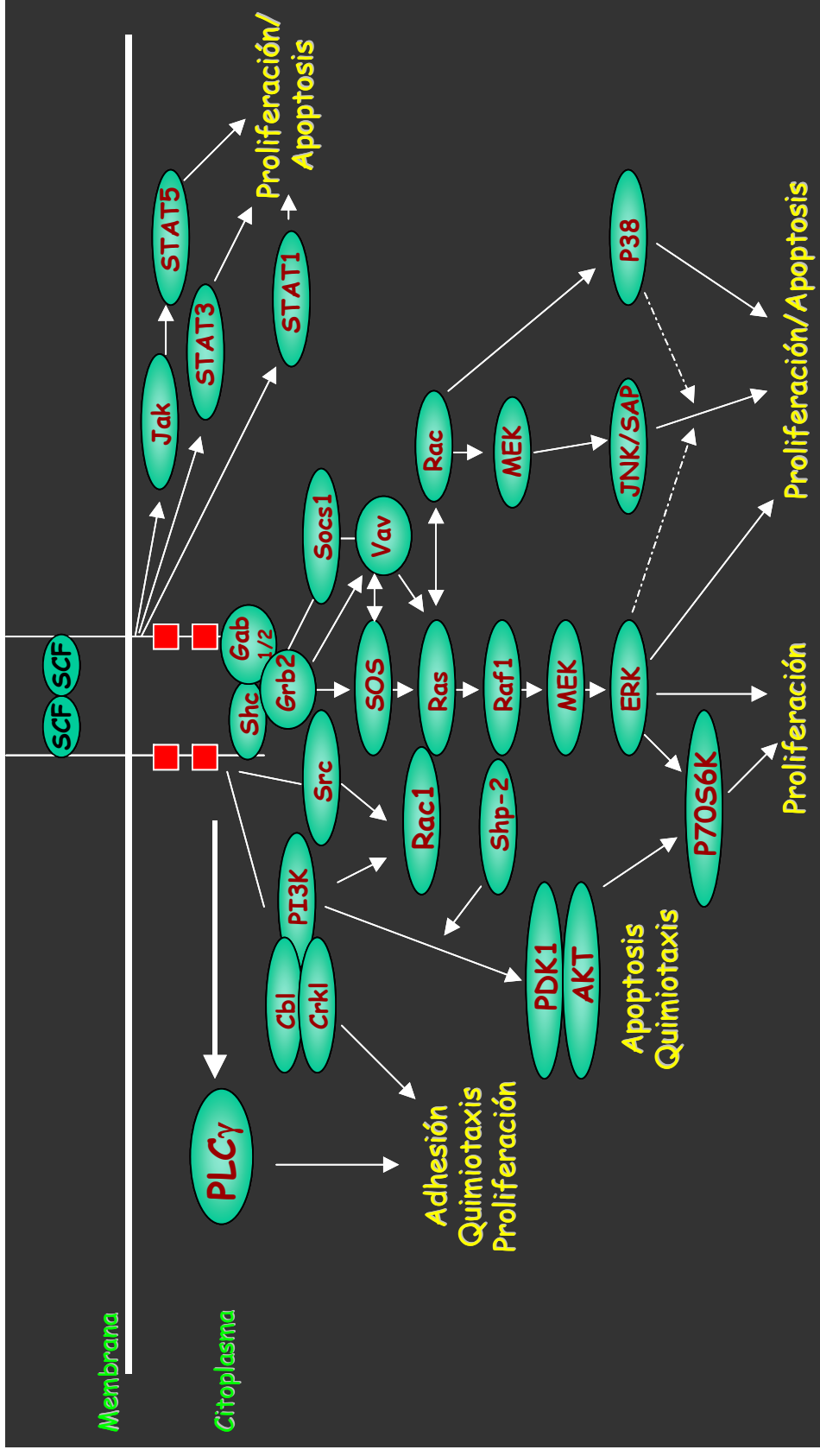


Figura 10: Esquema simplificado de la vía de señales de c-KIT. La activación de c-KIT ocurre al llegar SCF y producirse la homodimerización de KIT. Esto va acompañado por cambios estructurales en el receptor y produciéndose la activación del dominio quinasa de c-KIT. Los residuos tirosina fosforilados en c-KIT sirven como sitio de unión de varias proteínas señalizadoras celulares. Estas proteínas incluyen miembros de las familias PI3-K/AKT, RAS/RAF/MEK y JAK/STAT. Produciéndose una serie de señales intracelulares para la proliferación celular, adhesión, apoptosis, supervivencia y diferenciación.

Vandenbark y cols. (1992) ¹²⁰, demostraron que el gen *c-KIT* se expandía mas o menos unas 65kb de DNA y incluía 21 exones; conteniendo un largo transcripto de 5230pb con un "splicing" alternativo dando lugar a una glicoproteína de 145 kD, cuya función es ser receptor del "stem cell factor" (SCF) y que además posee actividad tirosina quinasa tipo III.

c-KIT es estructuralmente similar a otros receptores con actividad tirosina quinasa con posibilidad oncológicas, como el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFRs) α y β , el receptor del factor estimulante de la formación de colonias de macrófagos I (CSF1R), EGFR y Flt3 ^{121, 122}. Cada uno de estos receptores se caracteriza por un dominio extracelular de unión al ligando que contiene cinco dominios tipo inmunoglobulina (EC) (el tercer aminoterminal del dominio en *c-KIT* determina la especificidad a la unión del ligando SCF), un dominio citoplasmático que consiste en el dominio yuxtamembrana (JM) y el dominio tirosina quinasa (TK). El dominio tirosina quinasa se divide en una región de unión al ATP (TK1), una región fosfotransferasa (TK2) separadas por una inserción hidrofílica (KI) ¹²¹ (Fig.11).

Existen dos isoformas descritas que difieren en la presencia o ausencia de 4 aminoácidos (Glicina- Asparagina- Asparagina- Lisina; GNNK) codificados por los codones 510-513 que están presentes o ausentes justo en la región inmediatamente anterior al dominio transmembrana, codificada por el exón 9 ¹²³. La isoforma GNNK-, carente de los cuatro aminoácidos, se encuentra generalmente más expresada que la isoforma GNNK+; esta forma puede rápidamente transformarse a fibroblastos, y así la degradación del receptor se reduce. También se conoce que existe un mecanismo de corte y empalme alternativo que da lugar a la inserción de una serina en posición 715 y que algunas líneas hematopoyéticas producen receptores solubles ¹²⁴. Además se han encontrado niveles muy altos de KIT en suero humano ^{125, 126}.

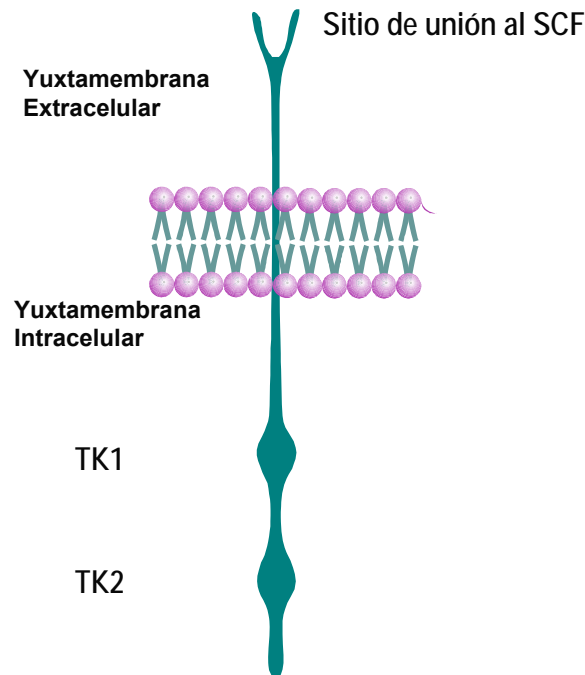


Figura 11: Esquema representativo del receptor de transmembrana c-KIT.

◆ EXPRESIÓN NORMAL

c-KIT, se encuentra expresado en células hematopoyéticas progenitoras, células cebadas, melanocitos, células germinales y las células intersticiales de Cajal ¹²⁷, siendo por tanto, esencial para el mantenimiento de la hematopoyesis, melanogénesis, gametogénesis, el crecimiento y la diferenciación de células cebadas y células intersticiales ²³.

Estudios in vivo han demostrado que la ausencia completa de actividad tirosina quinasa de c-KIT provoca muerte embrionaria por anemia severa. La inactivación de un alelo en seres humanos provoca piebaldismo, aunque la incidencia de esta patología es muy baja.

La pérdida de actividad de c-KIT en tejidos adultos no parece tener consecuencias vitales, por lo que se piensa que la función de c-KIT es más importante para el desarrollo embrionario que para la homeostasis de los tejidos adultos, o bien que en humanos existe una función redundante del gen que mimetiza su actividad fisiológica normal.

♦ MECANISMO DE ACTIVACIÓN Y SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR.

Como se ha mencionado anteriormente, el ligando para KIT es el SCF (el factor de crecimiento de célula madre), la activación del receptor se produce como consecuencia de un proceso de homodimerización¹²⁸. La unión extracelular del SCF conlleva la dimerización de moléculas c-KIT adyacentes con la consiguiente activación de los dominios tirosina quinasa intracitoplasmáticos; los tres primeros dominios tipo inmunoglobulina de c-KIT determinan la especificidad de interacción con SCF y el cuarto dominio facilita la dimerización del receptor. Las quinzas activadas, fosforilan a su vez y de forma cruzada, residuos de tirosina en la molécula opuesta del homodímero lo que provoca un cambio de conformación del complejo y la consiguiente activación del receptor^{121, 129}. 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 cruciales entre las que se incluyen las de proliferación, adhesión celular, apoptosis y diferenciación. En estas vías se encuentran las quinzas Src que se caracterizan por su dominio tirosina quinasa, el dominio homólogo Src 2 (SH2, interactúa con fosfotirosinas), el dominio homólogo Src 3 (SH3, interactúa con regiones ricas en prolina) y un sitio en la N-terminal de la proteína que guía el reclutamiento de la membrana. La activación y fosforilación de las quinzas Src es a través de c-KIT por dominios yuxtamembrana intracelular y extracelular. Se ha visto que hay una diferencia de activación de las quinzas Src con las dos variantes de c-KIT; la forma GDNF- tiene una activación más fuerte y rápida. La función exacta de las quinzas Src en la señal de c-KIT no ha sido determinada pero mutaciones en el dominio yuxtamembrana de c-KIT sugieren que pueden estar envueltos en la transformación. PI3K comprende a una familia de quinzas lipídicas que están relacionadas con la adhesión, movilidad, la variabilidad y viabilidad del tipo celular. La activación de c-KIT por SCF lleva al reclutamiento de la forma heterodimérica de PI3K al receptor y por lo tanto de la membrana; esta interacción ocurre a través del dominio SH2 localizado en una subunidad regulatoria de 85 kDa y uniéndose a la fosfo-Tyr719 (fosfo-tyr721, en la secuencia humana) en c-KIT.

Los lípidos bioactivos en la membrana generados por PI3K sirven como señales intermedias que atraen y activan otras moléculas las cuales reconocen

los motivos de estos lípidos. Hay evidencias que PI3K puede regular independientemente de la unión de c-KIT a través de la familia de proteínas Gab que muestran la fosforilación de la tirosina de KIT¹³⁰.

La familia JAKs son tirosinas quinasa citoplasmáticas que estimulan a los receptores a la activación por dimerización; su mayor sustrato se ha observado que son los factores de transcripción STATs, que se localizan rápidamente en el núcleo y dimerizan cuando se fosforilan. La activación de esta vía por KIT ha sido contradictoria observando que hay proteínas adicionales envueltas en la mediación de c-KIT para la activación JAK/STAT que sólo están presentes en algunos tipos celulares. c-KIT puede mantener su propia renovación de las células hematopoyéticas pluripotenciales a través de la vía dependiente de JAK2. Hasta ahora se conocen que de la familia de STATs: STAT 1, STAT3, STAT5A y STAT5b se encuentran implicados en las señales de c-KIT. La contribución exacta de estos STATs sobre la señal de c-KIT y la biología no se conoce¹³¹.

Una regulación importante de la vía de las Ras/MAPK es el dominio SH2/SH3 conteniendo el adaptador de la proteína Grb2. El dominio SH2 Grb2 puede unirse a la fosfo-Tyr 703 en la región de inserción de la quinasa y fosfo-Tyr936 en la región de la cola. Grb2 forma un complejo con Ras GDP/GTP intercambiándose con el factor SOS. La translocación del complejo Grb2/SOS hacia el receptor c-KIT y por consiguiente, la membrana probablemente conduzca a la activación de Ras; por lo que Grb2 constituye una unión a la familia de proteínas Gab¹³².

Las proteínas Gab son tirosinas fosforiladas en las células con activación de c-KIT y puede estar envuelto en la regulación de la actividad de PI3K o en la vía de las MAPK. La actividad de la proteína Ras es regulada por el cambio de nucleótido de guanina a través de la activación del factor SOS, el cual cataliza el cambio de la forma de la proteína inactiva unida a GDP al estado activo con la unión al GTP. La activación de Ras recluta las quinasas Raf a la membrana plasmática, las cuales activan moléculas downstream por fosforilación, incluyendo miembros de la familia MAPK. La activación Ras es crucial para la transformación y regulación del crecimiento celular, expresión de genes y señales antiapoptóticas a través de la vía MAPK.

PLC γ es un dominio SH2/SH3 conteniendo fosfolipasas que fosforilan tirosinas después de la estimulación SCF y forman un complejo con un receptor c-KIT. PLC γ es recluido por el fosfo-Tyr 936 de la actividad del receptor de c-KIT y puede generar diaciglicerol y inositol 1,4,5-trifosfato a través del lípido de la membrana fosfatidil-inositol-4,5-bifosfato. Diacilglicerol es envuelto en la activación de la proteína quinasa C (PKC) y inositol 1,4,5-trifosfato en la liberación del calcio des del retículo endoplasmático. PLC γ puede estar envuelto en la resistencia de la droga de los tumores dependientes de SCF/c-KIT.

◆ VÍAS DE REGULACION EN LA SEÑAL DE *c-KIT*

1-Proteínas tirosinas fosfatasas (PTPasas)

Durante la señal de activación por el ligando, la acción de la tirosina quinasa en unión con las PTPasas, donde únicamente hay un aumento transitorio en la fosforilación de las tirosinas de las proteínas celulares.

En la transformación celular por formas oncogénicas de *c-KIT*, hay un aumento en la fosforilación de las tirosinas; se puede deber en parte por la actividad alterada de las PTPasas, la cual es regulada a través de un grupo de sulfidril fuertemente conservado. La oxidación del residuo vuelve el enzima inactivo. Esta es la consistencia con los factores que hay en aumento de los oxígenos reactivos en las células con la activación de *c-KIT*. Además, la actividad de las PTPasas hacia una proteína específica puede ser regulada a través de los dominios de interacción de la proteína; por ejemplo el dominio SH2 contiene fosfatasas SHP1 que pueden ser reclutadas por el fosfo-Tyr569 y SHP2 por el fosfo-Tyr567 en el dominio de yuxtamembrana del *c-KIT*. SHP1 es conocido como regulador negativo de la señal de c-KIT, probablemente en la defosforilación de las proteínas en el complejo de señales SHP1/c-KIT. Podrían estar también implicados en el complejo de regulación de c-KIT una serie de fosfatasas treonina/serina. Sin embargo, aun no esta bien definido el papel de las proteínas ^{133, 134}.

2- Fosfatasas fosfoinositol

Hay una variedad de diferentes fosfatasas fosfoinositol con características específicas de los sitios de fosforilación en el anillo inositol. Se incluye un SHIP

(SH2, contiene inositol 5 fosfatasa) y PTEN. SHIP es una familia de 110-145kDa con SH2 inositol 5-fosfatasa generado por un splicing alternativo y procesado proteolítico. SHIP defosforilado en la posición 5, únicamente en lípidos en los cuales la posición 3' es sólo fosforilado, sugiere que la función de SHIP en la vía PI3K, igual que para la vía PTEN (PTEN es fosfoinositido 3-fosfatasa). PTEN puede contribuir a la transformación independiente de la señal de c-KIT. SHIP es de considerable interés en la desregulación de la señal de c-KIT; después SHIP1 inhibe la señal de regulación SCF/c-KIT en la dirección de desgranulación en mastocitos. En otros sistemas celulares SHIP1 ha sido demostrado en la regulación AKT dependiente del crecimiento celular y apoptosis. Se sugiere que SHIP puede jugar un papel significativo en la señal de c-KIT y en la transformación, como en la modulación de la señal de PI3K^{135, 136}.

3-Proteína quinasa C

Los miembros de la familia PKC han sido implicados en una extensa variedad del proceso celular que incluye la regulación del ciclo celular, funciones del citoesqueleto, diferenciación y otras. La regulación de la serina/treonina de la quinasa PKC juega un único rol en el loop feedback negativo durante la activación de c-KIT. La unión de c-KIT con SCF aumenta la fosforilación dependiente de PKC de Ser741 y Ser746 en el dominio de inserción de la quinasa. Este proceso es pensado para contribuir en la disminución de la actividad de la quinasa tirosina c-KIT en la respuesta a la activación de PKC. En adicional la activación de PKC aumenta el procesado proteolítico de c-KIT cerca del dominio transmembrana y rompiendo el dominio extracelular desde la cola citoplasmática y por lo tanto, interrumpiendo la señal inducida por el ligando.

Tras la activación se produce una internalización del receptor y una síntesis de nuevos receptores de novo^{137, 138}.

◆ PATOGENESIS DE *c-KIT*

Existen una serie de evidencias por las cuales *c-KIT* juega un papel fundamental en la patogénesis de los GIST. Las mutaciones activantes de *c-*

KIT son un acontecimiento frecuente en GIST y constituyen un evento precoz en el desarrollo de estas neoplasias; siendo más frecuentes en GIST malignos que en benignos, así como en la variante fusocelular que en la epitelial; y no apareciendo nunca en leiomiomas ni en leiomiosarcomas ¹³⁹. No se observa una desregulación de c-KIT cuando los GIST progresan a un mayor grado histológico y/o metastatizan ¹²⁷; los modelos experimentales en los que se aborda la expresión de c-KIT muestran que este receptor es un requisito para la diferenciación y proliferación de las CIC, y por tanto esto significaría que la función desempeñada por c-KIT sería igual de vital para la supervivencia celular en los GIST ¹⁴⁰; y por último, la expresión de c-KIT se produce en prácticamente la totalidad de las células de los GIST y por tanto constituiría un elemento potencialmente iniciador en estos tumores ^{140, 141}.

Los mecanismos por los cuales las mutaciones de *c-KIT* conducen a la activación del receptor independiente de ligando no están todavía claros, aunque al menos en algunos casos las proteínas c-KIT mutadas presentan cambios estructurales que favorecen la oligomerización del receptor y la fosforilación cruzada incluso en ausencia de ligando ^{19, 142, 143}. Parece ser que diferentes tipos de mutaciones confieren distintos grados de activación, lo cual se puede traducir en diferencias en cuanto a la agresividad del tumor ¹⁴³.

Por analogía con otros receptores tirosina quinasa, el dominio yuxtamembrana puede funcionar como regulador negativo de la quinasa c-KIT, y una disrupción de la integridad conformacional del dominio puede perjudicar a la función regulatoria negativa; por lo tanto, el potencial mutacional del dominio yuxtamembrana se atribuye a la pérdida de la función inhibitoria.

Se ha observado que las mutaciones activantes del receptor c-KIT han sido implicadas en la patogénesis de otros tumores humanos, incluyendo seminomas, disgerminomas, Sarcoma de Ewing, mastocitosis, leucemias mieloide aguda, y más recientemente en melanomas, sugiriendo un papel en la oncogénesis de c-KIT.

En 1998 Hirota y cols.¹⁹ documentaron no sólo que los GISTs expresaban c-KIT sino que además, 5 de 6 tumores analizados genéticamente eran

portadores de mutaciones en la región del gen *c-KIT* que codifica para el dominio yuxtamembrana del receptor (exón 11). Cuatro mutaciones eran deleciones intersticiales que afectaban a algunos codones y la quinta correspondía a una mutación puntual que provocaba un cambio de aminoácido en la proteína. Lo determinante del hallazgo es que demostró que estas mutaciones activaban de forma constitutiva la actividad tirosina quinasa de *c-KIT* en ausencia de ligando.

Desde entonces son muchos los estudios que se han dedicado a estudiar las mutaciones de *c-KIT* en los GIST y actualmente, dependiendo de las series analizadas y de los procedimientos empleados, la incidencia de mutaciones es de entre un 21% y un 92%^{20, 95, 144-146}. Esta discrepancia se debe fundamentalmente a que muchos estudios sólo analizan el exón 11 de *c-KIT*. Sin embargo, Rubin y cols.¹⁴⁴ demostraron analizando los 21 exones de *c-KIT* que se encontraban mutaciones también en los exones 9, 13 y 17, lo que significaba que un 23% de las mutaciones encontradas se encontraban fuera del exón 11. Hasta la fecha se han encontrado mutaciones de *c-KIT* en los exones 9, 11, 13, 14 y 17^{23, 144}.

Las mutaciones activadoras de *c-KIT*, podrían dividirse en dos grandes grupos: en primer lugar las que afectan a los dominios quinasa, es decir, la actividad enzimática, y en segundo lugar las que afectan a las secuencias reguladoras (dominios yuxtamembrana) que no afectan a la actividad enzimática. La distinción entre ambos tipos de mutaciones es importante porque la inhibición de *c-KIT* por parte de ciertas moléculas terapéuticas como Imatinib y otros inhibidores tirosina quinasa depende de la localización de las mutaciones del receptor.

En muchos estudios se ha alcanzado frecuencias de mutaciones de hasta un 85% en el gen *c-KIT*; produciéndose en su mayoría en heterocigosis, siendo estas mutaciones un evento temprano en el desarrollo de los GIST. Corless y cols.¹⁴⁷ demostraron que las mutaciones en *c-KIT* eran un evento temprano en tumores menores de un centímetro hallados por casualidad en autopsias o endoscopias, presentando la inmensa mayoría mutación en *c-KIT*.

Estas mutaciones pueden ser: deleciones intersticiales, duplicaciones, mutaciones puntuales o codones STOP, incluso en menor número se han observado inserciones e inversiones. En este protooncogén los exones más afectados son los que se encuentran en la región yuxtamembrana [exón 11(67%)¹⁴⁸, el exón 9 (17%)¹⁴⁹] y dominios tirosina quinasa [exones 13 y 17 (1%)]^{100, 150, 151} (Fig.12):

- **c-KIT exón 11:** Hirota y cols. documentaron además de la expresión en la proteína c-KIT¹⁹, las mutaciones que se producían en el dominio yuxtamembrana (exón 11) en estos tumores. Además, se realizaron experimentos in vitro para ver el potencial de este receptor y se vio que las isoformas de c-KIT crecían in vitro, dando lugar a la activación del receptor en ausencia de ligando. También transfectaron cinco casos a las líneas celulares Ba/F3 en un ensayo con nudes de ratones tumorogénicos; los resultados sugirieron que la actividad oncogénica de c-KIT juega un papel importante en la supervivencia y crecimiento de los GIST.

Otros estudios mutagénicos de c-KIT han demostrado que deleciones o inserciones o mutaciones puntuales de este dominio produce disrupciones en las funciones; dando lugar a la dimerización del receptor en ausencia de ligando. La frecuencia de mutación en este exón tiene un amplio rango (20-92%), debiéndose estas diferencias al tipo de tejido utilizado para el estudio; si éste es fresco y se utiliza cDNA se obtiene un número elevado de mutaciones, pero si se utiliza tejido fijado e incluido en parafina se disminuye notablemente el porcentaje de mutaciones (20-57%).

En el exón 11 de *c-KIT*, podemos encontrar seis tipos de alteraciones: deleciones, deleciones más inserciones, mutaciones puntuales, duplicaciones, inserciones e inversiones. Las más frecuentes son las deleciones intersticiales que suelen afectar la parte inicial del exón (entre los codones 550-561) especialmente los codones 557 al 559; las deleciones en la parte distal son menos frecuentes, aunque se ha observado que la deleción del codón Asp579 produce una fosforilación constitutiva de *c-KIT*. Con menor incidencia se encuentran las mutaciones puntuales que por lo general se limitan a cuatro codones del exón 11: Trp557Arg, Val559Asp, Val559Ala, Val559Gly,

Val560Asp y Leu576Pro. Por último, al final del exón y en mucha menor proporción de casos, se pueden presentar duplicaciones en tándem de un determinado número de codones que pueden ir desde 1 a 18 codones; las duplicaciones se han asociado con una fosforilación constitutiva del receptor, crecimiento independiente del ligando, resistencia a la apoptosis y alteración de la vía de señales reguladoras ¹⁵². Las inserciones e inversiones son extremadamente raras en el exón 11, se han observado Lys558delinsAsnPro en unos pocos casos ¹⁴². Inversiones no se han descrito en el exón 11 en GIST, sin embargo, coexisten como deleciones.

- **c-KIT exón 9:** Lux y cols. ¹⁵³ fueron los primeros en describir una mutación en el dominio extracelular de c-KIT (exón 9). La frecuencia de mutaciones en este exón se encuentra entre el 9-20% de los casos dependiendo del estudio. Una inserción de seis nucleótidos es la mutación más frecuente en este exón dando lugar a una duplicación de Ala⁵⁰¹ y Tyr⁵⁰²; pero también se han hallado excepcionalmente duplicaciones o inserciones de los codones 506-508. El mecanismo de acción se desconoce pero se sabe que las mutaciones en el exón 9 producen disrupciones en los motivos antidimerización del dominio extracelular, dando lugar a una isoforma de c-KIT que tiene una actividad constitutiva de la quinasa. Se ha constatado que este tipo de mutaciones se encuentran en una mayor frecuencia en GISTs de localización intestinal y de mayor potencial maligno ^{42 154}.

- **c-KIT exón 13:** Lux y cols. también fueron los primeros en observar una mutación puntual (K642E) en este exón; las frecuencias de mutación en este exón son mínimas (0,8 - 4,1%); posteriormente se han observado otras mutaciones puntuales como Leu641Pro, Val643Ala, Leu647Pro. Hay evidencias de que estas mutaciones producen una activación del receptor independiente de ligando, sin embargo no está claro el mecanismo espontáneo de dimerización del receptor.

- **c-KIT exón 17:** las mutaciones que se encuentran envueltas en el loop de c-KIT son muy raras. Se ha descrito la mutación N822K en GIST esporádicos y N822H en GIST familiares. Ambas mutaciones causan la activación constitutiva

del dominio quinasa, sin estar muy claro el mecanismo utilizado. Se ha descrito que el codón 816 se encuentra mutado en otras enfermedades como la mastocitosis (también se han hallado mutaciones en el exón 11 en mastocitosis), la leucemia mieloide crónica, seminoma, disgermioma y linfomas de células T ^{146 155 156}. El hecho de que diferentes neoplasias tengan diferentes tipos de mutaciones constata que cada fenómeno neoplásico requiere de diferentes condiciones de transformación.

A nivel de biología molecular en casos tratados con Imatinib se ha observado que la progresión de los GIST puede estar relacionada con la acumulación de mutaciones secundarias en c-KIT. Por ejemplo, encontrar una mutación puntual en el exón 11 y subsecuentemente adquirir una delección en el 9, que favorece tener una nueva ventaja para el crecimiento tumoral.

RECEPTOR TIROSINA QUINASA TIPO III

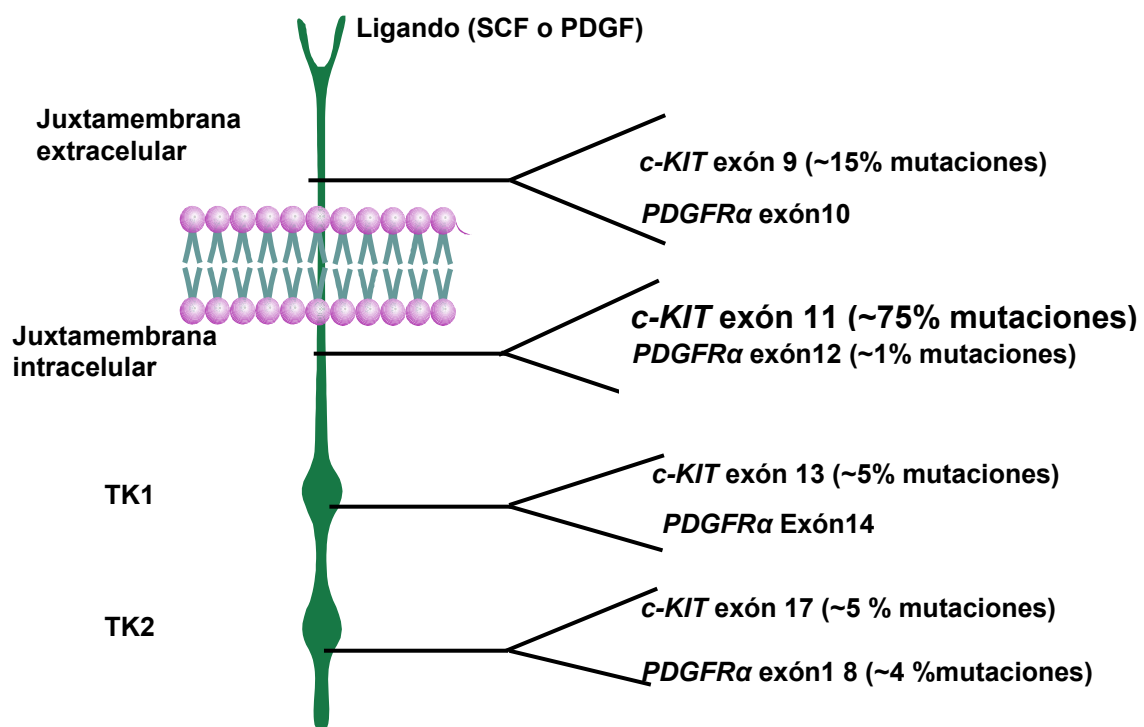


Figura 12: Imagen del receptor tirosina quinasa tipo III: *c-KIT* y *PDGFRα*; con sus correspondientes tantos por cientos de mutaciones. Imagen cedida por Stephan Dirrhofer.

♦ MUTACIONES DE *c-KIT* Y PRONÓSTICO TUMORAL

Desde el punto de vista clínico-patológico se ha intentado encontrar algún significado a la presencia de mutaciones en *c-KIT*. En este sentido, parece que las mutaciones de *c-KIT* son más frecuentes en GIST malignos que en benignos, que no aparecen nunca en leiomiomas ni en leiomiomas, y que se observa una mayor frecuencia de mutaciones en los GIST de variante fusocelular que en los de variante epitelioides^{20, 62, 145, 147, 151}. La mayoría de estos primeros trabajos se basaron sobre series retrospectivas, en las que la incidencia de mutaciones podría estar infrarrepresentada. De hecho, Corless y cols.¹⁴⁷, en un estudio molecular sobre una serie de 13 GIST de menos de 1 cm. de diámetro encontrados de forma accidental tras cirugía por otros motivos y utilizando DHPLC para la detección de mutaciones, detectan mutaciones de *c-KIT* en el 83% de los casos. Esto indicaría, según los autores, que las mutaciones de *c-KIT* constituyen un evento precoz en el desarrollo de estos tumores y que dada su alta incidencia el valor pronóstico de estos hallazgos tendría escasa relevancia¹⁴⁷. Estudios posteriores en series amplias de casos han encontrado frecuencias similares de mutaciones de *c-KIT* en los grupos de GISTs de alto riesgo y de bajo riesgo confirmando esta hipótesis^{151, 157}. Aunque la presencia de mutaciones no confiere información pronóstica en sí, no ocurre lo mismo cuando se consideran los diferentes subtipos de mutaciones, algunos de los cuales se asocian a un fenotipo más maligno^{152, 158}. Singer y cols.⁶² evaluaron la relevancia pronóstica de las mutaciones de *c-KIT* en un total de 48 GIST, y encuentran que aquellos pacientes con mutaciones puntuales en el exón 11 presentaban un porcentaje libre de recurrencia de 5 años del 89% frente al 40% observado en el grupo de pacientes portadores de otros tipos de mutaciones. Además, la presencia de deleciones o inserciones en el exón 11 constituía un factor indicador de recurrencia independiente. Esta misma observación ha sido demostrada posteriormente en el caso de GIST localizados¹⁵⁹.

Hay estudios que constatan la presencia de un punto caliente mutacional asociado a una peor evolución de los pacientes portadores de las deleciones de los codones 557 (Trp) y /o 558 (Lys); encontrándose en mayor frecuencia en los GISTs metastásicos¹⁵². Más tarde, el Grupo Español de Investigación de Sarcomas (GEIS), en un estudio multicéntrico en el que se analizaron las

mutaciones de *c-KIT* en un total de 162 GISTs localizados, operados, de más de 2cm. de diámetro y con una mediana de seguimiento de 42 meses, demostró que las deleciones que afectan a los codones 557 y 558 de *c-KIT* constituyen un marcador predictivo independiente de recurrencia en GISTs y que por tanto, debería de ser un marcador molecular a tener en cuenta en el tratamiento adyuvante de pacientes con GISTs localizados ¹⁶⁰.

Para Maria Debiec-Rychter y su grupo las mutaciones localizadas en los codones 565-567 y 577-579 tienen un pronóstico de progresión mucho más alto que otras mutaciones y peor respuesta a Glivec ¹⁶¹.

En contraste a las mutaciones del exón 11 de *c-KIT*, la frecuencia de las mutaciones en el exón 9 es mayor en los tumores malignos (17%) frente a los de alto y bajo riesgo (3%) ¹⁴².

Las mutaciones de *c-KIT* en GIST muestran mayor frecuencia de metástasis en hígado y más alta mortalidad que los GIST negativos para las mutaciones en este; además las deleciones en el exón 11 son marcadores de peor pronóstico en GIST gástricos ¹⁶².

◆ MODELOS ANIMALES

Para poder entender mejor la patología y la clínica de los GIST se han desarrollado modelos animales; entre ellos Sommer y cols. ¹⁵⁸ desarrollaron un modelo de ratón con un GIST familiar humano, usando una estrategia de "knock-in" en el genoma del ratón, basado en una mutación en el exón 11 (V558A, en heterocigosis). Se observa una total penetrancia, estos hallazgos sugestionan que una señal constitutiva de *c-KIT* es crítica y suficiente para la inducción de neoplasias de GIST e hiperplasia de ICC ¹⁶³.

Otro modelo murino ha sido desarrollado por Rubien y cols. ¹⁶⁴ introduciendo la mutación del exón 13 K641E, la cual ha sido descrita tanto en GIST esporádicos como en familiares. Los animales desarrollan una patología muy similar al GI con completa penetrancia.

B) SCF

El factor de crecimiento de células madre se identificó en 1990¹⁶⁵ fue originalmente descrito como una citoquina capaz de promover el crecimiento y la supervivencia de células hematopoyéticas de múltiples linajes.

El gen está localizado en el brazo largo del cromosoma 12 en posición 12q21.32 y codifica una proteína de 30KDa.

La molécula puede existir en dos isoformas que derivan de un corte y empalme alternativo que incluye al exón 6 y que dan lugar a una isoforma soluble o transmembrana respectivamente.

La forma soluble de la citoquina se genera por una ruptura proteolítica localizada dentro del exón 6 o 7.

In vivo, la isoforma transmembrana se requiere para la hematopoyesis normal pero in vitro tanto la forma soluble como la de membrana poseen actividad biológica.

Se piensa que la isoforma transmembrana aumenta la estabilidad del receptor y previene la internalización del mismo sosteniendo la actividad quinasa, en lo que se ha llamado un circuito yuxtacrino.

C) PDGFR α

Heinrich y cols. se plantearon la posibilidad de que existiera un segundo receptor tirosina quinasa implicado en los tumores GIST dentro del grupo del 5-7% de GIST "wild type"^{23, 24}. Este posible receptor se activaría y podría ir acompañado de la regulación disminuida a nivel transcripcional de c-KIT; esta teoría se asoció mas bien a los GIST que dentro del grupo "wt-type" eran patogénicos. Para poder descubrir si existía un segundo receptor para estos tumores se realizaron inmunoprecipitaciones con antisera policlona (panRTK antisera) que se une a péptidos de las regiones de las secuencias fuertemente conservadas en los receptores tirosina quinasa; hallando como resultado una fosfoproteína alrededor de 150 y 170k correspondiente con **PDGFR α** . Posteriormente aquellos wt-type que expresaban la fosfoproteína fueron secuenciados los exones homólogos a los de *c-KIT* (10,12,14 y 18), además de estudiar los wt-type se estudiaron GIST mutados en *c-KIT*. Se

hallaron mutaciones en el gen *PDGFRα* y además se constató que las mutaciones eran mutuamente excluyentes con *c-KIT*²⁵.

Matsui y cols. en 1989¹⁶⁶ identificaron una secuencia genómica y un cDNA clonado para un nuevo receptor de la familia de los PDGF/CSF1; el gen transcribía 6,4kb que son coexpresadas en tejidos humanos normales con 5,3kb de mRNA. Kawagishi y cols. en 1995¹⁶⁷ aislaron clones genómicos que codificaban *PDGFRα* y mostraron que el gen contenía 23 exones con una expansión de 65kb.

PDGFRα se localiza en el cromosoma 4q11-q12³² (Disteche y cols.1989, Matsui y cols. 1989 localizaron el gen por hibridación in situ¹⁶⁶) adyacente a *c-KIT*. Al igual que *PDGFR1* y *CSF1R* que se desarrollaron a partir de un gen ancestral por duplicación, se cree que una situación analógica ocurrió con *c-KIT* y *PDGFRα*. Desde un punto de vista evolutivo es posible que la distribución de los cuatro locis, *PDGFR2*, *c-KIT*, *PDGFR1* y *FMS*, en el cromosoma 4 y el cromosoma 5 sean resultado de la duplicación de genes y doblete de cromosomas (tetraploidización).

Heinrich y cols. realizaron un estudio para poder estudiar aquellos GIST que eran negativos para las mutaciones en *c-KIT*; utilizaron un cóctel de anticuerpos de epítomos del receptores tirosina quinasa para poder extraer los tumores *c-KIT*- wild type. En la inmunoprecipitación del Western blotting con un anticuerpo específico fosfotirosina observaron una nueva banda identificada como *PDGFRα*²².

Aunque la mayoría de mutaciones se producen en *c-KIT*, entre un 5-7% de los casos se encuentra mutado el protooncogén *PDGFRα* (receptor del factor de crecimiento plaquetario alfa) constituido por 23 exones de aproximadamente 65Kb y se encuentra en la misma región que *c-KIT* (4q11-12). Los mismos autores evaluaron las mutaciones genómicas del *PDGFRα* en los exones 10, 12,14 y 18, que corresponden a los exones de *c-KIT* que contienen las mutaciones oncogénicas en la mayoría de los GIST, y encontraron mutaciones del *PDGFRα* concretamente en los exones 12 y 18 en el 35% de los GIST *c-KIT* negativos y ninguna en los GIST con un *c-KIT* mutado. Por lo que son mutaciones mutuamente excluyentes pero con consecuencias biológicas

similares en la patogénesis de los GIST; la cascada de transducción de señales de *PDGFR α* es indistinguible de la utilizada por aquellos tumores que se encuentran mutados en *c-KIT*¹⁶⁸. Las mutaciones en *PDGFR α* suele ocurrir predominantemente en GIST epitelioides y con células gigantes multinucleares; localizándose gástricamente un 98% de las mutaciones en este gen.

Los mecanismos por los cuales las mutaciones de *c-KIT* y *PDGFR α* conducen a la activación del receptor independiente de ligando no están claros, aunque en algunos casos las proteínas mutadas presentan cambios estructurales que favorecen la oligomerización del receptor y la fosforilación cruzada incluso en ausencia de ligando. Los tipos de mutaciones confieren distintos grados de activación, lo cual se puede traducir en diferencias en cuanto a la agresividad del tumor¹⁴².

◆ MUTACIONES EN *PDGFR α*

En la publicación de Corless y cols.¹⁶⁹ en la que analizan más de 1000 casos de GISTs estiman que la frecuencia de mutaciones de *PDGFR α* es del 7,2%, siendo el exón 18 el que más frecuentemente se encuentra mutado(6%), seguido por el exón 12 (1%) y en menor frecuencia por el exón 14 (0,2%)¹⁷⁰. Por lo general, las mutaciones de *PDGFR α* se asocian a GIST de morfología epitelioide²⁵ y especialmente aquellas que tienen mutaciones en el exón 14 a un pronóstico más favorable¹⁷¹. Se han observado en *PDGFR α* exón 18 mutaciones como Asp846Tyr reportado en GIST esporádicos y familiares, Asp820Tyr en GIST familiar³⁵. En estudios in vitro se ha observado que las mutaciones causan activación constitutiva del receptor fosforilado y desregulación de la vía MAPK y STAT¹⁶⁹.

Pero no todos los GIST *c-KIT* negativos tienen mutaciones de *PDGFR α* , existe una proporción de casos (20%) que también exhiben mutaciones de *c-KIT*⁶³.

1.8.2 RESPUESTA A GLIVEC

Se ha podido constatar en estos ensayos que los GIST no responden de igual forma al tratamiento con imatinib; además no se ha observado que exista una

correlación entre la duración de la terapia y la respuesta. La respuesta a Imatinib puede ser más o menos efectiva según si se encuentra mutado o no el gen y el status de la mutación (Tabla 6). En el ensayo CSTIB2222 también se estudiaron a nivel molecular los casos; tras 19 meses de seguimiento se observó que los pacientes con mutaciones en el exón 11 de *c-KIT* presentaban una respuesta parcial significativamente superior (83,5%) a la observada en pacientes con mutaciones en el exón 9 (48,7%), o a aquellos que no presentaban ninguna mutación detectable (0%). Se ha observado que aquellos pacientes con mutaciones en el exón 11 tienen muy buena respuesta al medicamento pero en cambio, los mutados en el exón 9 de *c-KIT* tienen una respuesta parcial. En aquellos GIST en los que no se haya ninguna mutación ni en *c-KIT* ni en *PDGFRα* la respuesta es mínima. Los mutados en el *PDGFRα* 12 y 14 responden bien; sin embargo, se ha observado una resistencia primaria al medicamento, esta resistencia es debida a las mutaciones localizadas en los exones 17 de *c-KIT* y 18 de *PDGFRα* (en el codón D842V)^{161, 172}. Durante la respuesta a imatinib o la fase estable de la enfermedad pueden ocurrir mutaciones secundarias que adjudican un mayor potencial maligno y una menor respuesta a imatinib, la inmensa mayoría de estas mutaciones son mutaciones "missense" y suelen ocurrir cuando la mutación primaria se localiza en el exón 11 de *c-KIT* (60-65%) versus el exón 9 (16-36%)¹⁷².

Pero además hay resistencia secundaria al medicamento a causa de la adquisición de nuevas mutaciones en *c-KIT* y *PDGFRα*; después de una respuesta inicial. En el caso de GIST se han postulado cuatro mecanismos de resistencia al tratamiento con imatinib¹⁷³:

- a. La adquisición de una segunda mutación en *c-KIT* o *PDGFRα* que confiere una resistencia al imatinib. En este caso en concreto llama especialmente la atención la elevada frecuencia de nuevas mutaciones que se producen en el exón 17 de *c-KIT*, así como en otros exones, como el 13 o el 14, como fenómenos indicativos de resistencia secundaria al tratamiento con imatinib¹⁷⁴⁻¹⁷⁶.
- b. La amplificación genómica de *c-KIT* y la consiguiente hiperexpresión de la proteína, con pérdida de expresión.

- c. La activación de un receptor tirosina quinasa alternativo a c-KIT o PDGFR α , aun por descubrir.
- d. Mecanismos heterogéneos con activación común de vías alternativas (AKT, mTOR, MAPK...)
- e. La resistencia funcional de determinados tipos de mutaciones que in vitro muestran sensibilidad al Imatinib (por ejemplo: las mutaciones del exón 9 o el receptor en estado nativo).

Afortunadamente, ya se está progresando en terapias alternativas al Glivec con otros inhibidores específicos de tirosinas quinazas que puedan proporcionar alguna esperanza en la lucha contra la enfermedad ¹¹⁸.

Tabla 6: Respuesta al Glivec en los GISTs, ya sean esporádicos, asociados a otras enfermedades o familiares.

TIPO	COMENTARIOS
GIST esporádico	
<i>c-KIT</i> mutaciones	
Exón 11	Buena respuesta a imatinib
Exón 9	Menor respuesta a imatinib
Exón 13	Sensible a imatinib in vitro, respuestas clínicas observadas.
Exón 17	Sensible a imatinib in vitro, respuestas clínicas observadas.
<i>PDGFRα</i> mutaciones	
Exón 12	Sensible a imatinib in vitro, respuestas clínicas observadas.
Exón 18	D842V tiene poca respuesta a imatinib, muchas otras mutaciones son sensibles.
Wild-type	Menor respuesta a Imatinib
GIST Familiares	
<i>c-KIT</i> exón 11 (V559A, delV559, W557R)	Pigmentación en piel, pigmentosa urticaria, mastocitosis.
<i>c-KIT</i> exón 13 (K642E)	No pigmentación en la piel, o mastocitosis.
<i>c-KIT</i> exón 17 (D820Y)	No pigmentación en la piel, o mastocitosis, anomalías en la peristalsis del esófago.
GIST pediátrico	Mutaciones en c-KIT mucho menor que en adultos.
Esporádicos	GIST gástricos con condroma pulmonar y o paraganglioma; M:H=7:1; no se han identificado mutaciones.
Carney's triad	No se identifican mutaciones en c-KIT.
NF-1 relacionados con GIST	

1.9 CITOGENÉTICA Y FISH:

El primer trabajo en el que se estudia la citogenética de los tumores GIST como tal entidad no apareció hasta 1998¹⁷⁷. Hasta entonces, los trabajos citogenéticos sobre GIST se publicaban junto con los leiomiomas o leiomiomasarcomas de origen gástrico o intestinal o se incluían junto leiomiomasarcomas de origen variado¹²⁷. Fue el trabajo de Marci¹⁷⁷ el que estableció unas diferencias desde el punto de vista de la citogenética como eran la presencia de monosomías de los cromosomas 14 y 22 y deleciones del brazo corto del cromosoma 1 (1p) en algunos casos. Estas anomalías citogenéticas definen claramente los GIST de los leiomiomas y leiomiomasarcomas con alteraciones más complejas que implican un mayor número de cromosomas. Desde entonces, los cariotipos de aproximadamente dos tercios de los GIST muestran tanto la monosomía del cromosoma 14 como pérdidas de heterocigosidad y de hibridación genómica comparada, se han identificado al menos dos regiones cromosómicas, 14q11.1q12 y 14q22-24, candidatas de contener genes supresores de tumores con implicación en la patogénesis de los GIST^{178,179} (Fig. 13).

Por su parte la pérdida del brazo largo del cromosoma 22 se observa en el 50% de los GIST y está asociado a la progresión a lesión maligna¹⁷⁹⁻¹⁸². Tanto la pérdida del 14 y 22 o 14q y regiones específicas del 22 se han observado tanto en GIST benignos, "borderline" y malignos; sugestionando que estas regiones cromosómicas contienen genes supresores de tumores y genes reparadores envueltos en la patogénesis de GIST junto con la presencia de mutaciones en *c-KIT* y *PDGFR α* . Los resultados citogenéticos junto con otros datos sugestionan que 14q23-q32 y 22q11.2-q12 pueden contener genes supresores de tumores de vital importancia para el desarrollo y progresión tumoral. Las pérdidas de las regiones cromosómicas 1p, 9p y 11p son menos frecuentes que las pérdidas de 14q y 22q pero se asocian más significativamente a una mayor malignidad y un peor pronóstico y que se ha observado que son un evento temprano en la patogenia de los GIST^{22, 179, 181-183}. Se han descrito que en GIST benignos se observan deleciones en 1p y pérdida del cromosoma 15. La región 1p36 puede jugar un papel importante en la progresión tumoral; estas

alteraciones en el cromosoma 1 pueden representar cambios secundarios relevantes en la progresión y malignidad en la transformación de GIST.

En CGH se ha observado que se producen ganancias de material en los GIST malignos en 3q26-q29 (40%), 5p (30%), y 8q22-q24, también se ha observado la ganancia de 19q13. Se han observado que son más frecuentes las pérdidas que las ganancias, afectando sobretodo al 1p y al cromosoma 15¹⁸⁴ (Fig.15).

Se han observado que las ganancias en 8q y 17q son frecuentes en metástasis y 20q en GIST malignos y metastásicos; también se ha visto que la pérdida de 9p es más frecuente en GIST metastásicos que en GIST primarios, al igual que la pérdida del 13q que no se observa en GIST benignos¹⁶³.

Las pérdidas de 9p tienen una relación con la malignidad en GIST ya que no se expresa en los GIST de elevado riesgo. CDKN2A codifica para dos importantes supresores de tumores p16^{INK4A} y p14^{ARF}, envueltos en la regulación del ciclo celular, inhibidor de quinasas dependientes de ciclina y que actúan en la transición de las fases G1 a S del ciclo celular^{66,32,23} (Fig.14). Esta pérdida podría estar relacionada con la agresividad del tumor; pero no se ha podido observar ninguna relación de la pérdida de este gen ni por metilación, ni deleción con los parámetros estudiados hasta ahora¹⁸⁵. Al lado se encuentra CDKN2B que codifica p15^{NK4B} el cual forma complejos binarios exclusivamente con CDK4 y CDK6, inhibiendo pRb fosforilado durante G1 y arretando la progresión del ciclo celular. Estos tres genes supresores de tumores están implicados en la regulación de los puntos de transición de G1/S y de G2/M; la pérdida de estos genes implica una inmortalidad de las células tumorales.

Además de las pérdidas cromosómicas, también se han descrito ganancias del brazo largo de los cromosomas 8 (8q) y 17 (17q), que además están asociadas a un mayor potencial metastásico^{178, 179, 186}.

Patogénesis molecular de los GIST

Mutaciones de
c-KIT o *PDGFR α*

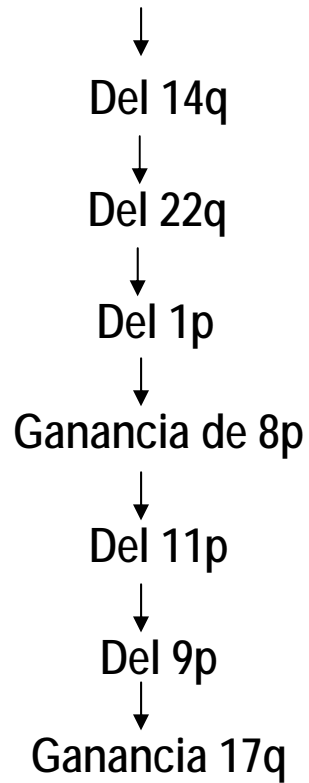


Figura 13: Modelo de progresión tumoral de los GIST.

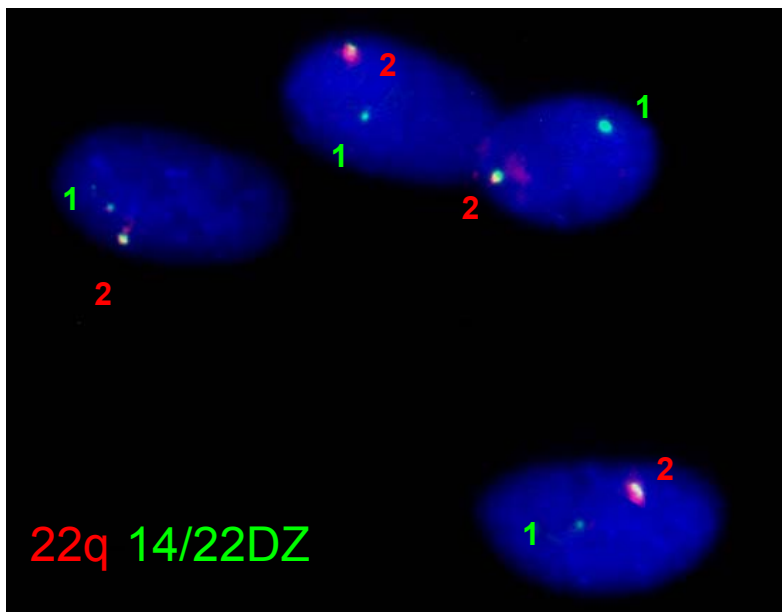


Figura 14: Imagen de un GIST por FISH con las monosomías de los cromosomas 14 y el 22. Imagen cedida por Dra. R.Noguera.

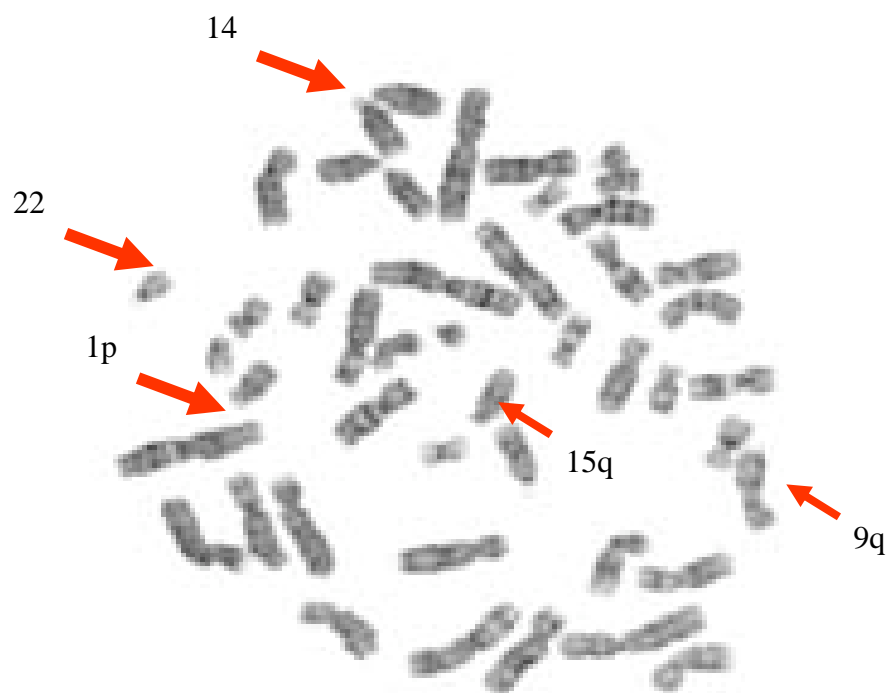


Figura 15: Pérdidas y ganancias cromosómicas características de un GIST.

II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

2.1- HIPÓTESIS

A la vista de los datos expuestos en la introducción se planteó la siguiente hipótesis de trabajo:

Los GIST son neoplasias mesenquimales que cuando son de alto riesgo o se presentan en estado avanzado tienen un pronóstico muy desfavorable. En el proceso de diagnóstico de dichos tumores se tienen en cuenta tanto los parámetros clínicos, como anatomopatológicos y moleculares; los cuales determinan a su vez el pronóstico de estos tumores. Para la caracterización exhaustiva clínico- patológica, inmunohistoquímica así como el estatus mutacional de *c-KIT* y *PDGFR α* puede ayudar a establecer un mejor manejo clínico y pronóstico de los GISTs.

2.2- OBJETIVOS DE TRABAJO

Los objetivos que nos marcamos con el presente estudio de investigación son los siguientes:

1. Describir las características clínicas e histopatológicas más habituales de los GISTs en dos series de casos: una serie actual (posterior a 1998) y otra serie histórica (previa a 1998).
2. Establecer el patrón de expresión inmunohistoquímica en todos los GISTs mediante el empleo de los siguientes marcadores: c-KIT, CD34, AML, sinaptofisina, S-100, PDGFR α , CD99, Ki-67, PGP 9.5, p53 y MDM2.
3. Correlacionar la expresión del marcador de proliferación celular Ki-67 y el número de mitosis y comprobar su validez como marcador diagnóstico en GISTs.
4. Estudiar el estatus de mutaciones en los genes *c-KIT* y *PDGFR α* .

5. Evaluar la posible implicación pronóstica de las mutaciones de *c-KIT* y *PDGFRA*, según el tipo de mutación y la localización de estas.
6. Determinar posibles diferencias clínico-patológicas e inmunohistoquímicas, entre los GIST con mutaciones en *c-KIT* o *PDGFRA* con los que no las presentan.
7. Determinar diferencias clínico-patológicas, inmunohistoquímicas y moleculares entre los GIST CD117 negativos de los que no.
8. Determinar diferencias clínico-patológicas, inmunohistoquímicas y moleculares entre los GIST tratados con Glivec de los que no.
9. Buscar las posibles relaciones entre los parámetros clínico- patológicos, inmunohistoquímicos y moleculares de los GISTs.
10. Determinar posibles factores pronósticos para la progresión y supervivencia de los GISTs tanto en los casos tratados con Glivec como en los no tratados.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 PACIENTES Y MUESTRAS

Se han recogido un total de 175 casos incluidos en parafina diagnosticados en el periodo comprendido entre los años 1985 y 2007. Una vez obtenido todo el material se ha llevado a cabo un completo estudio tanto histopatológico como mutacional. Del total de casos, 86 pertenecen al Hospital Clínico de Valencia, 24 casos son de la Fundación Instituto Valenciano de Oncología y 65 casos de consulta de hospitales externos.

Incluidos en la serie global, contamos con un grupo de 40 casos diagnosticados con anterioridad a 1998 cuando se demostró la implicación diagnóstica de *c-KIT* en estos tumores¹⁸⁷; por esa causa se planteo en muchos centros si aquellos casos diagnosticados como leiomiomas, leiomiosarcomas y leiomioblastomas localizados en el aparato digestivo no eran sino un GIST; por lo que quisimos reclasificarlos valiéndonos de una batería de anticuerpos característicos de los GIST y del estudio molecular de *c-KIT* y *PDGFR α* . Para su selección se revisaron aquellos casos diagnosticados entre 1984-1998 como leiomiomas, leiomioblastomas y leiomiosarcomas según su morfología celular y su localización, realizando una primera selección de los posibles GIST.

Todos los casos se encontraban incluidos en parafina, permitiendo realizar los cortes necesarios para el estudio inmunohistoquímico (secciones de parafina de tres micras) y el molecular (cinco secciones de 5 micras) (Fig.16). De manera complementaria a la parafina, el estudio molecular se ha podido realizar a partir de tejido tumoral en fresco en dos casos, 5 en cultivos celulares y uno en “nude” donde se ha confirmado el estado mutacional del tejido primario.

-Criterios de exclusión

Se excluyen aquellos casos de consulta de posibles GIST que han sido diagnosticados como otros tumores por no hallar ninguna mutación en *c-KIT* o *PDGFR α* como estudio complementario a una inmunohistoquímica dudosa

Los casos que finalmente no han sido diagnosticados pero que han seguido todo el procedimiento tanto a nivel de inmunohistoquímica como de biología molecular han sido utilizados como controles negativos de las técnicas desarrolladas.

Material y Métodos

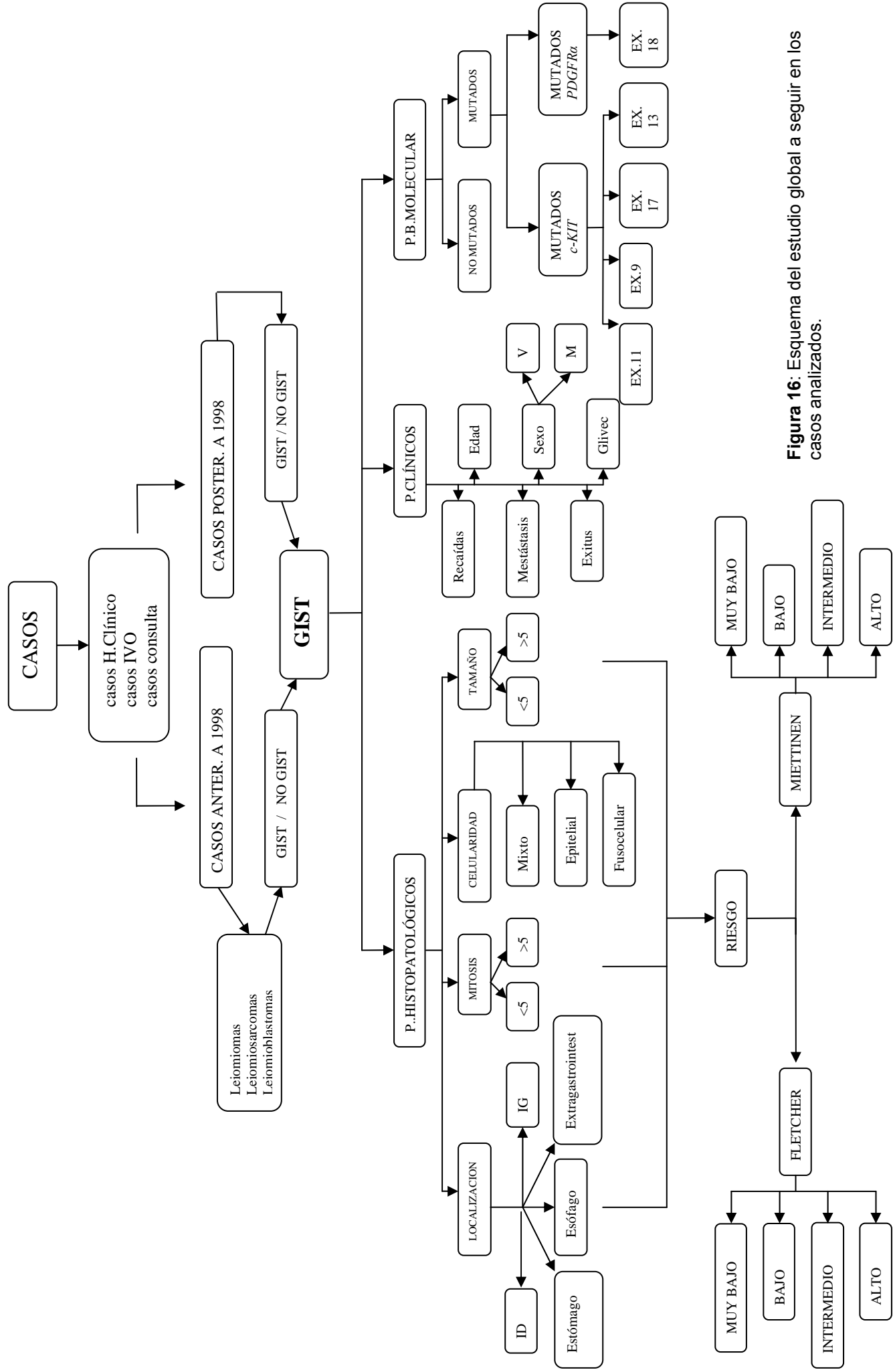


Figura 16: Esquema del estudio global a seguir en los casos analizados.

3.2-REVISIÓN CLÍNICO PATOLÓGICA DE LOS CASOS

El estudio clínico está basado en el análisis de las historias clínicas de los pacientes depositadas en el Archivo Central del Hospital Clínico Universitario de Valencia y en la Fundación Instituto Valenciano de Oncología, en aquellos casos en los que no se ha tenido acceso directo a la historia se ha hecho lo posible para recabar la mayor información posible. Se han valorado los parámetros referentes a la situación clínica del paciente y estudio anatomopatológico del tumor que a continuación describimos:

-**Sexo:** 1-Mujer; 2-Varón

-**Edad:** considerada en años el momento en que se emitió el informe anatomopatológico del tumor primario. Obtenida de la fecha de nacimiento y la fecha del diagnóstico.

-**Localización** del tumor: esófago, estómago, intestino delgado, intestino grueso, hígado y extragastrointestinal.

-**Tipo de tumor:** 1-primario; 2-recidiva local; 3-metástasis.

-**Tamaño** tumoral: en centímetros.

-**Celularidad del tumor:** epitelioide, fusocelular o mixto.

-Presencia de **pleomorfismo** o **necrosis**.

-**Recuento mitótico** según la clasificación de riesgo de Fletcher y Miettinen.

-**Diagnóstico:** patológico.

-Clasificación según los criterios de **riesgo** de **Fletcher** y **Miettinen**.

-Tratados con **Glivec** o no.

-**Cirugía** en aquellos casos en que no se ha podido realizar una extirpación completa del tumor se tiene en cuenta porque las recidivas son más frecuentes y tempranas en esos casos.

-Tiempo transcurrido hasta la primera recidiva o a las metástasis.

-**Intervalo libre de enfermedad (ILE):** se contabilizó en meses desde el diagnóstico anatomopatológico inicial hasta la confirmación histológica de una recidiva o hasta la finalización del seguimiento si no hubo recidiva tumoral.

-**Tiempo de seguimiento:** se contabilizó en meses desde el diagnóstico anatomo-patológico inicial hasta la última revisión.

-**Muerte a causa de enfermedad:** supervivencia global.

3.3- TÉCNICAS HISTOPATOLÓGICAS

El análisis histológico se realizó sobre muestras de tejido tumoral fijadas en formaldehído al 10% e incluidas en parafina. Se cortaron secciones de 3 µm en un microtomo y se montaron en portaobjetos con Poly-L-lisina para el estudio IHQ. Para el estudio morfológico, orientado al diagnóstico, se utilizaron técnicas convencionales de Hematoxilina-Eosina sobre cortes de parafina de 3 µm.

3.3.1-TINCIÓN DE HEMATOXILINA-EOSINA (HE).

La hematoxilina-eosina es la técnica de tinción histológica convencional, en la que se emplea la hematoxilina (Merck co) para teñir el núcleo de azul y la eosina (Merck co), colorante ácido que tiñe el citoplasma de rojo a rosa. Brevemente, el protocolo de la tinción que se ha seguido se detalla a continuación:

-Incubamos las muestras a 60°C aproximadamente 20 minutos antes de **desparafinar**, para que después sea más fácil la desparafinación que se realiza en xilol (Merck co) durante 5 min.

-Seguidamente, realizamos pases por etanol (Merck co) (90°/80°/70°) para **hidratar**, de 2 a 5 veces en cada uno. Una vez hidratadas las muestras, realizamos la tinción nuclear con Hematoxilina de Harris, 5 minutos y enjuagamos con agua destilada 2 minutos (en forma de zambullidas).

-Para **decolorar**, sumergimos las muestras en ácido clorhídrico al 0,5% (Merck co) (un pase rápido). Lavamos con agua corriente y luego con hidróxido de amonio (Merck co). Nuevamente realizamos un lavado rápido con agua corriente.

-Para la **tinción citoplasmática**, sumergimos las muestras en eosina durante 4 minutos y lavamos con agua corriente (inmersiones rápidas).

-**Deshidratamos** de nuevo con pases en etanol (70°/80°/90°), aproximadamente de 30 segundos cada uno. Finalmente aclaramos con xilol, 1 minuto.

-Para último, montamos con “entellan” y cubreobjeto y ya podemos **observar la laminilla** al microscopio.

3.3.2- ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO.

Las técnicas inmunohistoquímicas son técnicas de inmunolocalización de antígenos tisulares o celulares mediante su unión con anticuerpos específicos, que utilizan una enzima conjugada como trazador. Por este motivo, la reacción antígeno-anticuerpo se visualiza añadiendo al final de la reacción el sustrato de la enzima más una sustancia cromógena, lo que da lugar a un precipitado insoluble y coloreado. La enzima peroxidasa es el “trazador” más comúnmente utilizado y empleado en técnicas con anticuerpos marcados directa o indirectamente (Pardo-Mindán et al, 1997).

La técnica empleada en nuestros casos fue la técnica de avidina-biotina-immunoperoxidasa (ABC) (DAKO) con anticuerpos marcados indirectamente, en la que el anticuerpo secundario se une al primario que, a su vez, ya se ha unido al antígeno específico a estudio. La técnica ABC o complejo de avidina-biotina-peroxidasa, desarrollada por Hsu et al en 1981¹⁸⁸, introduce una forma hipersensible para amplificar la señal de la reacción, sobre todo cuando los antígenos se encuentran en tejidos en parafina.

Para el estudio inmunohistoquímico, cada muestra se procesa con el método ABC con algunas modificaciones para los diferentes marcadores inmunohistoquímicos utilizados (Tabla 5). A continuación se detalla el procedimiento seguido:

- Las muestras se **desparafinan** calentándolas durante 12 a 24 horas a 37°C y 45 min. en una estufa a 60°C. A continuación se sumergen en Xilol durante 15 min. a temperatura ambiente (pases de 5 min.).

- Tras esta incubación, las muestras se **hidratan** con alcoholes de concentración decreciente (90-80-70%) y posteriormente se lavan con agua. Se realiza un pretratamiento de recuperación antigénica introduciendo las secciones en una solución tampón específica (tampón citrato 10X, DAKO) y después en un autoclave (microclave selecta) hasta una presión atmosférica de 1,5 atmósferas durante cinco minutos. A continuación se llevan acabo una descompresión y enfriamiento lento de los preparados.

- Con objeto de **inhibir la peroxidasa endógena**, las muestras se sumergen en una solución de agua oxigenada (97 volúmenes de metanol al 2% y 3 volúmenes de agua oxigenada) a temperatura ambiente durante 30min.

-Seguidamente, se **bloquea la colágena tisular** para evitar la unión de las inmunoglobulinas al estroma con suero de caballo (Gibco) al 20% durante 20min.

- Se voltean los preparados y se le añade el **Ac primario** durante 45 min.- 60min. a temperatura ambiente (dependiendo del anticuerpo).

- Las secciones histológicas se lavan 3 veces con tampón fosfato (PBS) (Cloruro de Sodio, Cloruro Potásico, 2 H₂O hidrogenofosfato de di- Sodio, dihidrogenofosfato de Potasio) (Gibco) y se incuba seguidamente con el **anticuerpo secundario** durante 30 min, empleando el sistema LSAB-2 de DAKO, cuya **solución 1** está constituida por una mezcla de anticuerpos monoclonales "anti-mouse" y policlonales anti-rabbit biotinilados.

- A continuación, se lleva a cabo 3 lavados con PBS y se añade el **complejo avidina-biotina (solución 2** del sistema LSAB-2 de DAKO) durante 30 minutos (este complejo se prepara con 30 min. de antelación).

- Seguidamente, se vuelven a lavar las preparaciones 3 veces con PBS y se procede al **revelado** de la reacción mediante una solución de *diaminobenzidina tetrahidroclorídrica* (DAB) (Sigma) en un tampón de *trisclorhídrico* 0,2 M hasta un ph=7. Una vez ajustado el pH se añade la DAB y por último el agua oxigenada pura de 110 volúmenes (para 100ml de Tris se utilizan 75 mg de DAB y 50 microlitros de agua oxigenada). Durante el revelado, las preparaciones se protegen de la luz, metiéndolas en la estufa de 37°C durante 5 min, y al finalizar el revelado se lava con agua corriente.

- Se contrastan los núcleos con **hematoxilina de Harris** durante **30 segundos**, se deshidratan los cortes con alcoholes crecientes (70%-80%-90%) y finalmente se realizan varios pasos en xilol y se montan los cubreobjetos (Menzel-Glaser) con "entellan" (Merck co).

3.3.3- EVALUACIÓN HISTOPATOLÓGICA

Los casos de rutina han sido evaluados por los patólogos del departamento y los de consulta externa o de las matrices tisulares se evaluaron por un patólogo experimentado (ALLB) y siendo analizadas también por la autora.

Las variables histológicas analizadas para cada tumor se informan en función de los siguientes criterios:

- El **índice mitótico** se realiza según recomienda la OMS seleccionando cincuenta campos al azar a 40X.
- Necrosis** (considerada como una variable dicotómica: presencia o ausencia).
- Pleomorfismo** (presencia o ausencia).
- Tipo celular** predominante (fusocelular, epitelioide o mixto).
- La **inmunoreactividad** para los distintos marcadores incluidos en el estudio (Tabla 8).

En general, el porcentaje de células neoplásicas o normales con reactividad fue estimado mediante una escala semicuantitativa como se describe a continuación (Tabla 7):

Tabla 7: Escala semicuantitativa para determinar la expresión de los marcadores HIQ.

Negativo:	< del 5% de células reactivas.
+:	de 5% a <25% de células reactivas.
++:	de 25% a 50% de células reactivas.
+++:	> del 50% de células reactivas.

TABLA 8: Anticuerpos utilizados en el estudio Inmunohistoquímico, con las diluciones utilizadas, la clonalidad de los mismos, localización del antígeno y casa comercial.

ANTIGENO	MONOCLONAL/ POLICLONAL	CLON	DILUCION	LOCALIZACIÓN DEL AG	AG RETROVIAL	CASA COMERCIAL
c-KIT	Policlonal	-	1/400	Membrana	SI*	Dako Corporation.
KI-67	Monoclonal	MIB-1	1/50	Nuclear	SI*	Dako Corporation.
MDM2	Monoclonal	1B10	1/50	Nuclear	SI*	Novocastra
Cromogranina	Monoclonal	DAK-A3	1/50	Citoplasmática	SI*	Dako Corporation.
CD99	Monoclonal	HO36-1.1	1/50	Citoplasmática	SI*	Dako Corporation.
CD34	Monoclonal	Qbend-10	1/50	Citoplasmática	SI*	Dako Corporation.
Sinaptofisina	Monoclonal	SY38	1/20	Citoplasmática	SI*	Dako Corporation.
Vimentina	Monoclonal	V9	1/200	Citoplasmática	NO	Novocastra
P53	Monoclonal	DO-7	1/400	Citoplasmática	SI*	Dako Corporation.
AML	Monoclonal	1A4	1/2	Citoplasmática	SI*	Dako Corporation.
Desmina	Monoclonal	D33	1/2	Citoplasmática	SI*	Dako Corporation.
S-100	Policlonal	-	1/2	Nuclear	NO	Dako Corporation.
PDGFR α	Policlonal	-	1/200	Membrana	SI*	Santa Cruz Biot.

Además todos los casos han sido clasificados según el riesgo histológico siguiendo los criterios de Fletcher ³⁸ (mitosis y tamaño) o Miettinen ¹⁰² que incluye además la localización (Tablas 9 y 10):

Tabla 9: Clasificación del riesgo histológico según los criterios de Fletcher.

Índice mitótico	Tamaño	Riesgo histológico
≤ 5 MITOSIS	≤2 cm.	Muy bajo riesgo
≤ 5 MITOSIS	>2 ≤5 cm.	Bajo riesgo
6-10 por 50 HPF <5 por 50HPF	≤5 cm. >5 ≤10 cm.	Moderado
>5 por 50HPF cualquier cantidad mitosis > 10 por 50HPF	>5cm. >10cm. cualquier medida	Alto riesgo

Tabla 10: Clasificación del riesgo histológico según los criterios de Miettinen.

Índice mitótico	Tamaño	Estómago	Intestino delgado	Intestino grueso	Otras localizaciones
≤ 5 MITOSIS	≤2 cm.	Muy bajo riesgo	Muy bajo riesgo	Muy bajo riesgo	Muy bajo riesgo
	>2 ≤5 cm.	Muy bajo riesgo	Bajo riesgo	Bajo riesgo	Bajo riesgo
	>5 ≤10 cm.	Bajo riesgo	Moderado	Moderado	Moderado
	>10 cm.	Moderado	Alto riesgo	Alto riesgo	Alto riesgo
>5 MITOSIS	≤2 cm.	Bajo riesgo	Alto riesgo	Alto riesgo	Alto riesgo
	>2 ≤5 cm.	Moderado	Alto riesgo	Alto riesgo	Alto riesgo
	>5 ≤10 cm.	Alto riesgo	Alto riesgo	Alto riesgo	Alto riesgo
	>10 cm.	Alto riesgo	Alto riesgo	Alto riesgo	Alto riesgo

3.3.4- MICROMATRICES TISULARES.

Para el estudio retrospectivo de los 39 casos diagnosticados anteriormente a 1998, se utilizaron matrices tisulares que ofrecen la ventaja de poder estudiar a la vez varias muestras de tumor con un alto nivel de estandarización. Además, se requieren pequeñas cantidades de reactivos, mínimo personal de laboratorio y por consiguiente muy importante, es un método que optimiza la eficacia y coste efectivo (Fig.17).

Este método consiste en colocar cuidadosamente, en forma de cilindros de tejido tumoral, un número elevado de casos en un único bloque de parafina, de manera simultánea, permitiendo así el procesamiento de todas las muestras bajo las mismas condiciones técnicas¹⁸⁹; Shergill y cols.¹⁹⁰.

Para el presente estudio, construimos 2 micromatrices tisulares incluyendo todos los casos retrospectivos; eligiendo en aquellos casos en los que ha sido posible dos zonas tumorales diferentes del bloque para una mejor valoración.

Protocolo para la construcción de las micromatrices tisulares.

Una vez preparado el material así como la puesta a punto de las medidas en los ejes X e Y en la matriz tisular (MTA-1 *Manual Tissue Arrayer*, Beecher Instruments, USA) utilizado para la construcción de micromatrices, procedimos a la construcción de las mismas siguiendo los pasos que a continuación describimos:

1-Recogida de bloques y preparaciones: Previo a la construcción de la micromatriz tisular, se recogieron 39 bloques y se realizó una hematoxilina-eosina de cada bloque para comprobar la existencia de tumor y así seleccionar dos áreas representativas del mismo. A continuación, enfrentamos el porta de hematoxilina con el bloque correspondiente, para identificar la misma área señalada previamente.

2-Diseño de la matriz: se realizaron 2 matrices tisulares con los casos retrospectivos a estudiar y un control de reactividad conocida (tumor renal). El diámetro de cada cilindro en nuestro estudio fue de 0,5 mm. Confeccionamos

una plantilla en el ordenador, identificando la posición exacta de cada muestra en la matriz.

3-Construcción de la matriz: antes de empezar a introducir los cilindros de las diferentes tumores a estudiar alisamos la superficie del bloque receptor, desgastando un poco la parafina en el microtomo para que así todos los cilindros tengan el mismo ángulo. Colocamos el bloque receptor en la base del instrumento y lo aseguramos correctamente. Elegimos el juego de agujas apropiado, en este caso de 1 mm de diámetro. Situamos a la izquierda la más gruesa que toma el cilindro de tejido del bloque donador y, a la derecha, la que hará el agujero en el bloque receptor. Ajustamos a cero los micrómetros que marcan la alineación de las filas y columnas de los cilindros, como se indicó previamente. Hicimos primero el agujero en el bloque receptor, rotando el émbolo de aguja para profundizar, aproximadamente 3 mm. A continuación colocamos el bloque de tejido donador sobre el puente, cambiamos de aguja y tomamos el tejido tumoral marcado. Retiramos el puente con el bloque donador y expulsamos el cilindro de tejido exactamente encima del agujero hecho en la parafina, sin hundirlo. Ponemos encima del hueco un portaobjetos para alisar la superficie del cilindro y nivelarla con la parafina. Cambiamos la medida del micrómetro a la siguiente posición para hacer el agujero con la aguja respectiva. Comenzamos poniendo el tejido que servirá de testigo de acuerdo con la ubicación en la plantilla. Así sucesivamente hasta agotar todos los casos.

4- Una vez **finalizada** la construcción de la micromatriz tisular, llevamos el bloque receptor de parafina a la estufa de 37° C durante 24 horas, para que la parafina de los cilindros de tejido se adhiera mejor a la parafina del bloque receptor (Fig.16).

5- Se realizaron cortes de 3 micras **de cada micromatriz** tisular y fueron recogidos en portas con poli-lisina (DAKO) para su posterior tinción con HE y pruebas de inmunohistoquímica. Una vez realizados todos los cortes necesarios se protegieron las micromatrices titulares con un cristal portaobjetos con los cortes realizados.

De cada micromatriz tisular se tiñó un corte con H-E y se realizó el estudio IHQ previsto en el protocolo de GIST según se describió con anterioridad (Fig.18).

En su evaluación posterior a la hora de un conteo celular se consideró el diámetro del disco tumoral como un todo (100%). La positividad frente a cada anticuerpo se estableció cuando se observó tinción marrón a nivel del compartimiento específico o diana para cada anticuerpo: nuclear, citoplasmática o membranosa, como se indica en la tabla para cada marcador, en las células tumorales, pudiendo utilizar en la mayoría de casos la celularidad no tumoral como control interno positivo.

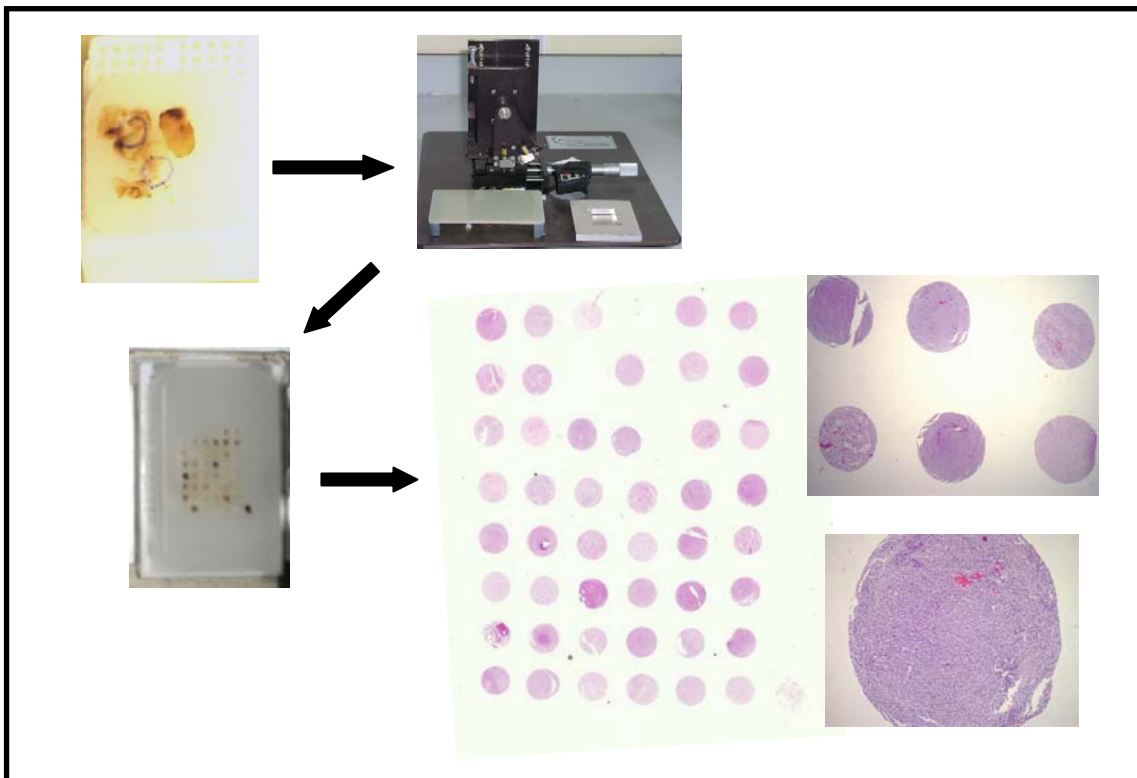


Figura 17: Esquema ilustrativo de la selección del área tumoral más representativa en el bloque de parafina, para la obtención de uno o varios cilindros y la posterior construcción de la matriz tisular con el "tissue arrayer".

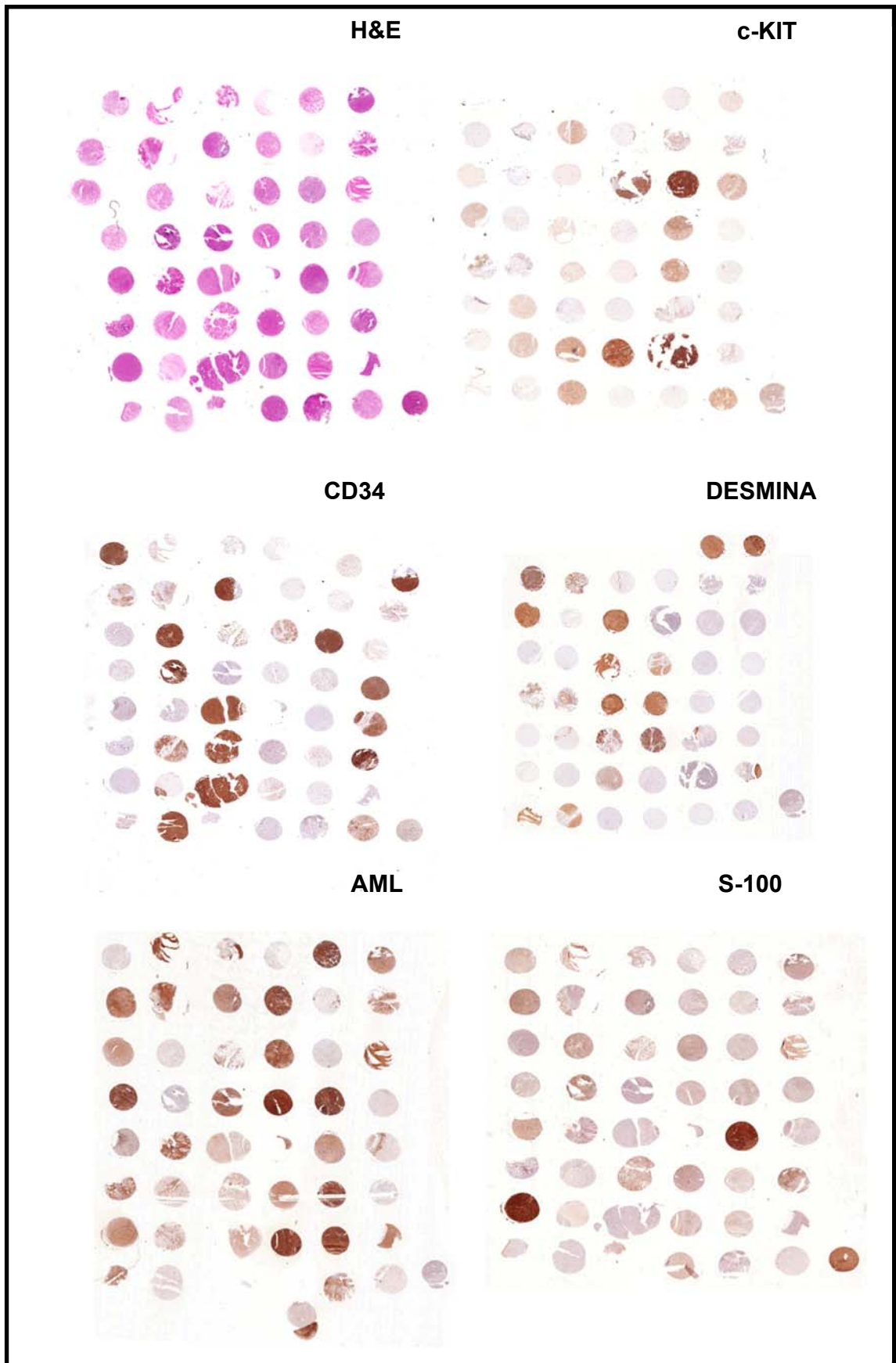


Figura 18: Representación de la positividad de los casos en la micromatriz para los diferentes marcadores empleados.

3.4-ESTUDIO DE BIOLOGIA MOLECULAR

Para nuestro estudio necesitamos extraer ADN de los tejidos fijados e incluidos en parafina para poder posteriormente realizar la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posterior secuenciación de los productos obtenidos (Fig.19).



Figura 19. Esquema de los diferentes pasos a seguir en el análisis de biología molecular. Para nuestro estudio necesitamos extraer ADN de los tejidos fijados e incluidos en parafina para poder posteriormente realizar la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posterior secuenciación de los productos obtenidos.

3.4.1- EXTRACCIÓN DE ADN

-Para extraer el ADN de las muestras partimos de 5 secciones de 5µm. que se colocan en un tubo eppendorf estéril de 1,5ml. En primer lugar, hemos de **desparafinar** las muestras añadiendo 1ml de xilol e incubamos, con agitación ocasional, durante 10-20 minutos a temperatura ambiente, con el fin de disolver la parafina. Seguidamente centrifugaremos a 13.400 r.p.m durante 10 minutos, eliminamos el xilol con la parafina (sobrenadante); y volvemos a repetir el paso de nuevo. Una vez eliminada la parafina realizamos unos lavados con 500 µl etanol absoluto durante 1 minuto, agitando por inversión varias veces y centrifugamos durante 10 minutos a 13.400 r.p.m para poder así fácilmente eliminar el etanol y dejar el sedimento con el tejido ya desparafinado. Para eliminar el exceso de etanol dejamos secar el sedimento tisular en una estufa a 37°C durante 10 minutos.

-Una vez obtenemos el tejido hemos de proceder a la **extracción** del ADN de las células. Para ello resuspendemos el pellet en 500 µl de solución de lisis (SDS 0.5%, Tris HCl 10mM pH8, NaCl 0.15M, EDTA 5mM) y 25 µl de proteinasa K (Proteinase K (Fungal), 0.5 mg/ml, Invitrogen; Cat No.25530-015) e incubamos durante toda la noche a 55°C en un baño de agua. Así conseguiremos que las células se lisen y obtener el DNA, pero junto a RNA, proteínas y restos de tejido ¹⁹¹.

-Pasada la noche, pasamos a **purificar** el ADN de los restos celulares añadiendo 500 µl de fenol (Phenol, P-4682, Molecular Sigma Biology) equilibrado con Tris-HCl ph 8, en agitación ocasional durante 20 minutos; así conseguimos precipitar las proteínas y restos tisulares. Para poder separar las dos fracciones centrifugamos durante 15 minutos a 13400 r.p.m y recogemos la fase acuosa superior en otro tubo perfectamente rotulado. Seguidamente añadimos un volumen igual de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y dejamos actuar durante 1 hora para que precipite el ARN, resto de proteínas y grasas, este punto es crítico para obtener un ADN puro. Una vez pasada la hora centrifugamos a máxima velocidad durante 10 min. Recogemos la fase acuosa y añadimos un volumen igual de cloroformo/alcohol isoamílico durante

30 minutos y volvemos a centrifugar para recoger la fase acuosa superior donde se encuentra el ADN diluido.

-Por lo que a continuación procedemos a **precipitarlo** con 0.1 volúmenes de AcNa 3M pH 5.2 y 2 volúmenes de etanol absoluto frío durante toda la noche a -20°C. Al día siguiente centrifugamos 45 minutos a 13400 r.p.m y si se obtiene una cantidad adecuada se puede visualizar un pequeño pellet de ADN al final del tubo. Lavamos el precipitado (pellet) con etanol 70% frío y volvemos a centrifugar durante 20 minutos a 13400 r.p.m. Secamos el pellet 10 minutos en la estufa a 37°C para que se evapore el etanol que podría interferir en la amplificación del producto y resuspendemos el pellet con agua bidestilada con la cantidad adecuada según el tamaño del pellet (5-30µl). Hasta la utilización del ADN lo almacenamos a -20°C.

En muchos de los casos del estudio retrospectivo con el aislamiento de ADN convencional no obtuvimos prácticamente material por lo que se planteo cortes de 10 micras por dos para aumentar la cantidad de material y utilizar el kit de extracción: QIAamp DNA FFPE Tissue Kit; Cat. No.56404 (Quiagen). El procedimiento seguido es:

-En primer lugar se lleva a cabo una **desparafinación** tal y como se ha descrito anteriormente.

- Seguidamente, resuspendemos el sedimento en 180 µl del Buffer ATL y 20 µl de Proteinasa K, vortexamos para que se mezcle bien e introducimos las muestras en un baño de agua a incubar a 56°C hasta que el tejido este completamente **lisado**. Es recomendable vortexar durante la incubación para dispersar la muestra y acelerar el proceso de digestión.

-Una vez, esta el tejido digerido añadimos 200 µl de tampón AL, vortexamos y seguidamente, lo ponemos a incubar a 70°C durante 10 minutos (para **desactivar** la **proteínasa**), centrifugamos a máxima velocidad y pasamos al siguiente paso.

-Añadimos 200 µl etanol 100%; vortexamos durante 15 segundos y seguidamente, un centrifugado rápido a alta revolución para **precipitar**. Introducimos toda la muestra (incluso el precipitado, si lo hubiera) en una columna proporcionada por el kit con un tubo de 2 ml. Cerramos la columna y

centrifugamos a baja velocidad (8000rpm) 1 minuto. (la columna debe quedar vacía; si no, repetir la centrifugación)

-Pasamos la columna QIAamp a un tubo de 2 ml. limpio y estéril y procedemos a una serie de **lavados** con 500 µl de tampón AW1, volvemos a repetir la misma operación de centrifugar.

Pasamos de nuevo, la columna QIAamp a otro tubo de 2 ml y añadimos el segundo tampón (la función de estos tampones es purificar el DNA), 500 µl de AW2 y centrifugar a alta velocidad, 3 minutos.

-Para la obtención del ADN, finalmente introducimos la columna QIAamp en un eppendorf nuevo rotulado debidamente y añadimos 60µl de agua precalentada a 70°C que dejamos reposar durante 5 min, para facilitar así una mayor dilución del ADN. Posteriormente centrifugamos a baja velocidad, 1 minuto; de este modo obtenemos el ADN para realizar las reacciones de amplificación correspondientes, tal y como se especifica en el apartado siguiente.

3.4.2-REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA DE *c-KIT* Y *PDGFRα*

Para la reacción en cadena de la polimerasa se necesitan una serie de componentes entre los que se encuentran los iniciadores (primer o cebador, son 15-20 nucleótidos complementarios a la región que se quiere estudiar, acotándola en el principio y el final), los dNTPs (desoxinucleótidos trifosfato) son los cuatro nucleótidos que componen el genoma humano (guanina, citosina, timina y adenina) que se irán incorporando a la cadena de ADN de nueva síntesis; un tampón optimizado para la enzima; de Cl_2Mg que es un cofactor requerido por la enzima, y asimismo, favorece la estabilidad de los dúplex ADN-ADN y el enzima que es una Taq polimerasa estable que será la responsable de la síntesis de millones de copias del fragmento de ADN que queremos estudiar.

Para nuestro estudio realizamos la amplificación de aquellos exones de *c-KIT* y *PDGFRα* que se encuentran mutados con mayor frecuencia. Entre estos se encuentran los exones 11, 9, 13⁴² y 17¹⁴⁷ de *c-KIT* y los exón 12 y 18²² de *PDGFRα*. Para el exón 11 y el exón 9 de *c-KIT* se realiza una anidada-PCR,

para poder tener una mayor sensibilidad de detección de las mutaciones; realizamos una primera PCR cuyo producto es de más de 400 pares de bases, seguida de una PCR anidada que arroja un producto de 200 pares de bases; de esta manera conseguimos una mayor sensibilidad para detectar las mutaciones en estos dos exones que es donde se concentran un mayor porcentaje de mutaciones. Las secuencias de los cebadores empleados, el tamaño del producto de PCR y las condiciones de la PCR se pueden observar en la tabla 11.

Para los exones 13 y 17 se realiza una única amplificación en un volumen de 50 μ l con la temperatura de unión a 56 °C a diferencia de los exones 12 y 18 que se produce la unión a 65 °C pero para todos ellos las cantidades empleadas en la PCR son las mismas. Las PCRs se realizan en un volumen de 50 microlitros (excepto la primera PCR de la "nested" (anidada) que es a 25 μ l para realizar posteriormente la 2ª PCR a 50 μ l), con los siguientes reactivos: 2 μ l ADN, 50mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH 8.3, 2mM MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP, 0.2 μ M para cada primer y dos unidades de Amplitaq Gold (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA). Las muestras se introducen en un termociclador GeneAmp® PCR system 2700, Applied Biosystem; se precalientan en un paso inicial de 95°C

durante 10min; una amplificación con 36 ciclos de un minuto de desnaturalización a 94°C, un minuto y medio de unión a 56°C para los cebadores de *c-KIT* y a 65°C dos minutos para los cebadores de *PDGFR α* , y un minuto de extensión a 72°C; además se realiza una extensión final de 10 minutos a 72°C.

Tanto los exones de *c-KIT* como *PDGFR α* , utilizados en nuestras PCRs, acotan la región de yuxtamembrana y los dominios tirosina quinasa, donde se producen la gran mayoría de mutaciones de estos genes. (Tabla 12) (Fig.20).

Tabla 11: Cebadores utilizados en el estudio mutacional y el tamaño de amplificación obtenido.

PRIMER	SECUENCIAS	MEDIDA
<i>c-KIT</i> exón 9	Forward: 5'-TCCTAGAGTAAGCCAGGGCTT-3' Reverse: 5'-TGGTAGACAGAGCCTAAACATCC-3'	283 pb.
<i>c-KIT</i> exón 9 anidada	Forward: 5'-AGCCAGGGCTTTTGTCTTCT -3' Reverse: 5'-CAGAGCCTAAACATCCCCTTA -3'	189pb
<i>c-KIT</i> exón11	Forward: 5'-CCTTTGCTGATTGGTTTCGT-3' Reverse: 5'-AAACAAAGGAAGCCACTGGA-3'	389pb.
<i>c-KIT</i> exón 11 anidada	Forward: 5'-CCAGAGTGCTCTAATGACTG -3' Reverse: 5'-ACCCAAAAGGTGACATGGA -3'	215pb
<i>c-KIT</i> exón 13	Forward: 5'-GCTTGACATCAGTTTGCCAG-3' Reverse: 5'-AAAGGCAGCTTGGACACGGCTTTA-3'	193 pb.
<i>c-KIT</i> exón 17	Forward: 5'-GGTTTTCTTTTCTCCTCCAACC-3' Reverse: 5'-GATTACATTATGAAAGTCACAGG-3'	203 pb.
<i>PDGFRα</i> 12	Forward: 5'-TCCAGTCACTGTGCTGCTTC-3' Reverse: 5'-GCAAGGGAAAAGGGAGTCTT-3'	260 pb.
<i>PDGFRα</i> 18	Forward: 5'-ACCATGGATCAGCCAGTCTT-3' Reverse: 5'-TGAAGGAGGATGAGCCTGACC-3'	251 pb.

Tabla 12: Condiciones para las amplificaciones de los exones estudiados en el análisis mutacional.

CONDICIONES PARA <i>c-KIT</i> (11 Y 9)			CONDICIONES PARA <i>c-KIT</i> (anidada 11, 9)		
T ^a °C	Tiempo	Ciclos	T ^a °C	Tiempo	Ciclos
94	10' (desnaturalización inicial)		94	10' (desnaturalización inicial)	
94	1'(desnaturalización)	36	94	1'(desnaturalización)	12
53	1'(cebado)		56	1'30" (cebado)	
72	1' (elongación)		72	1' (elongación)	
72	10' (extensión final)		72	10' (extensión final)	
CONDICIONES PARA <i>c-KIT</i> (13, 17)			CONDICIONES PARA <i>PDGFRα</i> (12, 18)		
T ^a °C	Tiempo	Ciclos	T ^a °C	Tiempo	Ciclos
94	10' (desnaturalización inicial)		94	10' (desnaturalización inicial)	
94	1'(desnaturalización)	36	94	1'(desnaturalización)	40
56	1'30"(cebado)		65	1'30" (cebado)	
72	1' (elongación)		72	1' (elongación)	
72	10' (extensión final)		72	10' (extensión final)	

SECUENCIAS DE c-KIT

Exón 9:

aagatgccacatcccaagtgtttatgtatttattttcctagagtaagccagggttttggttttcctcccttag
 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 489 490 491 492 493 494 495 496
 A TGC TCT GCT TCT GTA CTG CCA GTG GAT GTG CAG ACA CTA AAC TCA TCT GGG CCA CCG GTT GAA TGT AAG GCT TAC AAC GAT
 C S A S V L P V D V Q T L N S S G P P V E C K A Y N D
 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513
 GTG GGC AAG ACT TCT GCC TAT TTT AAC TTT GCA TTT AAA GGT AAC AAC AAA G
 V G K T S A Y F N F A F K G N N K
 Tataattcttttaattccaatttaaggggatgttttaggctctgtctaccatcatcagtcatgatatttaagttcattccaacattgacca

Exón 11:

accatttattgtttctctcctccagagtgcttaataatgactgagacaataattataaaagtgatctattttccctttctccccacag
 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577
 AAA CCC ATG TAT GAA GTA CAG TGG AAG GTT GTT GAG GAG ATA AAT GGA AAC AAT TAT GTT TAC ATA GAC CCA ACA CAA CTT CCT
 K P M Y E V Q W K V E I N G N Y V Y I D P T Q L P
 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591
 TAT GAT CAC AAA TGG GAG TTT CCC AGA AAC AGG CTG AGT TTT G
 Y D H K W E F P R N R L S F
 gtccagtatgaaacaggggtttccatgtccacctttttgggtacacataaacagtgactttaaggaactccagtggttccctttgtttttg

Exón 13:

gtaagttcctgtatgggtactgcatgcgcttgacatcagtttgccagttgtgctttttgctaaaaatgcatgtttcccaatttttag
 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654
 CG AGT GCC CAT TTG ACA GAA CCG GAA GCC CTC ATG TCT GAA CTC AAA GTC CTG AGT TAC CTT GGT AAT CAC ATG AAT ATT GTG
 P S A H L T E R E A L M S E L K V L S Y L G N H M N I V
 655 656 657 658 659 660 661 662 663
 AAT CTA CTT GGA GCC TGC ACC ATT GGA G
 N L L G A C T I G
 Gtaaagccgtgtcccaagctgcctttttattgtctgtcaggttatcaaaaacatgacatttttaatatgatttttggcaatgctagattataa

Exón 17:

gcaactatagatataaaaagtttagtttcaactctttacaagttaaaatgaatttaaatggtttttctctccccaacctaataag
 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815
 TGT ATT CAC AGA GAC TTG GCA GCC AGA AAT ATC CTC CTT ACT CAT GGT CGG ATC ACA AAG ATT TGT GAT TTT GGT CTA GCC AGA
 C I H R D L A A R N I L L T H G R I T K I C D F G L A R
 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828
 GAC ATC AAG AAT GAT TCT AAT TAT GTG GTT AAA GGA AAC
 D I K N D S N Y V V K G N
 gtgagtaccattctctgcttgacagtcctgcaaggatttttagtttcaactttcgataaaaaattgtttcctgtgattttcataaatg

SECUENCIAS DE PDGFR α

Exón 12:

tggacttactgtgtccagtcactgtgctgtgcttcagtgaaagctctggtgcactgggactttggtaattcaccagttacctgtcctggtcattatag
 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575
 576 577 578 579
 AAA CCG AGG TAT GAA ATT CGC TGG AGG GTC ATT GAA TCA ATC AGC CCA GAT GGA CAT GAA TAT ATT TAT GTG
 GAC CCG ATG CAG
 K P R Y E I R W R V I E S I S P D G H E Y I Y V D
 P M Q
 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595
 CTG CCT TAT GAC TCA AGA TGG GAG TTT CCA AGA GAT GGA CTA GTG CTT G
 L P Y D S R W E F P R D G L V L
 gtaagtccatggggtaacctcccagaactcccctttcccttggcacacaactttacaatttataggccttggcagaatagagatctgagcttgct

Exón 18:

ctccaagtgccaccatggatcagccagtccttgcaggggtgatgctattcagctacagatggcttgatccctgagtcatttcttccctttccatgacag
 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837
 838 839 840 841
 TGT GTC CAC CGT GAT CTG GCT GCT CGC AAC GTC CTC CTG GCA CAA GGA AAA ATT GTG AAG ATC TGT GAC TTT
 GGC CTG GCC AGA
 C V H R D L A A R N V L L A Q G K I V K I C D F G L A R
 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854
 GAC ATC ATG CAT GAT TCG AAC TAT GTG TCG AAA GGC AGT
 D I M H D S N Y V S K G S
 Gtacgtcctcacttccctcactggtcaggctcatcctccttcaactttaatctctctaaagtcagggtgttgct

Figura 20: Secuencias de los diferentes exones de *c-KIT* y *PDGFR α* estudiados, las letras en minúscula son el intrón con el primer subrayado, los exones (letras en mayúscula y rojas) se encuentran agrupados en tripletes numerados en triplete numerados para dar lugar al aminoácido correspondiente (letras azules

3.4.3- POLIMORFISMO CONFORMACIONAL DE ADN DE CADENA SIMPLE (SSCP)

En un primer momento, se secuenciaba siempre el exón 11 de *c-KIT* que es el que se encuentra mutado en un mayor número y con el resto de exones se realizaba un primer cribaje para las posibles mutaciones.

Este método es rápido, sensible y de gran utilidad para detectar cambios en las secuencias del ADN, lo que ayuda a descartar los casos que mantienen intacta la estructura del gen *c-KIT* y *PDGFR α* , y seleccionar aquellos con cambios conformacionales para posterior secuenciación de los casos que sí presentan mutaciones. Debido a que se quería obtener la máxima fiabilidad en cuanto a las mutaciones halladas, se procedió a secuenciar todos los exones directamente sin realizar este procedimiento.

El método consiste en separar las dos cadenas del ADN amplificado y mediante electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturizante, se llevará a cabo la movilidad electroforética del fragmento amplificado dependiendo de su tamaño (aunque sólo sea un nucleótido) y su carga. En los casos en que se presenten mutaciones, se observarán bandas de movilidad anómala (Fig.20).

Método

1. Montar el sistema de electroforesis vertical, limpiar las placas de cristal y los separadores con metanol-KOH, agua corriente, agua destilada y etanol. Dejar secar al aire.
2. Preparar el gel de poliacrilamida al porcentaje adecuado, dependiendo del exón en estudio. Verter la poliacrilamida en el molde y dejar polimerizar durante 1 hora.
3. Preparar las muestras para cargar: 5 μ l de ADN amplificado + 15 μ l de tampón de electroforesis + 10 μ l de TBE 5X. Cargar las muestras en los pocillos y realizar la electroforesis a 125 V, durante 15 horas a temperatura ambiente.
4. Retirar el gel y realizar una tinción de plata para visualizar las bandas de ADN (Kit Bio Rad Cat# 161-1443). Parar la tinción se necesita ácido acético al 5% y fotografiar el gel en transiluminador de luz visible.

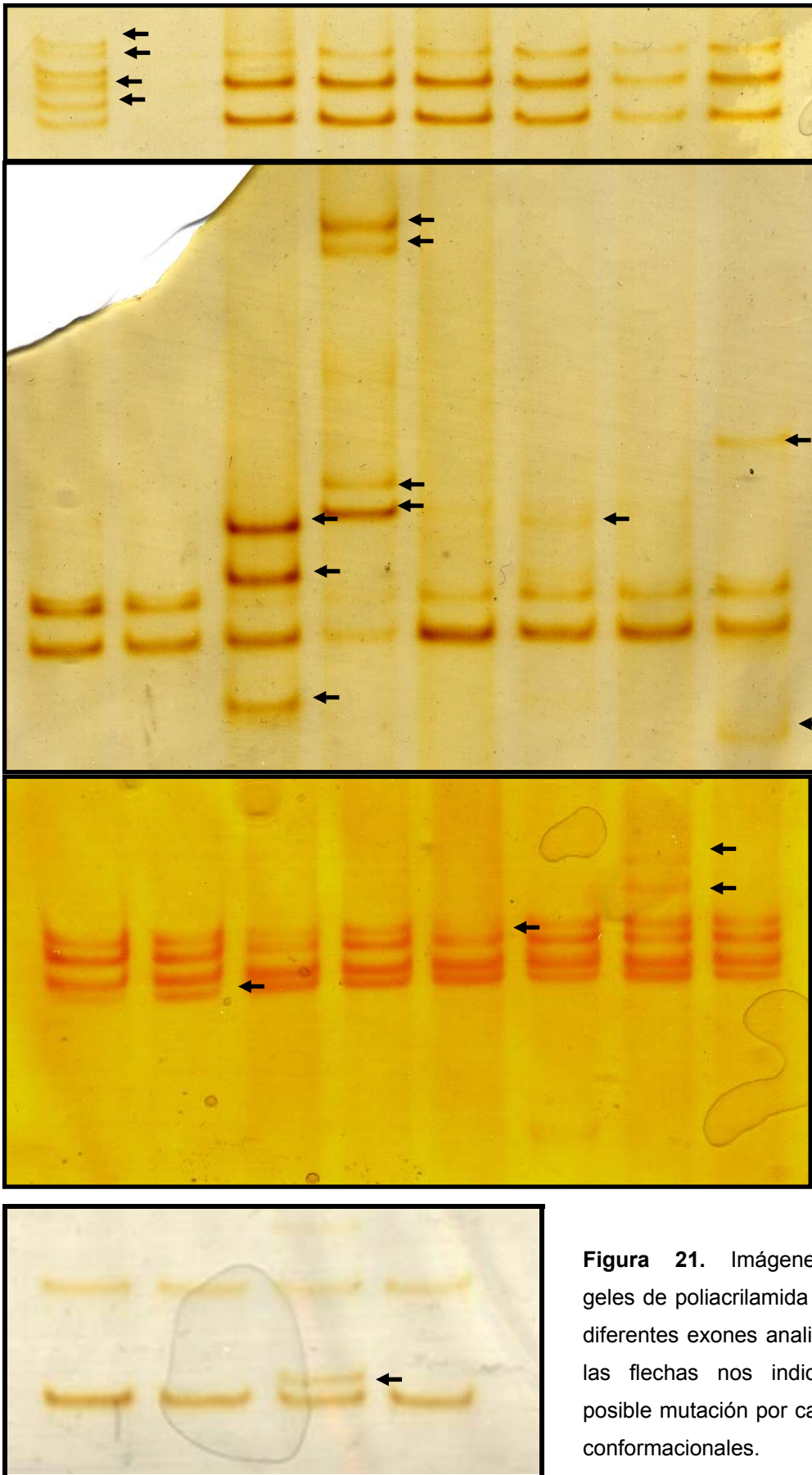


Figura 21. Imágenes de geles de poliacrilamida de los diferentes exones analizados, las flechas nos indican la posible mutación por cambios conformacionales.

3.4.4-ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

Tras la amplificación por PCR, realizamos la electroforesis de los productos amplificados (10 μ l del producto de la PCR más 2 μ l de tampón de carga), en un gel de agarosa al 1,5 % (Life Technologies, Paisley, Scotland) en tampón de TBE x 0,5 (Tris-ácido bórico 0.445M, EDTA 0,01M) al que se le añade 3.5 μ l de Bromuro de Etidio (BrEth, 25mg/ml) por cada 100 ml para poder, posteriormente, visualizarlo y fotografiarlo en el transiluminador de luz UV (Fotodyne incorporated y polaroid 667). Para el testado de las muestras tomamos 10 μ l del producto amplificado más 2 μ l de tampón de carga (0,25% xileno cianol, 30% glicerol en agua destilada) (Fig.21).

Junto con las muestras a estudiar, se sometió a electroforesis 5 μ l de un marcador de tamaños moleculares (ready-load, 100pb ADN ladder, Invitrogen o DNA ladder ready-load™ 0.1 μ g/ μ l, Invitrogen), que nos orientó sobre el tamaño de los productos amplificados, y un control negativo de la PCR (el cual ha seguido el mismo proceso que las muestras desde el inicio de la amplificación pero en vez de ADN se emplea agua).

La electroforesis se llevó a cabo aplicando un voltaje de 120v/cm. (fuente de alimentación, MODEL 1000/500, Bio-rad) durante aproximadamente 1 hora.

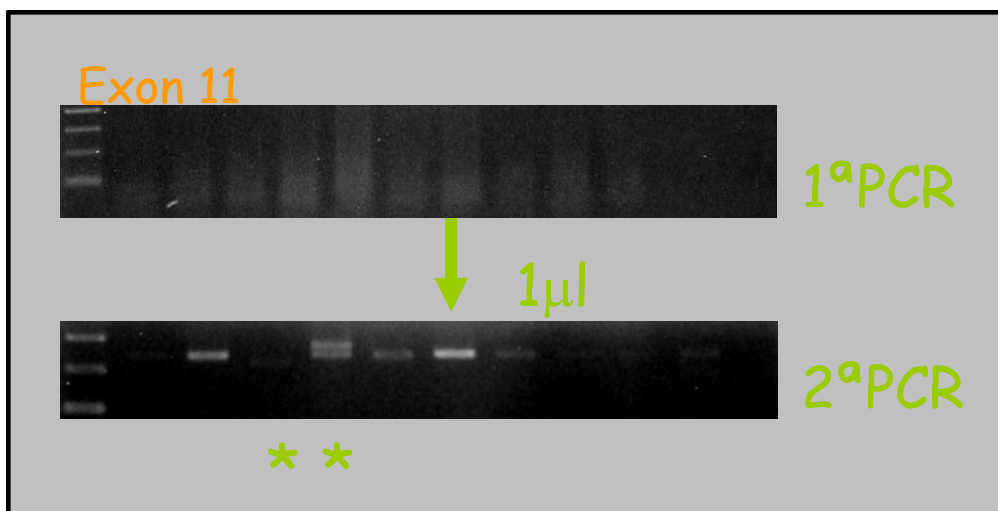


Figura 22: Imagen de amplificación del exón 11; en la primera PCR se observa como no hay bandas nítidas pero al realizar la 2ª PCR (anidada) se detecta incluso en el tercer carril y el cuarto dos casos mutados.

3.4.5-SECUENCIACIÓN

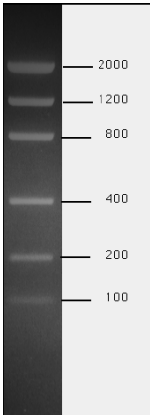
A) Preparación de las muestras para la secuenciación, purificación de las amplificaciones:

Una vez confirmada la amplificación de los productos de PCR y que el control negativo no se ha amplificado, se preparan las muestras para secuenciarlas. En una secuenciación la calidad depende de la pureza de la muestra y de su cuantificación, por ello tras la PCR se realiza una purificación de las muestras a través de columnas (ultrapure, YM-100, Amicon) con el objeto de eliminar el exceso de cebadores, buffer y tampón que podrían dificultar el proceso de secuenciación.

En primer lugar, se añade toda la muestra de la PCR (40µl aproximadamente) a una columna del Microcon-100 (Amicón) y se centrifuga a 2500rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente, así conseguimos eliminar todos los excesos de la PCR excepto el DNA, que al ser de un tamaño mayor se queda retenido en la membrana. Seguidamente se añade 32.5µl de H₂O a la columna con nuestro ADN y un nuevo tubo para eluir el ADN purificado y se vuelve a centrifugar a 5000rpm durante 10' a temperatura ambiente para obtener así el ADN diluido en agua con un alto grado de **pureza**.

El segundo paso, muy importante para una buena secuenciación, es **cuantificar** la cantidad de DNA que hemos obtenido para ello se toman 5µl de muestra más 1 µl de tampón de carga y a los que se someten a una electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. Para cuantificar añadimos un marcador (mass ladder, el cual es un control de concentración conocida) que nos indicará según el grosor y la intensidad de la banda, de manera aproximada, la cantidad de DNA de cada muestra de acuerdo con los criterios recogidos en la Tabla 12 (Fig.23).

Tabla 12: Concentraciones que se tienen en las muestras según la intensidad de la banda del marcador empleado.



Bandas	2µl	4µl	8µl
2000bp	100ng	200ng	400ng
1200bp	60ng	120ng	240ng
800bp	60ng	120ng	160ng
400bp	20ng	40ng	80ng
200bp	10ng	20ng	40ng
100bp	5ng	10ng	20ng

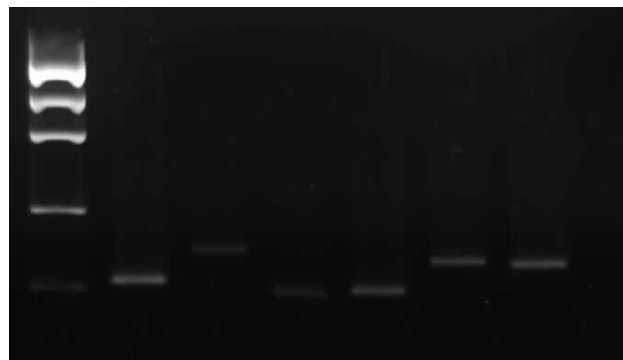


Figura 23: Cuantificación de los diferentes exones estudiados, en el primer carril se ha cargado el marcador Mass Lader (el cual nos indicará la concentración que tenemos), el orden de carga es el exón 11, el 9, el 13 y el 17 de *c-KIT* y el 12 y 18 de *PDGFRα*.

Una vez conocida la cantidad de ng/µl de ADN que hemos amplificado, con una segunda tabla sabremos los microlitros que hemos de añadir a la reacción de secuenciación.

TABLA 13.Según el tamaño de la amplificación se añadirá mayor o menor cantidad de ADN.

PRODUCTO DE PCR	CANTIDAD PARA SECUENCIACIÓN
100-200 bp	1-3ng
200-500bp	3-10ng
500-1000bp	5-20ng

B) Reacción de secuenciación:

Una vez cuantificados los casos, añadimos la cantidad de ADN calculada, 0.5 μl (3.2 μmol , para las PCRs anteriores la concentración era de 15 μmol) de los cebadores de cada uno de los exones de *c-KIT* y *PDGFR α* , 4 μl de Big Dye v1.1 (Applied Biosystems, Inc; Foster City, CA). (la cual está compuesta por las cuatro bases del ADN pero cada una de ellas marcadas con un fluorocromo que son los causantes de poder visualizar posteriormente de la secuenciación nuestras mutaciones) y H₂O hasta 10 μl . Se ponen todos los componentes en un tubo y se pasa al termociclador con el siguiente programa:

Tabla 14: Temperaturas y tiempos empleados en la reacción de secuenciación.

BIG DYE		
Tª °C	Tiempo	Ciclos
96	1' (desnaturalización inicial)	36
96	10''(desnaturalización)	
55	5'' Hibridación	
60	4' (elongación)	

C) Precipitación ETANOL/EDTA

Una vez terminada la reacción de secuenciación, preparamos las muestras para secuenciarlas: añadimos en tubos eppendorf 2.5 μl EDTA 125mM y 39 μl de etanol absoluto a -20°C; añadimos los 10 μl también al eppendorf y mezclamos bien invirtiendo los tubos.

Dejar a temperatura ambiente durante 15 minutos, ya que este paso es para precipitar el ADN marcado. Seguidamente, centrifugamos a 12500rpm durante 30 minutos a 4° C. Una vez centrifugado desecharmos el sobrenadante con cuidado porqué el pellet no se aprecia.

Al sedimento se le añade 30 μl de etanol 75% frío y volvemos a centrifugar pero a 10000 r.p.m durante 15 minutos a 4°C y seguidamente eliminamos el sobrenadante con unas puntas de punta fina para no llevarnos el pellet, para evaporar el etanol se introduce unos 15 min en una estufa a 37°C.

Pasamos a la desnaturalización de las muestras añadiendo 25 μl de formamida a cada muestra y se introducen en un baño a 94° durante 10

minutos. La formamida se intercala entre las dos hebras de ADN que a 94° se separan; para fijar el paso anterior se introducen las muestras en hielo durante 5 minutos.

D) Secuenciación

Las muestras ya están preparadas para introducir las en el secuenciador automático ABI PRISM 310 usando un capilar de 36 cm. (referencia), polímero (POP6).

Seguidamente se estudian las secuencias con el software Análisis Sequencing V.5.2; para caracterizar el tipo de alteración génica con una secuencia consenso obtenida del NCBI (*c-KIT*: [ENSG00000157404](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/ENSG00000157404) y *PDGFRα*: ENSG00000134853) y con el código de aminoácidos comprobamos los cambios de aminoácidos que ha habido a causa de las mutaciones puntuales; alineando las secuencias con las secuencias de referencias utilizando el programa BLAST2seq (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>).

3.5-ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se han analizado utilizando el paquete informático SPSS versión 12 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

1. Estadística descriptiva

Esta aproximación la hemos empleado para estudiar los diferentes aspectos o caracteres referidos a un conjunto de elementos de naturaleza específica, y que reciben la denominación de “variables”.

El primer paso para el estudio estadístico ha sido el análisis, en forma descriptiva, de las variables continuas (numéricas), determinándose la media, mediana, desviación estándar y rango de cada una de ellas, además las representaciones gráficas son representadas en diagramas de barras.

2. Estadística inferencial:

A continuación procedemos a extrapolar los resultados a la población que se está estudiando con un intervalo de confianza del 95%.

Llevamos a cabo dos tipos de pruebas: las denominadas “**pruebas paramétricas**”, en las que la población estudiada sigue una distribución normal, y las “**pruebas no paramétricas**”, que no son aplicables cuando la población que se desea analizar es demasiado pequeña, o la información disponible es insuficiente para comprobar la hipótesis de trabajo. Estas últimas pruebas permiten extrapolar los resultados de la muestra a la población total que es objeto de análisis.

En este sentido, se ha realizado un extenso análisis descriptivo que contiene, en forma de tablas, la distribución simple y cruzada de frecuencias de todas aquellas variables consideradas de interés, así como la media, desviación estándar y rango para las variables continuas.

Se ha realizado un **análisis bivariante**, que contrasta dos a dos distintos factores susceptibles de estar relacionados. Las pruebas estadísticas aplicadas dependen del tipo y distribución estadística de la variable, tamaño de la muestra implicada y distribución de los casos en la correspondiente tabla de contingencia. En concreto, se han utilizado las siguientes pruebas:

-Prueba χ^2 de Pearson: se ha utilizado como prueba de asociación o dependencia entre dos variables categóricas,

-Prueba U de Mann-Whitney (MW) para dos muestras independientes: se ha utilizado para contrastar la homogeneidad de la distribución de una variable, cuando menos ordinal, en dos muestras independientes. Esta prueba contrasta la hipótesis nula de que las muestras proceden de dos subpoblaciones en las que la probabilidad de obtener en la primera un resultado de X menor que en la segunda es igual a la probabilidad de obtener un resultado mayor ($H_0: P_{X_1 < X_2} = P_{X_1 > X_2}$). Si la probabilidad asociada al estadístico de contraste es menor que el nivel de significatividad, se rechaza la hipótesis nula a dicho nivel de significatividad.

-Análisis de la proporción libre de enfermedad y supervivencia global mediante el método de supervivencia de Kaplan-Meier: permite estudiar el

comportamiento de la supervivencia. Esta metodología permite contrastar si los diferentes niveles de un determinado factor producen o no curvas de supervivencia significativamente distinta utilizando el test del logaritmo del rango. La elección de esta prueba concreta está fundamentada en un elevado número de casos censurados (libres de enfermedad o vivos). La variable “Intervalo libre de progresión (ILP)” está definida como el tiempo total, expresado en meses, que transcurren desde el diagnóstico del tumor hasta que el paciente presenta un evento de recurrencia (ILR) o metástasis a distancia (ILM), hasta el último control del seguimiento en que constata que el paciente permanece vivo; siendo también analizada la “supervivencia global” que es el tiempo total en meses hasta que se fallece a causa de la enfermedad estudiada. La curva de supervivencia representa la posibilidad de que un paciente permanezca libre de enfermedad un determinado tiempo tras el diagnóstico. El objetivo es obtener, mediante probabilidades condicionadas, una descripción más precisa de la evolución de la progresión de la enfermedad a lo largo del tiempo. La particularidad del método de Kaplan-Meier frente a otras técnicas de cálculo de supervivencia es que las probabilidades se calculan en los instantes concretos de tiempo en que los pacientes recaen, metastatizan o fallecen, si hablamos de supervivencia global.

-Análisis multivariable con la regresión de Cox.

La estadística multivariable engloba una variedad de técnicas que tienen por objeto analizar las interrelaciones de un conjunto de variables. Debido a la existencia de interdependencia entre las diversas variables, la hipótesis multivariable. De este modo, las técnicas multivariable describen a través de combinaciones lineales de las variables, las estructuras de covariación presentes en el conjunto considerando como un todo. Reduce la dimensionalidad de los datos conservando únicamente aquellas combinaciones de variables que expliquen en mayor medida la variabilidad total observada en el conjunto. Se utilizó el modelo de regresión de Cox, que permite evaluar los efectos de un conjunto de variables independientes explicativas o factores pronósticos sobre la variable dependiente tiempo de supervivencia.

El modelo de regresión de Cox permite identificar el subconjunto de factores pronósticos significativamente relacionados con el tiempo de supervivencia y

calcular las estimaciones b de los coeficientes de regresión que son indicadores del efecto de los correspondientes factores pronósticos sobre la supervivencia. Las estimaciones las realiza por el método de máxima verosimilitud y utiliza los sujetos tanto en tiempos completos como en tiempos incompletos.

-El nivel de significatividad empleado en todos los análisis ha sido el habitual del 5% ($\alpha=0,05$). Cualquier valor de probabilidad inferior a 0,05 es indicativo de una relación estadísticamente significativa, muy significativo $p<0.01$ y altamente significativo $p<0.005$; contrariamente no es significativo una p superior a 0.05.

IV.RESULTADOS

4.1- RESULTADOS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS

En los siguientes apartados se incluyen los resultados del análisis estadístico de los parámetros clínico-patológicos, seguido de los resultados inmunohistoquímicos y el estudio mutacional de los genes *c-KIT* y *PDGFR α* , con el objetivo de hallar patrones comunes de malignidad en los diferentes tumores del estroma gastrointestinal (GIST) estudiados.

4.1.1. DESCRIPCIÓN DE LA SERIE DE CASOS INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

El estudio incluye un total de 175 casos diagnosticados entre 1985 y 2007: 86 pertenecen al Hospital Clínico de Valencia, 24 casos a la Fundación Instituto Valenciano de Oncología y 65 fueron remitidos como casos consulta desde hospitales externos.

Dentro del total de casos analizados, se incluye una **serie retrospectiva** de tumores mesenquimales reevaluados como posibles GIST. Esta serie hace referencia a tumores diagnosticados como leiomiomas, leiomiosarcomas y leiomioblastomas entre las décadas de los 80 a los 90, cuando todavía no se había definido la entidad de GIST, como tal. Después de una primera revisión de más de 100 casos se incluyen en el estudio 40 posibles candidatos a GIST por su localización, celularidad y morfología (13 leiomiomas, 20 leiomiosarcomas y 7 leiomioblastomas). Se realizó la revisión de las 40 historias clínicas, han habido 9 casos en los que no fue posible obtener información sobre el seguimiento por lo que han tenido que ser excluidos del estudio de asociaciones de progresión tumoral y del análisis de supervivencia. Otro caso ha sido excluido porque no se pudo localizar el bloque de parafina con la muestra del tumor. Una vez recuperados los tumores se realizaron dos “matrices tisulares” para estudiar los paneles de marcadores inmunohistoquímicos que permiten establecer un diagnóstico diferencial con un GIST. Paralelamente, se realizó el análisis mutacional tanto de *c-KIT* como de *PDGFR α* . Se procedió a unificar los resultados de las dos técnicas; sobretodo para aquellos casos en los que a nivel inmunohistoquímico había dudas de su posible origen patológico, para poder confirmar un posible GIST si se encontraba mutado. A priori, todos eran candidatos a GIST pero finalmente han sido redefinidos 31 casos que cumplían los criterios diagnósticos de GIST tanto

en cuanto a localización, como a etiología, inmunofenotipo y perfil molecular. Los resultados del estudio retrospectivo son incluidos dentro del estudio global de la serie por lo que posteriormente serán comentados más detalladamente con posterioridad.

En el **estudio global**, de un total de 175 casos candidatos a ser diagnosticados como GIST, finalmente han sido excluidos un total de 30 casos, ya que han sido diagnosticados como otras entidades: 10 leiomiomas, 7 leiomiosarcomas, 3 tumores desmoides, 2 sarcomas pleomórficos, un sarcoma sinovial, un mesotelioma, dos pólipos fibroides inflamatorios, un tumor miofibroblástico inflamatorio, un osteosarcoma, un sarcoma de Ewing y una metástasis por melanoma (Fig. 24 y 25). Estos casos han seguido el mismo proceso de análisis que los GIST por lo que han servido como controles en las técnicas realizadas tanto a nivel de inmunohistoquímica como a nivel de biología molecular.

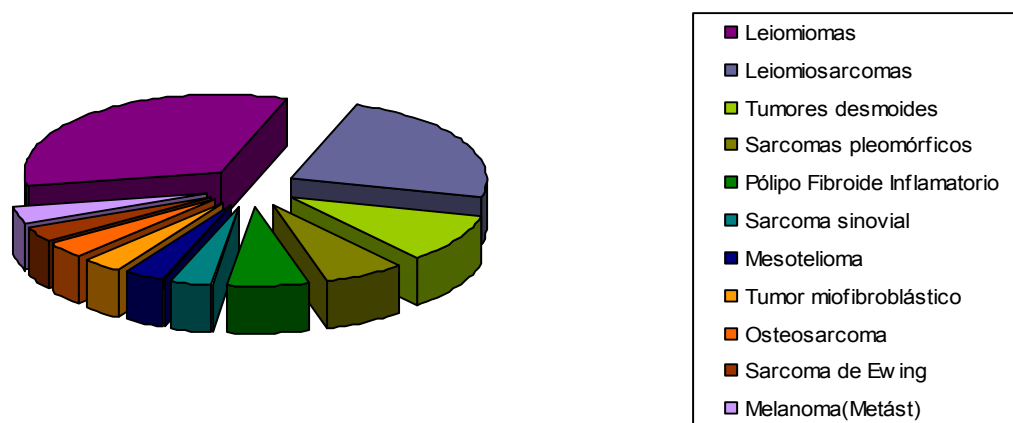


Figura 24: Distribución diagnóstica de aquellos casos que finalmente no han sido GIST en la serie; destacando que la gran mayoría son leiomiomas y leiomiosarcomas.

En el total de casos estudiados, se ha realizado el estudio inmunohistoquímico y mutacional del tumor primario a 133 casos y 12 se han estudiados a partir de la recidiva debido a que no ha sido posible obtener el primario. No obstante se ha analizado todo el material disponible de un tumor para confirmar los resultados, por lo que se han estudiado un total de 155 muestras que pertenecen a tumores primarios; de los cuales 2 eran tejido en fresco, 5 de cultivos celulares a partir del tumor primario y un nude (ratones inmunodeficientes que son utilizados para el seguimiento del tumor extirpado de una persona e introducido en la subepidermis del roedor). Además, en los

tumores de gran tamaño se seleccionaron previamente las zonas más representativas del tumor para realizar el estudio molecular y evitar falsos negativos. De todos los casos en los que ha sido posible se han analizado las recidivas (19 muestras) y las metástasis (12 muestras).

Resultados

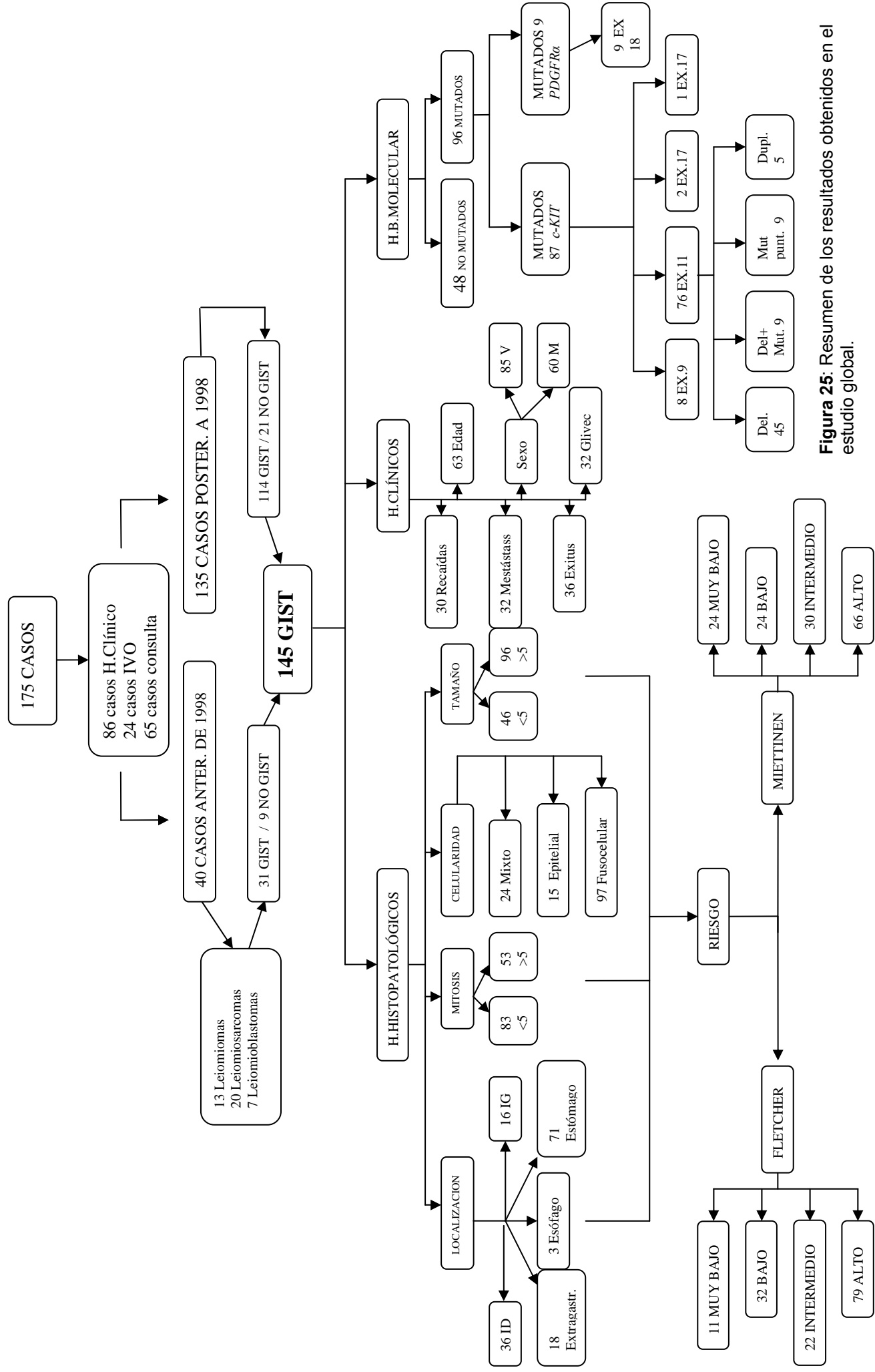


Figura 25: Resumen de los resultados obtenidos en el estudio global.

4.1.2-HALLAZGOS CLÍNICOS

Se han obtenido todos los datos clínicos de los **145** GIST en la revisión de las historias clínicas e informes de anatomía patológica del Hospital Clínico Universitario de Valencia y la Fundación Instituto Valenciano de Oncología. En aquellos casos de consulta remitidos de hospitales externos se ha intentado recabar toda la información posible de la evolución de los pacientes (Tabla 15). La mediana de seguimiento ha sido de 52 meses (rango 0-245 meses).

Tabla 15: Resumen de los resultados clínicos.

Parámetro	Nº Casos	Porcentaje (%)
Sexo		
Varón	86	59
Hembra	59	41
Edad (años)		
Mediana (rango)	63 (24-86)	
Edad <35	6	4
Edad 36-50	24	17
Edad 51-70	68	47
Edad >71	46	32
Tipo de tumor estudiado		
Tumor primario	133	91,6
Recidiva	12	8,4
Tratados con Glivec	32	25,4
Recaídas	30	26,5
Metástasis	32	27,6
Exitus a causa de la enfermedad	36	31,6

Del total de GIST estudiados 86 eran varones (59%) y 59 mujeres (41%) con una razón **Hombre/Mujer** de 1,46. El rango de **edad** de los pacientes se encuentra comprendido entre los 24 y los 86 años, con una mediana de 63 años y la media de 61; observando que el mayor número de pacientes con GIST se encontró en el intervalo de edades comprendidas entre 51-70 años (Fig.26).

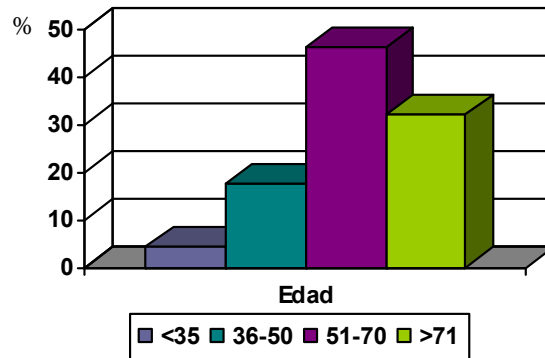


Figura 26: Distribución por edades de los pacientes incluidos en nuestra serie.

Las **manifestaciones clínicas** más frecuentes de la enfermedad fueron anemia, dolor abdominal acompañado o no por obstrucción intestinal, sangrado, fiebre y una gran pérdida de peso. Cabe destacar que algunos de los GIST fueron hallazgos incidentales durante exploraciones urogenitales, sin haber presentado ninguna sintomatología. En la Fig.27 se observa la distribución de las presentaciones clínicas de la serie analizada.

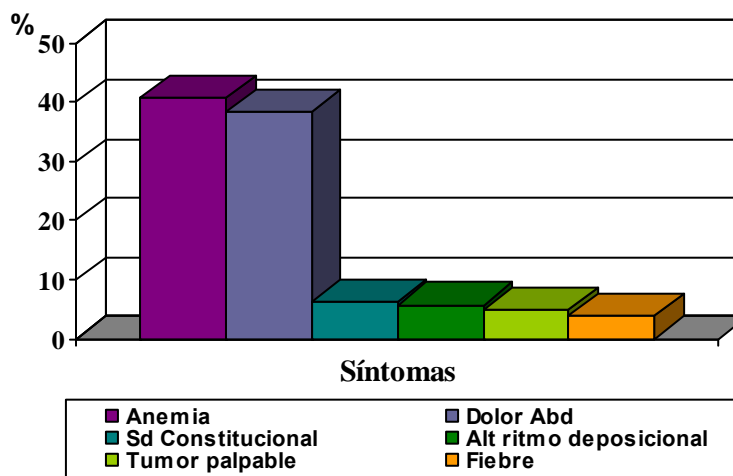


Figura 27: Presentaciones clínicas más frecuentes por las que se detecta un GIST en la serie analizada.

La primera opción de tratamiento de los GIST es la **resección quirúrgica completa**. En nuestra serie el tratamiento quirúrgico ha sido imposible de realizar en cinco casos por el gran tamaño y la localización tumoral. Exceptuando 19 casos en los que la resección fue parcial, y 7 que fallecieron en el transcurso de la intervención quirúrgica; al resto de casos se les realizó la resección completa del tumor.

De los 145 GIST de la serie han **recidivado** 30 (26,5%), han **metastatizado** 32 (27,6%) y han **fallecido** a causa del tumor 36 (31,6%). A su vez, 32 pacientes han sido tratados con **Glivec** (25,4%); de los cuales han fallecido 9, obteniendo en el resto de casos una respuesta parcial (67%). Ninguno de los pacientes ha presentado una respuesta completa al fármaco. Dos casos han sido tratados con Sutent en 2ª línea, después de no responder al Glivec pero la corta duración del tratamiento no ha permitido valorar la respuesta. En los casos diagnosticados con anterioridad a 1998, tres pacientes habían sido tratados con ciclos de quimioterapia sin obtener respuesta alguna.

4.1.3-HALLAZGOS ANATOMOPATOLÓGICOS

A continuación se detalla los parámetros anatomopatológicos que se han revisado con las distribuciones y frecuencias, resumidas en la tabla 16.

Tabla 16: Resumen de los resultados anatomopatológicos.

Parámetro	Nº Casos	Porcentaje (%)
Localización		
Estómago	71	49
Intestino delgado	36	25
Intestino grueso	15	11
Extragastrointestinal	18	13
Esófago	3	2
Tamaño tumoral (cm.)		
≤ 2cm	13	9
≤ 5cm	33	23
>5cm	49	35
>10cm	47	33
Celularidad		
Fusocelular	97	71
Epitelioide	15	11
Mixto	24	18
Pleomorfismo	63	46
Necrosis	56	41
Mitosis		
Mediana (rango)	4 (0-80)	
<5 mitosis	83	61
>5 mitosis	53	39
Grupo de riesgo Fletcher		
Muy bajo riesgo	11	8
Bajo riesgo	32	22
Riesgo intermedio	22	15
Alto riesgo	79	55
Grupo de riesgo Miettinen		
Muy bajo riesgo	24	17
Bajo riesgo	24	17
Riesgo intermedio	30	20
Alto riesgo	66	46

La **localización tumoral** más frecuente en nuestra serie ha sido el estómago con 71 tumores (49%), seguido por 36 en el intestino delgado (25%). En menor número se han encontrado 16 casos en el intestino grueso (11%), 18 en la localización extragastrointestinal como el peritoneo, retroperitoneo (13%) y por último 3 casos (2%) en el esófago; la distribución se ve reflejada en la Fig.28 (Fig.29, 30, 31 y 32). En dos casos consulta de hospitales externos no ha sido posible conocer la localización.

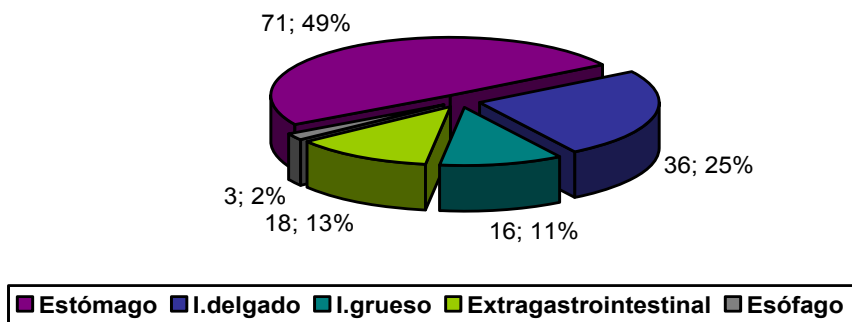


Figura 28: Localización de los tumores de nuestra serie en el tracto digestivo, siendo la más frecuente el estómago, seguido por el intestino delgado, y en menor número el intestino grueso y extragastrointestinales.

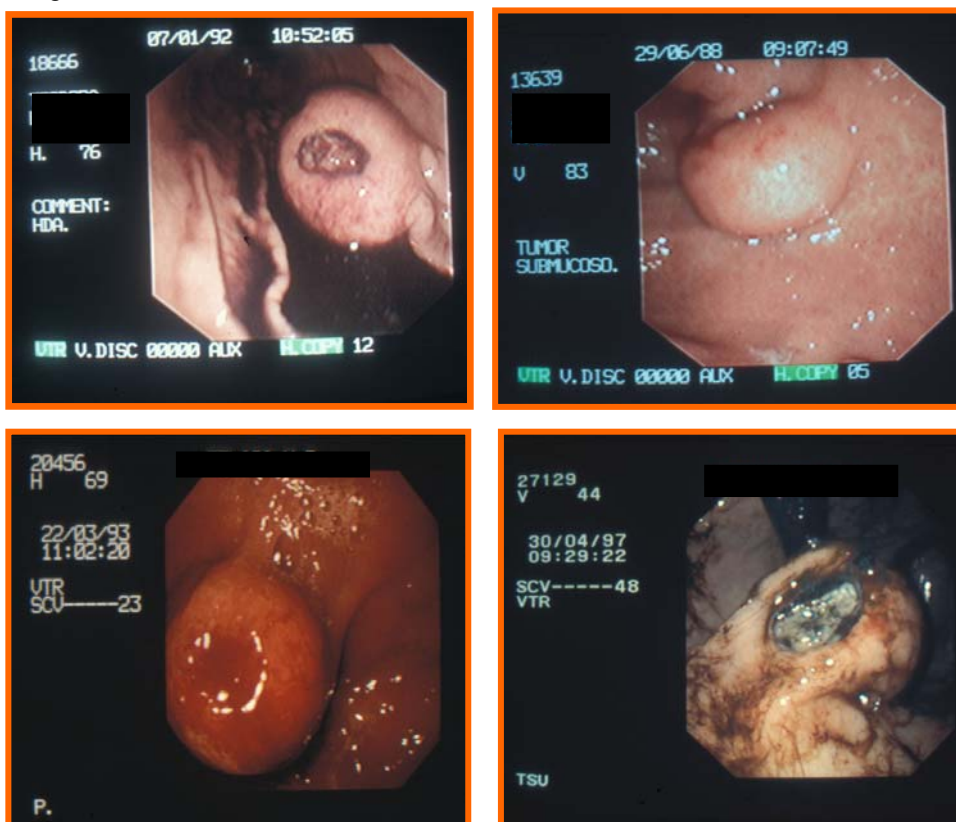


Figura 29: Imágenes endoscópicas de GIST en distintas localizaciones. En todas ellas se aprecia que la lesión impronta en la mucosa e incluso llega a ulcerarla pero no depende de la misma.

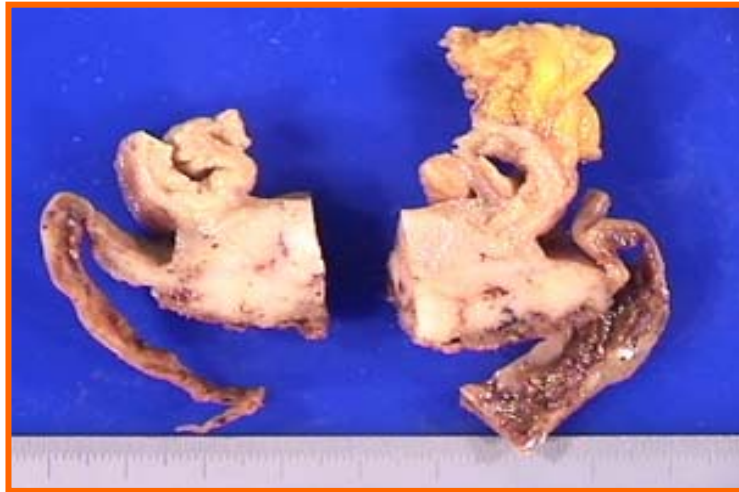


Figura 30: GIST peritoneal. Aspecto macroscópico de la tumoración peritoneal infiltrando extrínsecamente la pared intestinal.

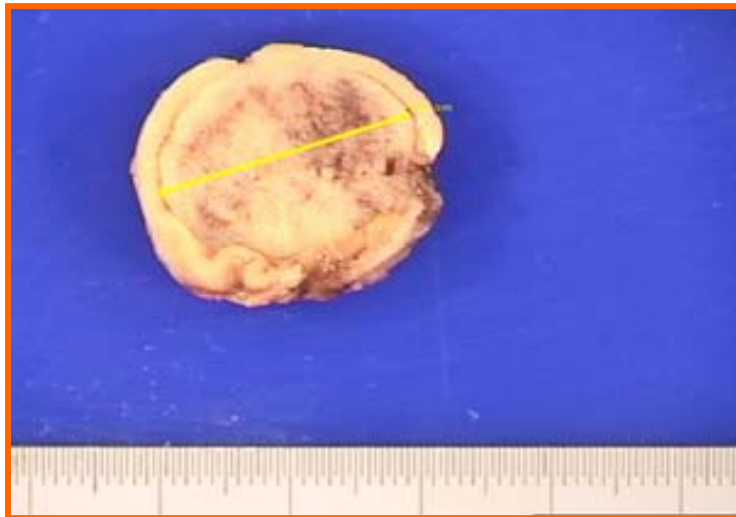


Figura 31: GIST del fundus gástrico. La tumoración muestra coloración blanquecina alternando áreas de aspecto fibroso arremolinado con otras carnosas y congestivas. Destaca el borde pujante que delimita netamente la lesión.

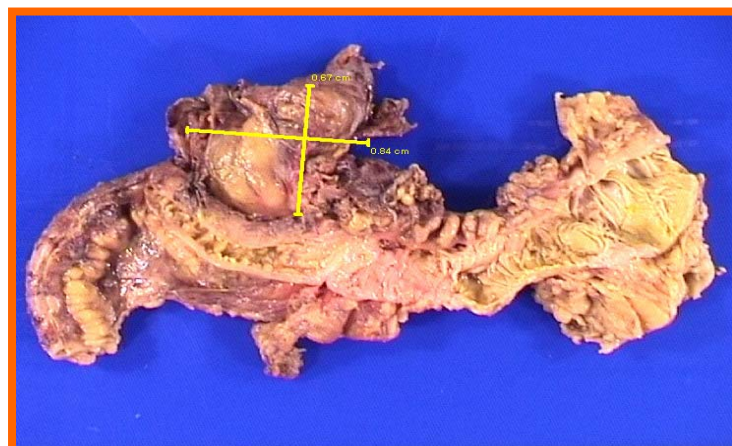


Figura 32: GIST del intestino delgado. Tumoración dependiente de la pared intestinal con crecimiento extrínseco, sin que se asocien lesiones mucosas evidentes.

La mediana del **tamaño tumoral** en nuestra serie es de 7,50 cm. con un rango entre 0,3 y 42 cm. Siguiendo la clasificación de Fletcher ⁷⁹ (Fig.33), el tamaño comprendido entre mayores de 5 y menores de 10 cm. es el más frecuente en nuestra serie con 49 casos (35%); seguido de 47 tumores que miden más de 10 cm. (33%); 33 casos (23%) con un tamaño tumoral menor de 5 cm. y 13 casos (9%) menores de dos cm. Ha habido tres casos de los cuales no hemos podido conocer el tamaño tumoral por tratarse de casos externos de consulta en los que el tamaño tumoral no constaba en el informe de anatomía patológica que acompañaba a la muestra.

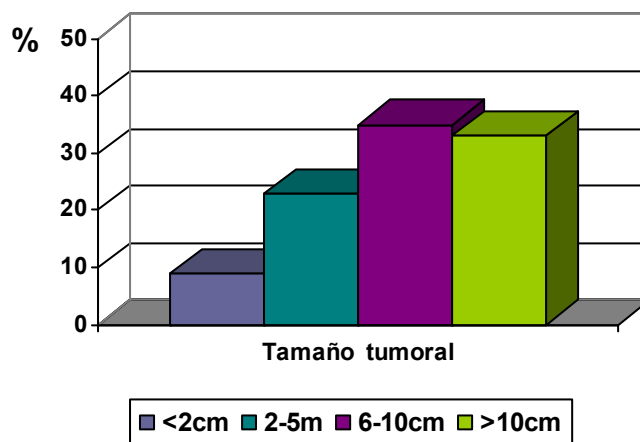


Figura 33: Distribución de los tamaños según los criterios de Fletcher en nuestra serie, siendo mayoritarios los tumores mayores de 5 cm. y 10cm.

Desde el punto de vista microscópico, la **variante histología** predominante en la serie ha sido la fusocelular con 97 tumores (71%) (Fig.35); seguida de 24 casos con un patrón mixto (18%) (Fig.36) y 15 casos de morfología epitelioides (11%) (Fig.37) (Fig.34).

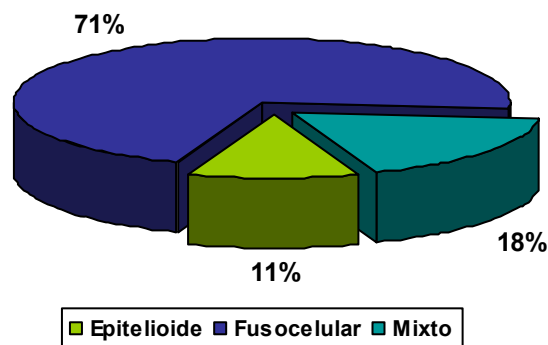


Figura 34: Distribución de las diferentes histologías en nuestra serie, siendo mayoritaria la morfología fusocelular seguida de la mixta y la epitelioides.

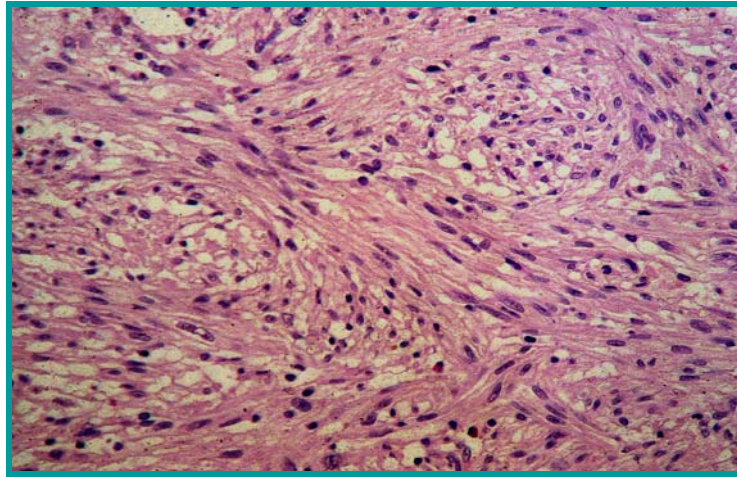


Figura 35: GIST con histología fusiforme. En la imagen se puede apreciar la uniformidad y forma elongada de las células tumorales, dispuestas en fascículos entrelazados. Hematoxilina-eosina, 20X.

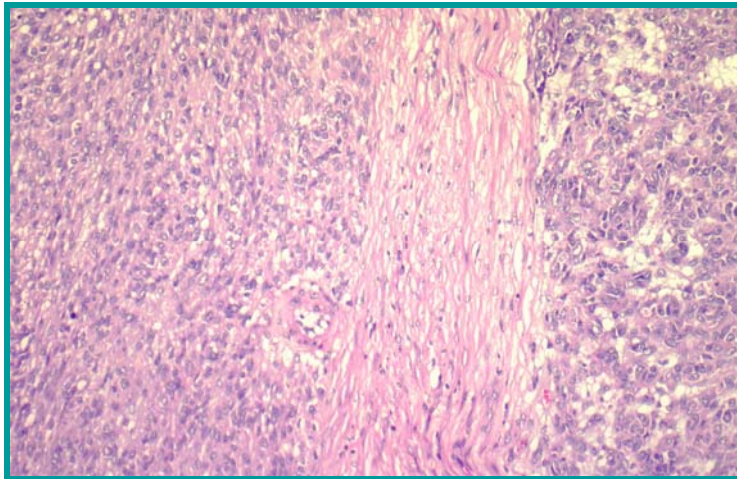


Figura 36: GIST con patrón mixto. Se encuentran áreas epitelioides y fusocelulares entremezcladas, e incluso se pueden observar células de tipo transicional. Hematoxilina-eosina, 10X.

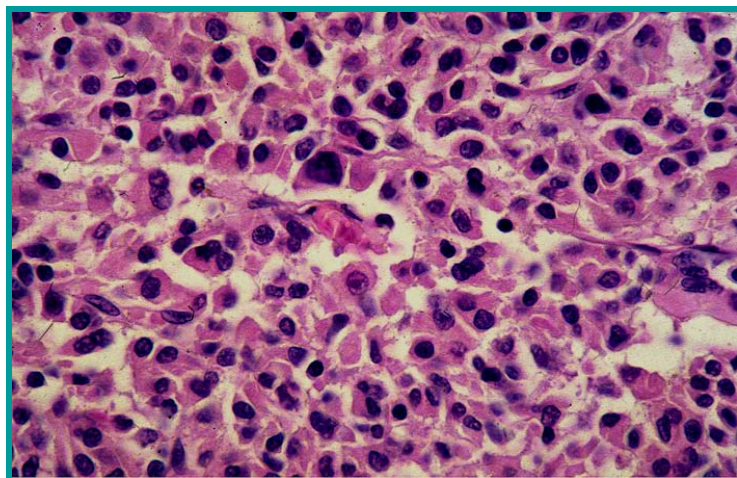


Figura 37: GIST con histología epitelioides. Células de amplio citoplasma, eosinófilo, poligonal con núcleos vesiculosos y nucleolos prominentes. Hematoxilina-eosina, 40X.

En el conteo del número de células que se encuentran en división en el tumor en los diferentes casos; se obtuvo una mediana de 4 **mitosis** en 50 HPF; con un rango de 0-80 mitosis. De acuerdo con la clasificación de Fletcher en cuanto al número de mitosis, la mayoría de nuestros casos (61%) han presentado menos de 5 mitosis, mientras que entre 6-10 mitosis hemos identificado 22 casos (16,2%) y con más de 10 mitosis 31 casos (22,8%) (Fig.38 y 39).

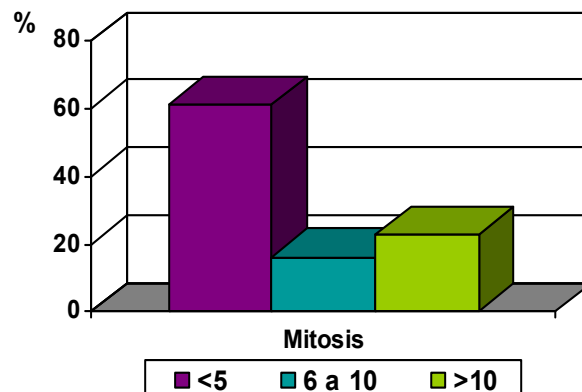


Figura 38: Distribución del número de mitosis en la serie estudiada, según los criterios de Fletcher.

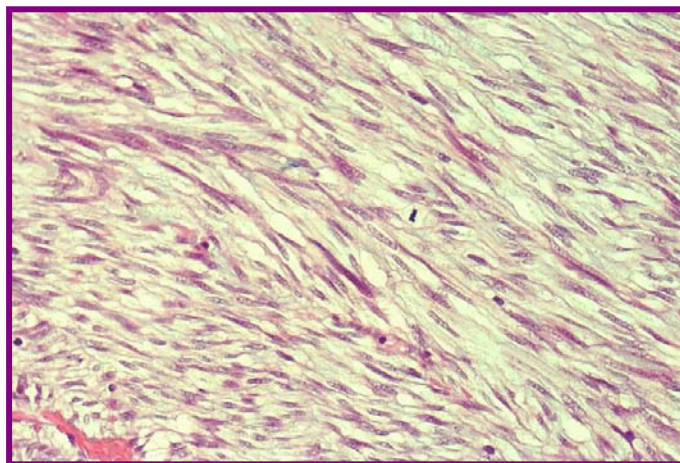


Figura 39: GIST fusocelular. En este campo de gran aumento se observa una mitosis en el centro. El conteo fue en este caso de 6-10 mitosis por 50 HPF.

Otros parámetros histopatológicos que se han valorado son la necrosis y el pleomorfismo. En la serie se observan 56 casos (41%) presentaron **necrosis**, los cuales presentan células tumorales con fenómenos de destrucción celular de origen diferente a la apoptosis (41%) (Fig.40). Por otra parte hemos observado 63 casos (46%) con **pleomorfismo** con marcada variabilidad en

cuanto a forma y tamaño nuclear que confiere un aspecto poco homogéneo a la lesión (Fig.41).

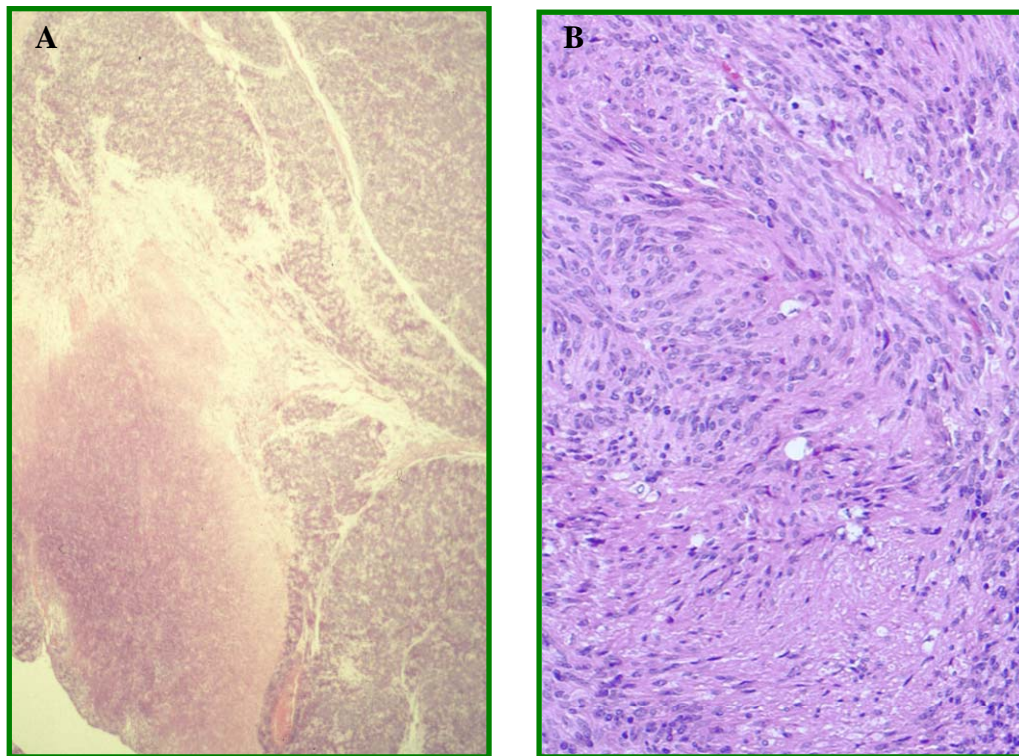


Figura 41: Dos imágenes representativas del fenómeno de necrosis tumoral, (A) a 10X y (B) A 20X.

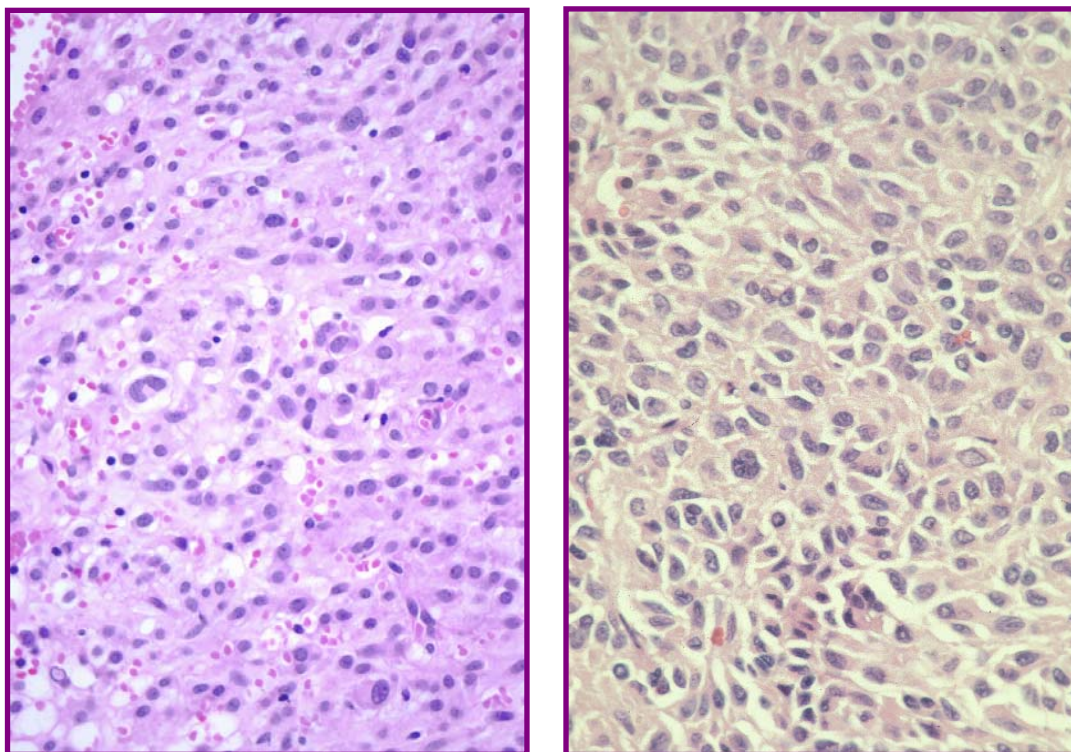


Figura 42: Dos imágenes representativas del pleomorfismo celular en los GISTs, A 40X ambas.

Todos los casos incluidos en el estudio se han clasificado siguiendo los **criterios de Fletcher** (Tabla 17), 11 han sido de muy bajo riesgo (8%), 32 casos de riesgo bajo (22%), 22 de riesgo intermedio (15%) y 79 de alto riesgo (55%) (Fig.43). No ha sido posible la clasificación en 1 caso por desconocer el tamaño tumoral.

Tabla 17: Clasificación de riesgo según los criterios de Fletcher.

Índice mitótico	Tamaño	Riesgo histológico
≤ 5 MITOSIS	≤2 cm.	11 Muy bajo riesgo
≤ 5 MITOSIS	>2 ≤5 cm.	32 Bajo riesgo
6-10 por 50 HPF <5 por 50HPF	≤5 cm. >5 ≤10 cm.	22 Moderado
>5 por 50HPF cualquier cantidad mitosis > 10 por 50HPF	>5cm. >10cm. cualquier medida	79 Alto riesgo

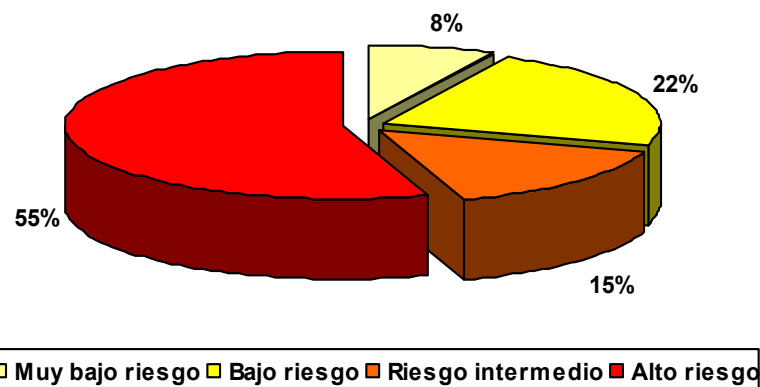


Figura 43: Distribución de los grupos histológicos de riesgo de los GIST estudiados según Fletcher.

En la nueva **clasificación de riesgo de Miettinen**⁸⁶, se tiene en cuenta, además del tamaño y el número de mitosis, la localización del tumor (estómago, intestino delgado e intestino grueso), con lo que la clasificación de nuestros casos se complementarían tal y como queda reflejada en la tabla 18. Teniendo en cuenta esta clasificación de riesgo de Miettinen los casos se reagruparían de la siguiente forma: 24 casos de muy bajo riesgo, 24 de bajo riesgo, 30 de riesgo intermedio y 65 de alto riesgo (Fig.44).

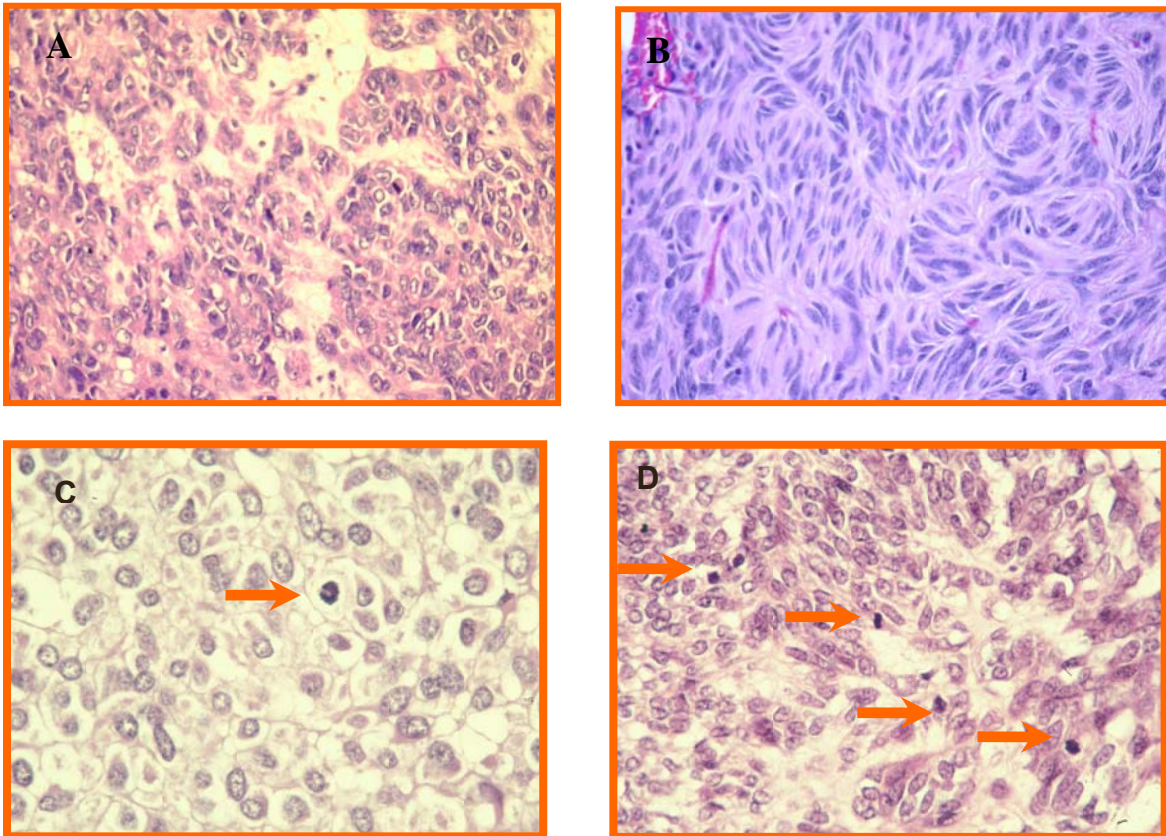


Figura 44: Imágenes representativas de GIST de bajo y alto riesgo, La A) correspondiente a un GIST de aspecto epitelioides de alto riesgo. B) GIST con morfología fusocelular de bajo riesgo. C) Caso con celularidad epitelioides de muy bajo riesgo. D) GIST de morfología fusocelular de alto riesgo. Las flechas en C y D son mitosis.

Tabla 18: Casos clasificados según los criterios de Miettinen.

Índice mitótico	Tamaño	Estómago	Intestino delgado	Intestino grueso	Resto de localizaciones
≤ 5 MITOSIS	≤2 cm.	Muy bajo riesgo 6 casos	Muy bajo riesgo 3 casos	Muy bajo riesgo 1 caso	Muy bajo riesgo 1 caso
	>2 ≤5 cm.	Muy bajo riesgo 13 casos	Bajo riesgo 5 casos	Bajo riesgo 3 casos	Bajo riesgo 3 casos
	>5 ≤10 cm.	Bajo riesgo 13 casos	Moderado 6 casos	Moderado 3 casos	Moderado 3 casos
>5 MITOSIS	>10 cm.	Moderado 13 casos	Alto riesgo 4 casos	Alto riesgo 2 casos	Alto riesgo 5 casos
	≤2 cm.	Bajo riesgo 0 casos	Alto riesgo 0 casos	Alto riesgo 1 caso	Alto riesgo 1 caso
	>2 ≤5 cm.	Moderado 5 casos	Alto riesgo 1 caso	Alto riesgo 1 caso	Alto riesgo 2 casos
>5 MITOSIS	>5 ≤10 cm.	Alto riesgo 10 casos	Alto riesgo 8 casos	Alto riesgo 3 casos	Alto riesgo 4 casos
	>10 cm.	Alto riesgo 11 casos	Alto riesgo 9 casos	Alto riesgo 1 caso	Alto riesgo 2 casos

4.2-ASOCIACIONES ENTRE LOS PARÁMETROS CLÍNICOS Y ANATOMOPATOLÓGICOS

A continuación procedemos a destacar las asociaciones más significativas que hemos encontrado entre los resultados clínicos y anatomopatológicos.

4.2.1-VARIABLES DE PRONÓSTICO CLÍNICAS

De todas las variables clínicas estudiadas la única que ha dado una asociación significativa con otros parámetros ha sido la **edad**. Al analizar la media de edad de todos los casos respecto al resto de parámetros se ha observado una correlación con variables como el tamaño tumoral ($p=0,043$), el índice mitótico ($p=0,001$), el riesgo histológico ($p=0,004$) y la presencia de metástasis ($p=0,055$); destacando en todas ellas que a mayor edad más favorables han sido las variables (<5cm, <5mitosis, bajo riesgo y ausencia de metástasis).

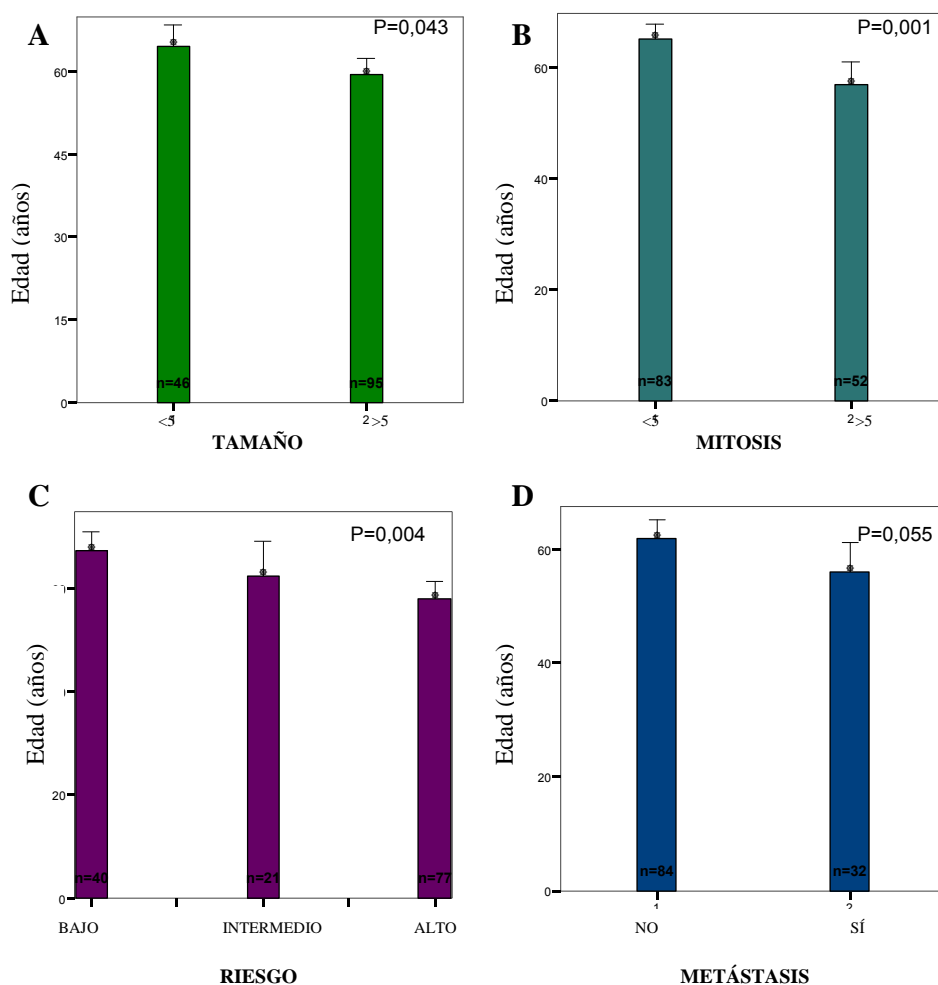


Figura 45: Correlación entre la edad y variables como el tamaño (A), el número de mitosis (B), el riesgo histológico (C) y la presencia de metástasis (D), mostrando mayor número de parámetros favorables en aquellos casos con una media de edad superior.

4.2.2-VARIABLES DE PRONÓSTICO ANATOMOPATOLÓGICAS

En primer lugar comentaremos las asociaciones más significativas de los parámetros anatomopatológicos macroscópicos con el resto de parámetros clínico-anatomopatológicos; seguidos de los parámetros microscópicos.

A) PARÁMETROS ANATOMOPATOLÓGICOS MACROSCÓPICOS

I) TAMAÑO

- Tamaño - Necrosis: existe una asociación directa entre el tamaño tumoral y la presencia de necrosis en el tumor ($p=0,001$). Además, este hecho se confirma cuando se analiza la relación que existe entre la clasificación de los diferentes tamaños de cada tumor según Fletcher y la presencia o ausencia de necrosis, observando que a mayor tamaño tumoral mayor es el número de casos que presentan necrosis ($p<0,0001$) (Fig.46 A).

- Tamaño - Pleomorfismo: el mismo comportamiento sucede cuando se correlaciona el tamaño tumoral con el pleomorfismo ($p=0,021$). Se percibe que desglosando los tamaños de cada tumor, aquellos que tienen un tamaño mayor presentan más pleomorfismo celular ($p=0,008$) (Fig.46 B).

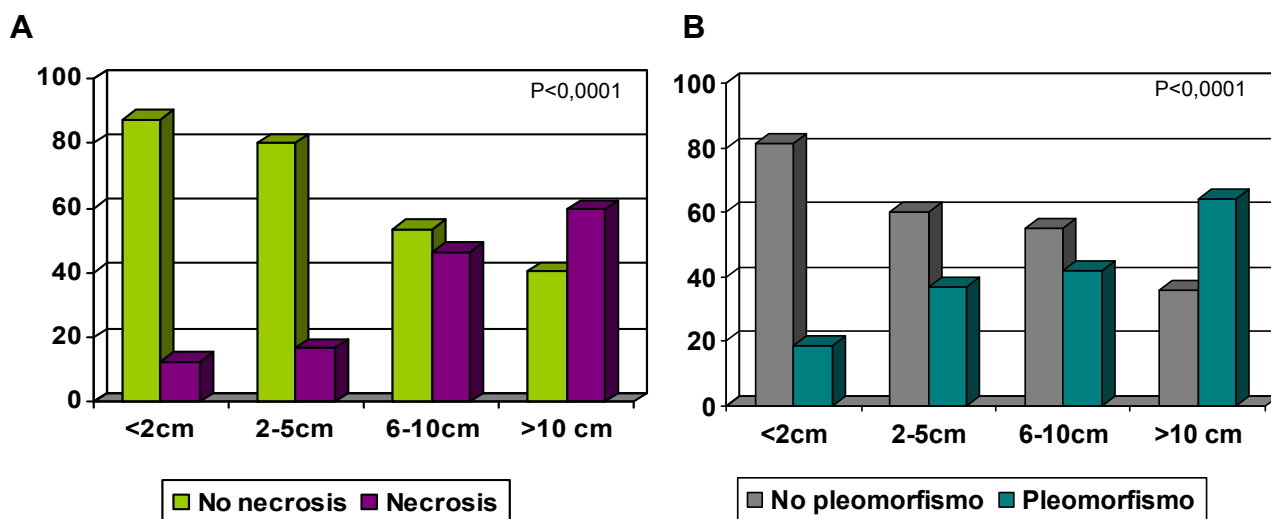


Figura 46: Existe una asociación directa entre el tamaño del tumor y la presencia de necrosis (A) y pleomorfismo (B), de modo que en los tumores de más de 6 cm la proporción de necrosis y pleomorfismo es mayor.

- Tamaño - localización extragastrointestinal: al relacionar el tamaño del tumor con la localización extragastrointestinal se observa una asociación significativa ($p=0,054$); incidiendo que las neoplasias con dicha localización presentan un mayor tamaño respecto al resto de localizaciones de la serie, hecho que queda reflejado en la Fig.47.

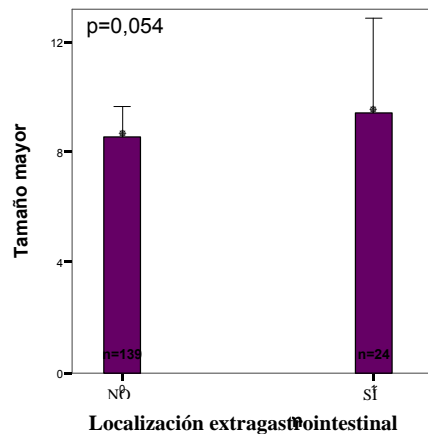


Figura 47: Asociación que existe entre los tumores de localización extragastrointestinal y el tamaño de los mismos; destacando que los casos extragastrointestinales presentan mayor tamaño que el resto de localizaciones.

- Tamaño - mitosis: el recuento de mitosis presenta una asociación directa con el tamaño tumoral ($p<0,0001$); como se puede apreciar en la figura 48. aquellos casos con un tamaño tumoral menor de 2 cm. presentan en un 85,7% menos de 5 mitosis en 50 HPF; obteniendo valores muy similares en los tumores menores de 5 cm. (73,3%), pero en aquellos tumores mayores de 5 y 10 cm. respectivamente, se dispara el porcentaje de casos con más de 5 mitosis en 50 HPF ($p=0,030$).

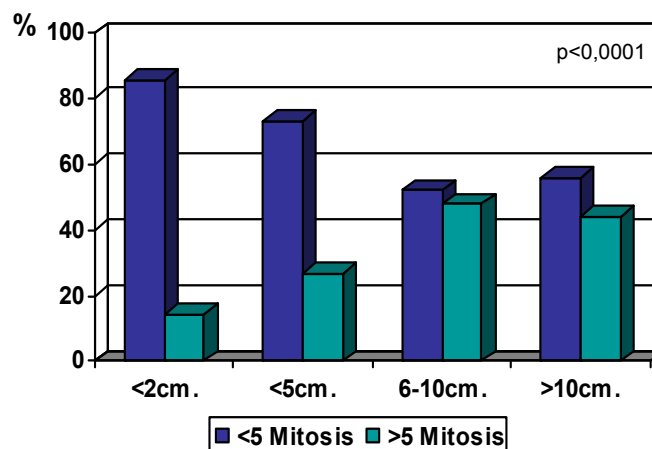


Figura 48: Relación que existe entre el tamaño tumoral y el número de mitosis presente; a menor tamaño menor número de mitosis.

Al analizar las medias de las mitosis respecto a los cuatro grupos de tamaño tumoral se puede ver en la figura 49 que a medida que aumenta la media de mitosis aumenta el tamaño tumoral ($p=0,021$).

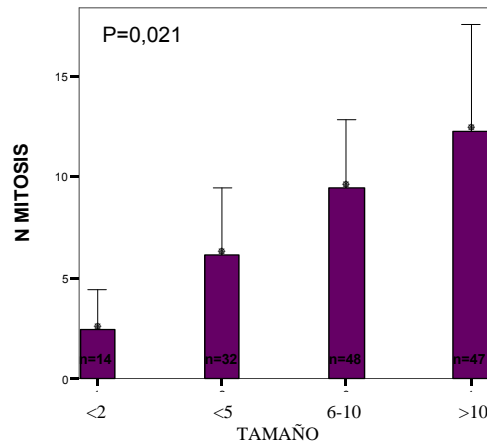


Figura 49: Asociación entre la media de mitosis y el tamaño tumoral.

II) TUMORES IRRESECABLES

- Resección no completa - tamaño tumoral: como cabría esperar la irresecabilidad está íntimamente ligada al tamaño tumoral ($p=0,00026$), como se refleja en la figura 50; el 76,5% de los tumores irresecables son mayores de 10 cm, seguido de tumores entre 6-10 cm y un único caso inferior a los 5cm sin que se incluya ningún caso inferior a los 2 cm. Por el contrario la distribución de los tamaños tumorales no varía excesivamente en las resecciones completas.

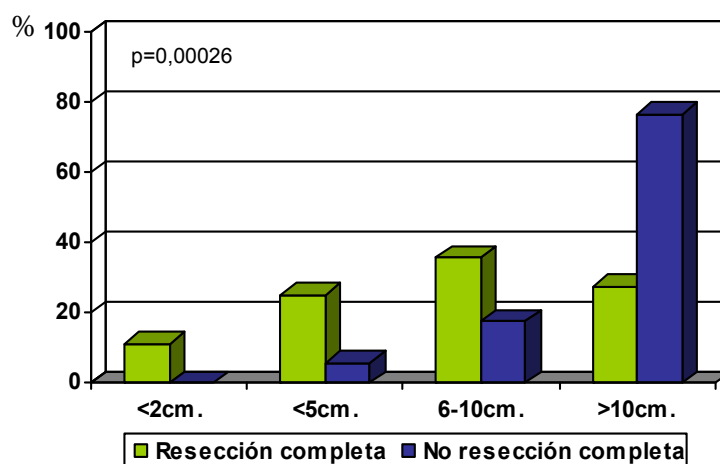


Figura 50: Relación de los tumores irresecables y el tamaño tumoral que presentan.

- Resección no completa - localización extragastrointestinal: consecuentemente, una de las causas por las que no se ha realizado la resección completa es la localización extragastrointestinal del tumor, que constituye un mayor riesgo para el paciente. En nuestra serie un 27,8% de casos son extragastrointestinales con resección no completa versus un 9,6% de casos no extragastrointestinales con resección no completa ($p=0,026$) (Fig.51).

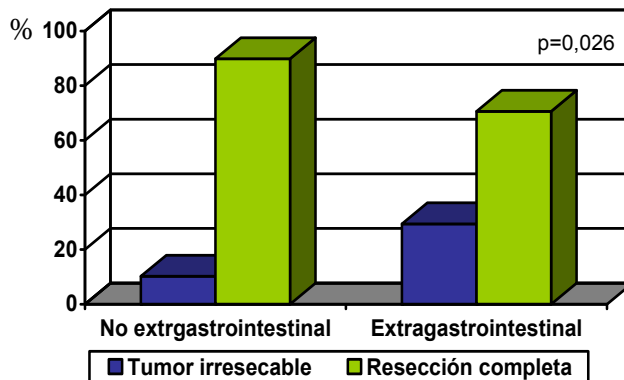


Figura 51: Correlación entre la resección no completa y los casos con localización extragastrointestinal.

- Resección no completa - grupo de riesgo según Fletcher: reafirmando las asociaciones anteriores, los casos a los que no se les realiza la resección completa son clasificados prácticamente todos (15 de 19 casos con tumores irreseccionables) como GIST de alto riesgo según los criterios de Fletcher, debido principalmente al tamaño tumoral ($p=0,005$) (Fig.52).

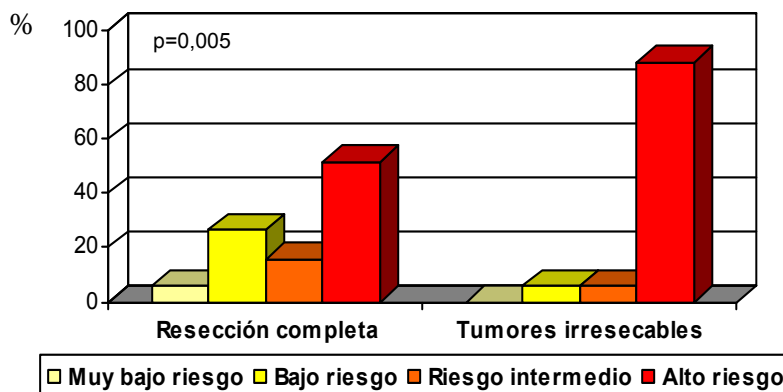


Figura 52: Correlación entre la resección no completa del tumor y la distribución de los grupos de riesgo.

- Resección no completa - grupo de riesgo según Miettinen: los resultados obtenidos son muy similares a los observados en la clasificación según Fletcher. Los casos a los que se les ha realizado la resección completa se clasifican en los cuatro grupos de riesgo prácticamente por igual, aumentando claramente los de alto riesgo respecto de la anterior (21 /19/ 21/ 39%); sin embargo, los casos irresecables son clasificados todos ellos en riesgo intermedio (33%) y en alto riesgo (67%) (p=0,05) (Fig.53).

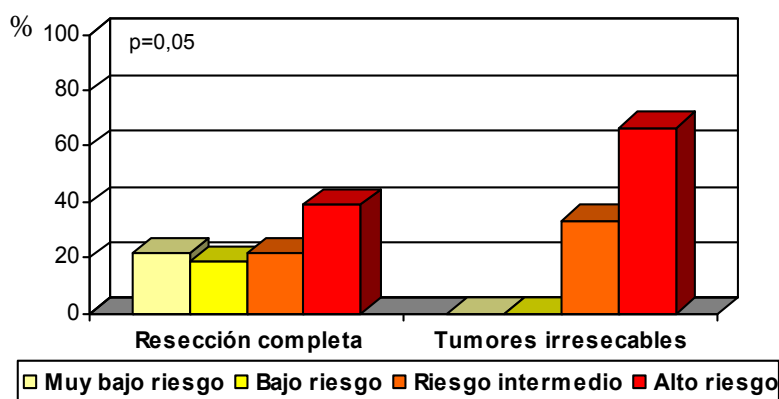


Figura 53: Correlación entre la resección no completa del tumor y la distribución de los grupos de riesgo según la clasificación de Miettinen.

B) PARÁMETROS ANATOMOPATOLÓGICOS MICROSCÓPICOS

I)- NECROSIS Y PLEOMORFISMO

- Necrosis y pleomorfismo - número de mitosis: se aprecia una asociación directa entre el número de mitosis presentes en el tumor con la necrosis ($p < 0,0001$) y el pleomorfismo ($p = 0,016$). Cuando el número de mitosis es ≤ 5 la proporción de casos con necrosis es de 24,1% pasando a ser del 61,1% en presencia de más de 5 mitosis por 50 HPF; prácticamente se observa el mismo comportamiento respecto al pleomorfismo, cuando el índice mitótico es ≤ 5 la presencia de pleomorfismo es de 28,2% y con más de 5 mitosis la presencia es de 51,6% (Fig.54).

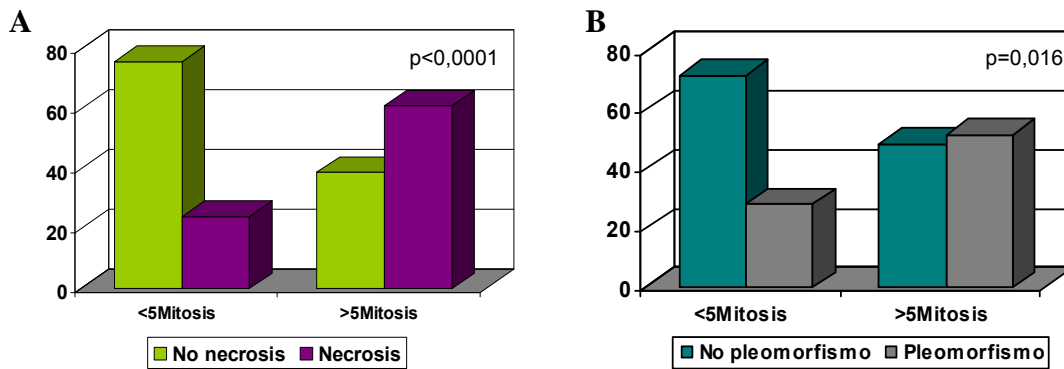


Figura 54: Relación directa entre aquellos casos con <math><6></math> de 5 mitosis a 40X en 50HPF y la presencia o ausencia de necrosis (A) y pleomorfismo (B).

- Necrosis y pleomorfismo - grupo de riesgo de Fletcher: la presencia de necrosis y pleomorfismo está directamente asociada con la clasificación de riesgo según los criterios de Fletcher (Fig.55); es decir, los casos clasificados de alto riesgo presentan necrosis en un 58% ($p<0,0001$) y en un 60% pleomorfismo ($p<0,0001$).

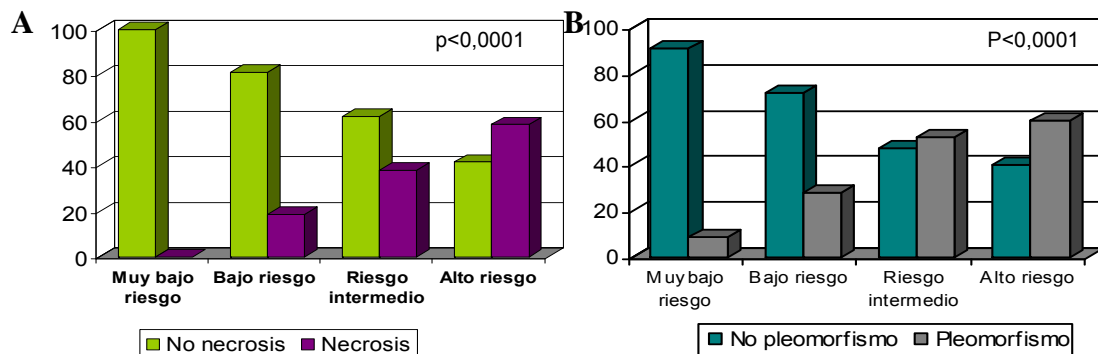


Figura 55: Correlación entre la presencia de necrosis (A) y pleomorfismo (B) con la clasificación de riesgo según los criterios de Fletcher.

- Necrosis y pleomorfismo - clasificación de Miettinen: se obtienen prácticamente los mismos valores que en la clasificación de riesgo de Fletcher; los casos de alto riesgo presentan necrosis en un 65% ($p<0,0001$) y en un 52% pleomorfismo ($p<0,0001$) (Fig.56).

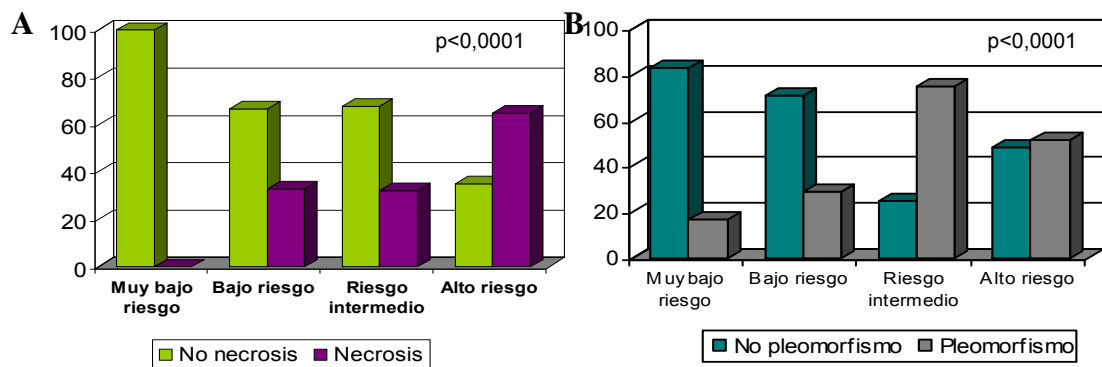


Figura 56: Correlación entre la presencia de necrosis (A) y pleomorfismo (B) con la clasificación según los criterios de Miettinen.

II)-CLASIFICACIÓN SEGÚN LOS CRITERIOS DE FLETCHER Y MIETTINEN

En nuestra serie la valoración del riesgo tumoral se ha realizado a partir de las clasificaciones de Fletcher (tamaño y mitosis) y de Miettinen (tamaño, mitosis y localización). Por consiguiente, se ha realizado el estudio de asociaciones entre estas dos clasificaciones y así saber que diferencias o similitudes presentan ($p < 0,0001$). En la figura 57, destaca que el 94% de los casos clasificados en el grupo de alto riesgo de Miettinen también lo son en el de Fletcher. Las principales diferencias se obtienen en los grupos de muy bajo riesgo, bajo riesgo y riesgo intermedio, los cuales varían según la localización del tumor en la clasificación de Miettinen pero no en la de Fletcher.

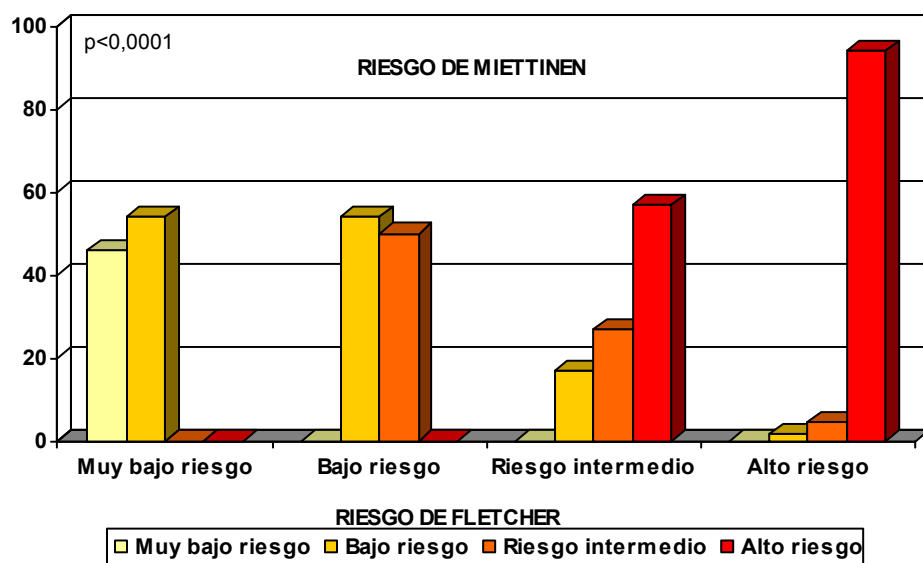


Figura 57: Asociación entre los grupos de riesgo según los criterios de Fletcher vs. los de Miettinen.

4.3. ASOCIACIONES DE LA PROGRESIÓN TUMORAL

A continuación incluimos las asociaciones entre los parámetros clínico-patológicos con la progresión de la enfermedad. En la tabla 19 se muestran de forma esquemática las principales asociaciones encontradas y que se exponen más detalladamente en los siguientes apartados.

4.3.1. PARAMETROS CLÍNICOS

- **SEXO** no se ha observado una significación de progresión tumoral en relación con el sexo de los pacientes.

- **EDAD** se advierte que los casos con una edad comprendida entre los 36-50 años son los que más frecuentemente recaen (42,9%) ($p=0,007$) y progresan (60,9%) ($p=0,002$); no obstante los casos con edades entre 51-70 años presentan también elevados porcentajes de recaída (36%) y progresión (48%). En menor número de eventos se encuentran los casos menores de 35 años (recaídas: 16,7% / progresión: 33,3%); por último, los casos que menos recaídas presentan (8,1%) y menos progresan (18,4%) son aquellos mayores de 71 años tal y como queda reflejado en la figura 58.

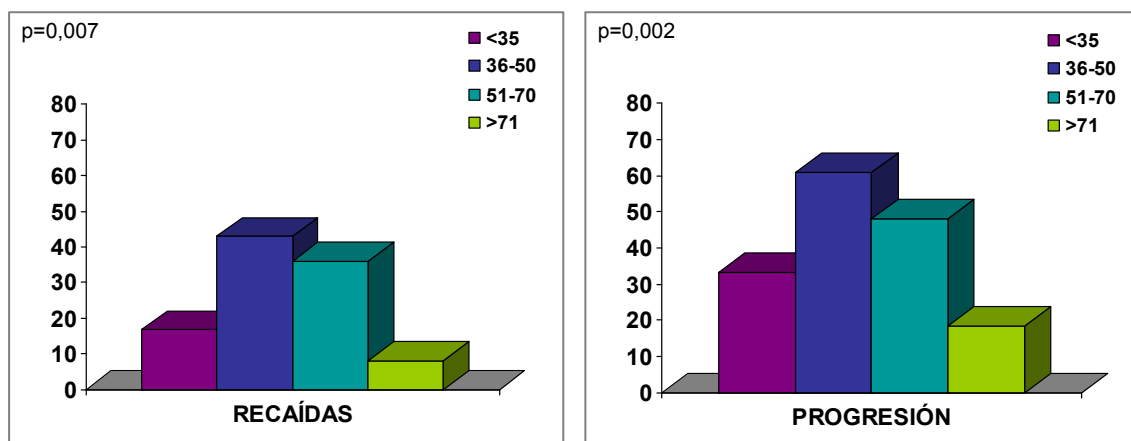


Figura 58: Gráfico del porcentaje de recaídas y progresión respecto a la edad de los pacientes; siendo muy similar el porcentaje de eventos entre los dos parámetros.

Tabla 19: Asociaciones realizadas entre los parámetros clínico-anatomopatológicos y la progresión tumoral con sus significaciones.

PARÁMETROS	TODOS LOS CASOS			NO TRATADOS CON GLIVEC			TRATADOS CON GLIVEC		
	Recalidas	Metástas.	Progres. Exitus	Recalidas	Metástas.	Progres. Exitus	Recalidas	Metástas.	Progres. Exitus
CLÍNICOS									
Sexo	0,741	0,313	0,289	0,892	0,464	0,534	0,690	0,811	0,660
Edad	0,007	0,086	0,593	0,024	0,133	0,021	0,173	0,138	0,270
Resección completa	0,002	0,724	<0,0001	0,046	0,838	0,285	0,183	0,538	0,820
Tratam. con Glivec	<0,0001	<0,0001	0,024	-	-	-	-	-	-
ANATOMOPATOLÓ.									
Tamaño	0,118	0,095	0,322	0,295	0,075	0,091	0,431	0,625	0,726
Tamaño<5/>5	0,021	0,021	0,196	0,296	0,075	0,091	0,431	0,621	0,726
Localización	0,057	0,170	0,481	0,009	0,375	0,003	0,491	0,392	0,284
Localiz.agrupados	0,067	0,162	0,196	0,009	0,148	0,002	0,736	0,610	0,919
Local.extragastróint.	0,110	0,049	0,374	0,593	0,650	0,417	0,316	0,152	0,346
Mitosis	0,013	<0,0001	0,0001	0,010	<0,0001	<0,0001	0,116	0,149	0,635
Mitosis<5/>5	0,018	<0,0001	<0,0001	0,006	<0,0001	<0,0001	0,431	0,49	0,916
Necrosis	0,238	<0,0001	0,025	0,947	<0,0001	0,006	0,978	0,523	0,719
Pleomorfismo	0,343	0,018	0,048	0,430	0,009	0,274	0,034	0,431	0,22
Histología	0,087	0,001	0,070	0,389	0,276	0,263	0,931	0,002	0,119
Grado Fletcher	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,008	0,001	<0,0001	0,255	0,118	0,040
Grado Miettinen	0,004	0,002	0,002	0,004	<0,0001	<0,0001	0,072	0,053	0,054

• RESECCIÓN NO COMPLETA

En los gráficos que componen la figura 59 se puede observar como existe significativamente mayor proporción de recaídas ($p=0,002$), progresiones ($p=0,054$) y exitus ($p<0,0001$) en el grupo de pacientes en los que no ha existido una resección completa del tumor. De este modo el porcentaje de recaídas en el grupo de tumores irreseccables es del 60% versus el 23% del grupo con resección completa y la misma tendencia se observa en el caso de las progresiones (62,5% vs. 37%) y muertes causadas por la enfermedad (73,3% vs. 26%).

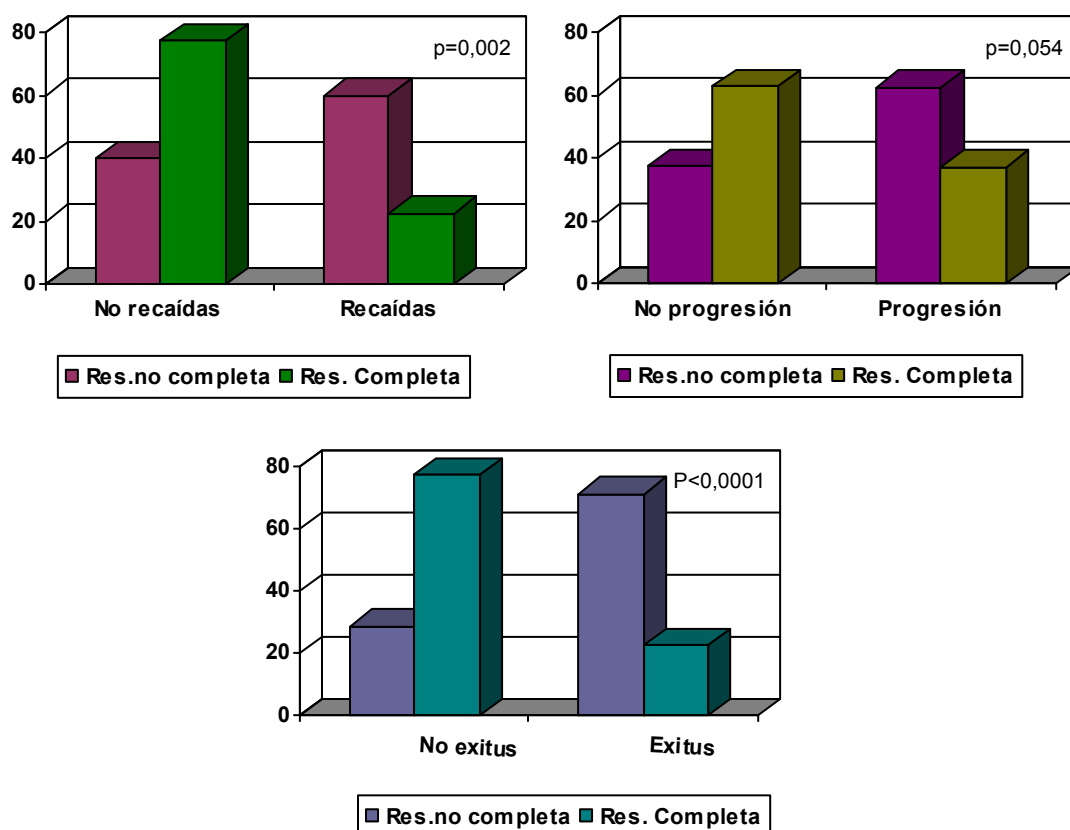


Figura 59: Correlación de los tumores irreseccables con la presencia de recaídas, progresión y exitus.

• TRATAMIENTO CON GLIVEC

Como se refleja en los gráficos que constituyen la figura 60 aquellos casos que no progresan en los diferentes eventos son en un alto porcentaje no tratados con Glivec y contrariamente los casos tratados, por ser aquellos de mayor riesgo y peor evolución, son los que recaen ($p<0,0001$), metastatizan ($p<0,0001$) y fallecen ($p=0,024$) con mayor frecuencia. Debido a esta diferencia

tan llamativa se realizó todo el estudio de correlaciones a los casos no tratados y a los casos tratados con Glivec; los resultados más significativos serán comentados en el estudio de la serie completa.

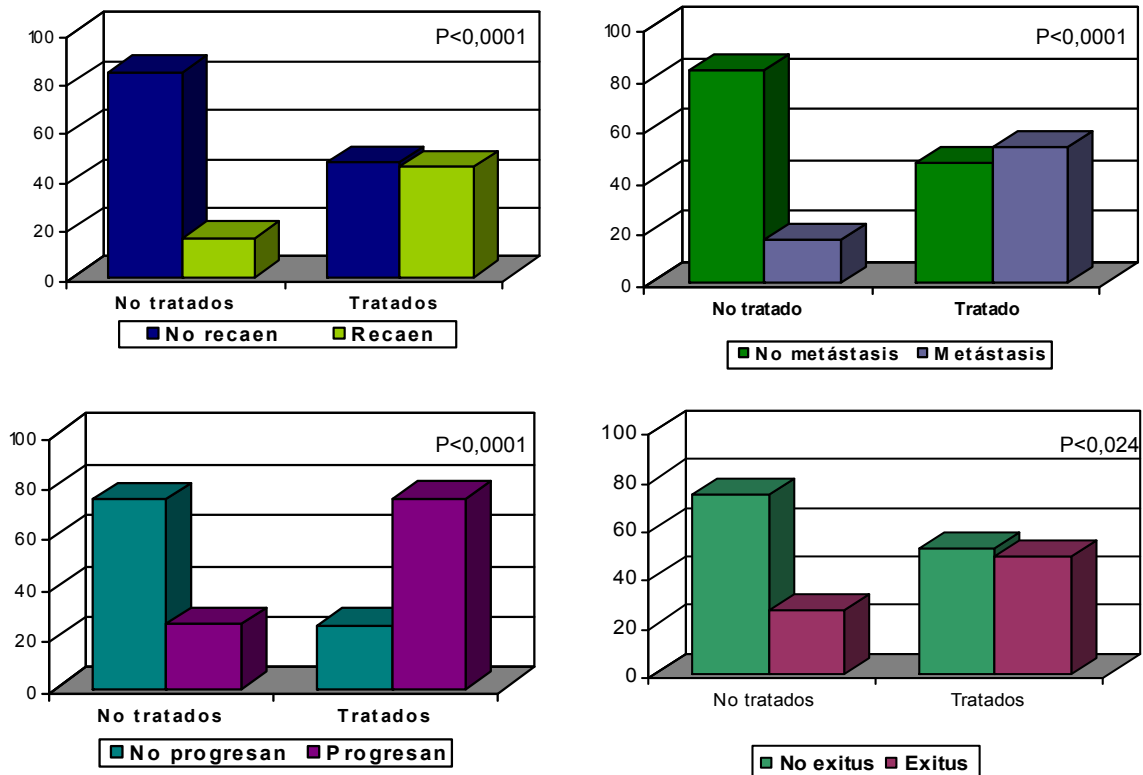


Figura 60: Imagen de los casos tratados y los eventos de recaídas, metástasis, progresión y exitus.

4.3.2-PARAMETROS ANATOMOPATOLÓGICOS

A) PARÁMETROS ANATOMOPATOLÓGICOS MACROSCÓPICOS

- **TAMAÑO:**

Debido a que el tamaño es uno de los parámetros que más pesa en el riesgo, junto a las mitosis, la resección no completa y la localización extragastrointestinal, es de esperar que el tamaño tumoral presente una asociación directa con la progresión ($p=0,036$). En el grupo de pacientes con tumores de mayor tamaño ($>5\text{cm}$) es donde se encuentran más eventos de progresión (Figura 61).

Al relacionar la media de los tamaños con la presencia de recaídas ($p=0,022$), de metástasis ($p=0,015$) y progresión ($p=0,006$) se aprecia que existe una presencia mayor de los tres eventos anteriores a mayor tamaño tumoral.

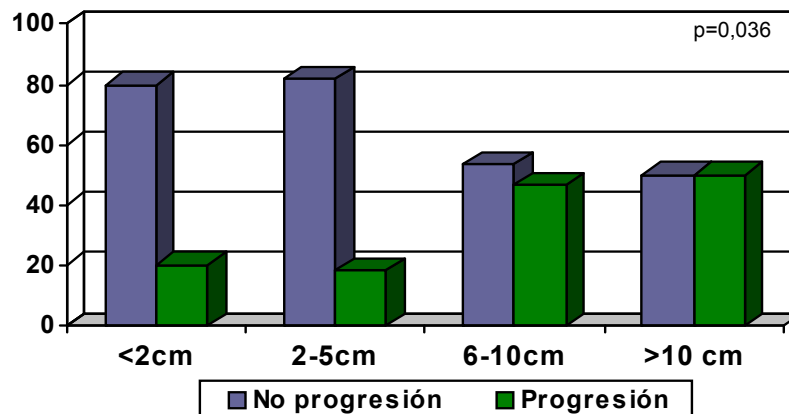


Figura 61: Asociación entre el tamaño tumoral y la progresión, destacando que los grupos que más progresan son los mayores de 5cm.

Debido a los resultados reflejados en la figura 61 es interesante analizar el tamaño en la agrupación según Miettinen (mayor o menor a 5cm) incidiendo que los casos que más recaen ($p=0,021$), metastatizan ($p=0,021$) o progresan ($p=0,004$) son aquellos con un tamaño mayor a 5 cm.; observándose únicamente 8 progresiones en pacientes con tumores menores de 5 cm., cuatro casos con recaídas y 4 con metástasis.

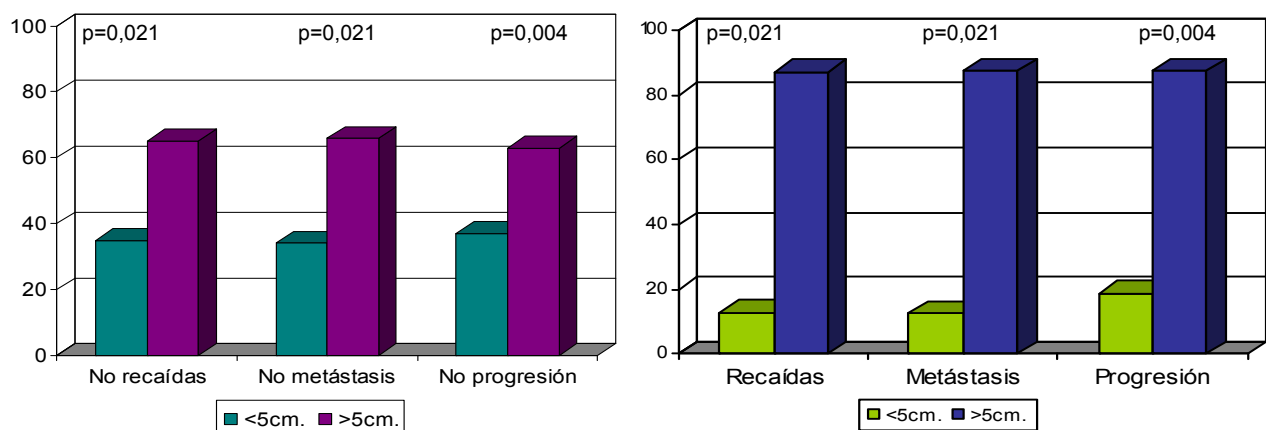


Figura 62: Evolución de los tumores según si los tumores son mayores o menores a 5cm.

• LOCALIZACIÓN

Se observa una asociación entre la localización del tumor y la presencia de recaídas ($p=0,057$); siendo las localizaciones extragastrointestinales y del intestino grueso las que presentan mayor número de recaídas ($>40\%$); sin embargo, los pacientes con GIST localizados en el estómago o intestino

delgado recaen menos del 23% y de los esofágicos no recae ninguno (Fig.63 A).

Cuando se analiza la progresión del tumor como evento ($p=0,032$) se observan prácticamente los mismos resultados; pero en la progresión muestran peor evolución los localizados en el intestino delgado (Fig.63 B). Cabe destacar que estos datos de la localización en la serie global muestran una significación aún mayor cuando se analizan únicamente los casos no tratados con Glivec tanto en las recaídas ($p=0,009$) como en la progresión ($p=0,002$).

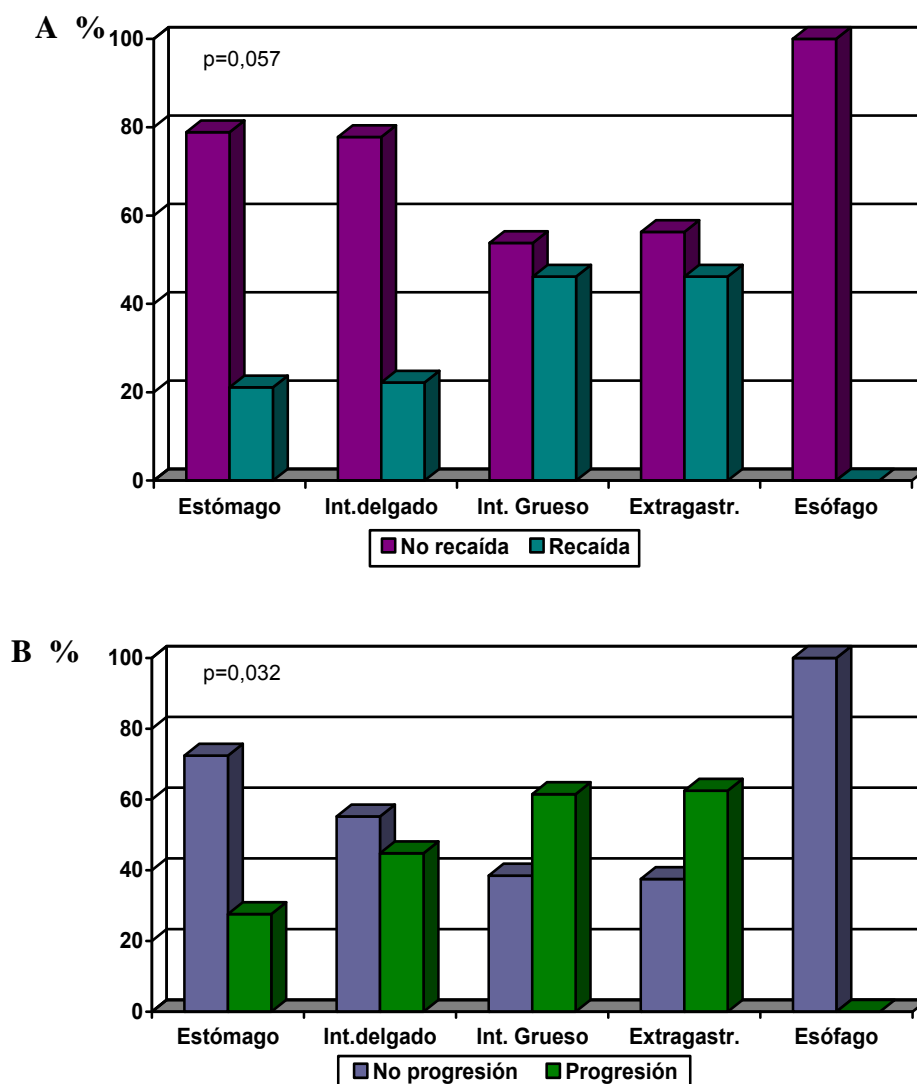


Figura 63: Representación de la correlación entre la localización tumoral y las recaídas (A) y la progresión (B).

• LOCALIZACIÓN EXTRAGASTROINTESTINAL

Debido a la mala evolución que presentan los casos extragastrointestinales analizamos éstos en un apartado a parte del resto de localizaciones; se

observa que aquellos casos que presentan una localización extragastrointestinal presentan un elevado porcentaje de metástasis (47,1%) ($p=0,049$). Aún mayor es la relación cuando se analiza la localización extragastrointestinal con respecto a la progresión tumoral; observando que un 62,5% de los casos extragastrointestinales progresan frente a un 37,5% de casos con otras localizaciones ($p=0,05$) (Fig.64).

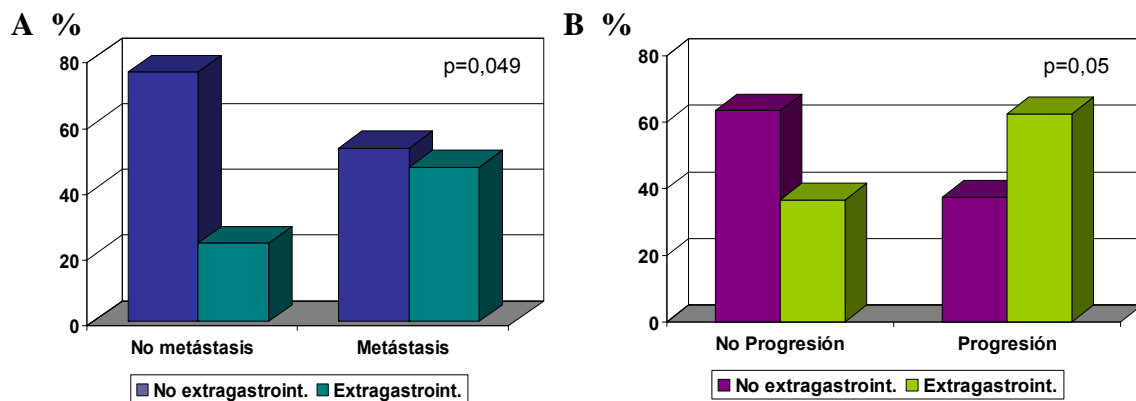


Figura 64: Representación de la localización extragastrointestinal y la evolución de metástasis (A) o progresión tumoral (B).

B) PARÁMETROS ANATOMOPATOLÓGICOS MICROSCÓPICOS

• TIPO HISTOLÓGICO

Al analizar los eventos de progresión respecto el tipo histológico, se detecta que existe una asociación significativa ($p<0,0001$) entre el tipo histológico y el riesgo de metástasis. En nuestra serie no hay ningún caso de histología epitelioide que metastatize. Por el contrario, se observa un mayor número de metástasis en GIST con histología mixta (36,7%) y fusocelular (63,3%). Estas diferencias son especialmente significativas en el grupo de pacientes tratados con Imatinib mesilato ($p=0,002$) donde la progresión de eventos de metástasis en el grupo de histología mixta es del 56,3 % frente a la morfología fusocelular (43,8%) y epitelioide (0%) ($p<0,0001$).

Los resultados obtenidos al estudiar la progresión son muy similares a los de las metástasis como se refleja en la figura 65 ($p=0,002$), los tumores con histología fusocelular son los que más progresan en un 66,7%, seguidos por los mixtos con un 28,9% y ahora además dos casos (4,4%) con histología

epitelioide progresan. Sin embargo no se ha obtenido una asociación con las recaídas o exitus.

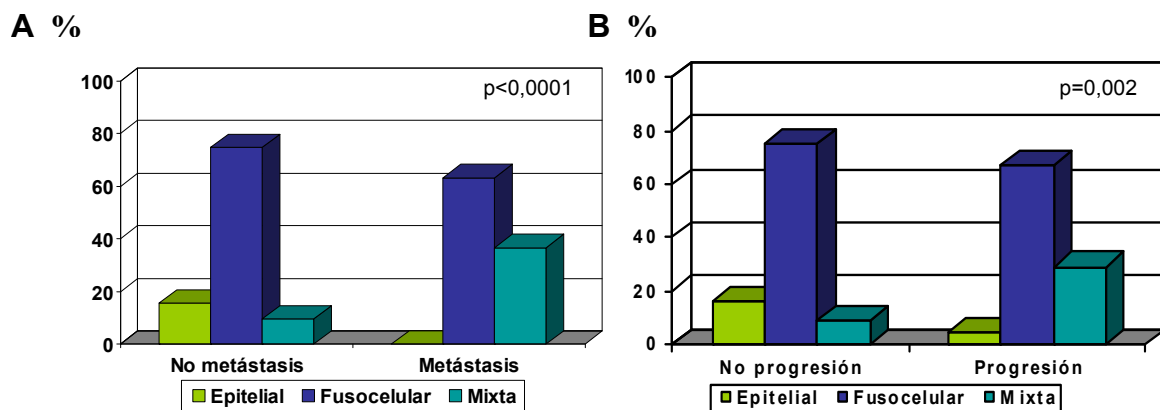


Figura 65: Correlación entre el tipo histológico y la presencia de metástasis (A) y progresión (B).

• MITOSIS

Al estudiar las asociaciones de progresión tumoral con el índice mitótico, se aprecia que el grupo de pacientes que desarrollan algún evento de progresión se caracterizan por presentar GIST con un alto índice mitótico ($p < 0,0001$); el mismo comportamiento se detecta en los casos que fallecen ($p < 0,0001$) sobretodo en el límite de más de 5 mitosis, como se aprecia en la figura 66, por lo que seguidamente analizamos las correlaciones con la clasificación de más o menos de 5 mitosis en 50 HPF. Aquellos pacientes con más de 5 mitosis por 50 HPF en el tumor recaen en un 56,7%, metastatizan en un 76%, progresan en un 64% y un 64% fallecen. ($p = 0,013$ / $p < 0,0001$ / $p < 0,0001$ / $p < 0,0001$) (Fig.67). Del mismo modo, al analizar la media de mitosis del estudio con la presencia o ausencia tanto de recaídas, como de metástasis, como de exitus se advierte que la media de mitosis es muy superior en presencia de los tres eventos como queda reflejado en la figura 68. El índice mitótico conjuntamente con el tamaño tumoral clasifican el riesgo de los tumores, por lo que un 51,6% de casos que presentan más de 5 mitosis son tratados con Glivec; opuestamente aquellos casos con menos de 5 mitosis no son tratados en un 67,4% ($p = 0,05$).

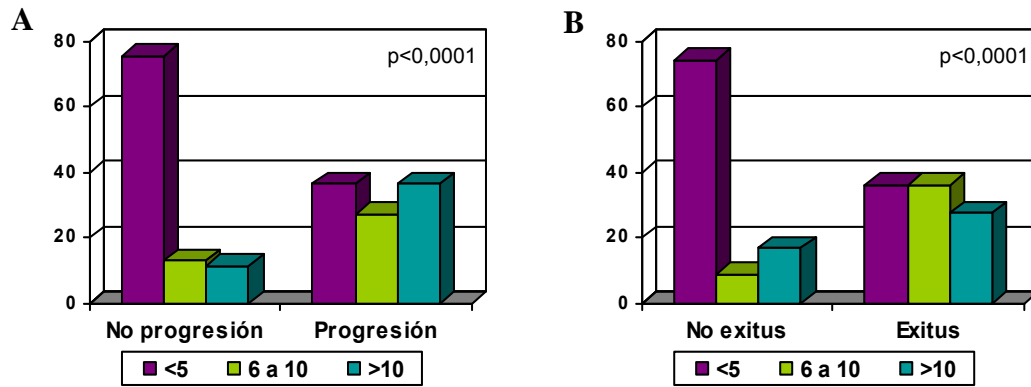


Figura 66: Representación de la progresión tumoral (A) y el exitus (B) de los casos respecto a la clasificación según Fletcher del número de mitosis presentes en el tumor.

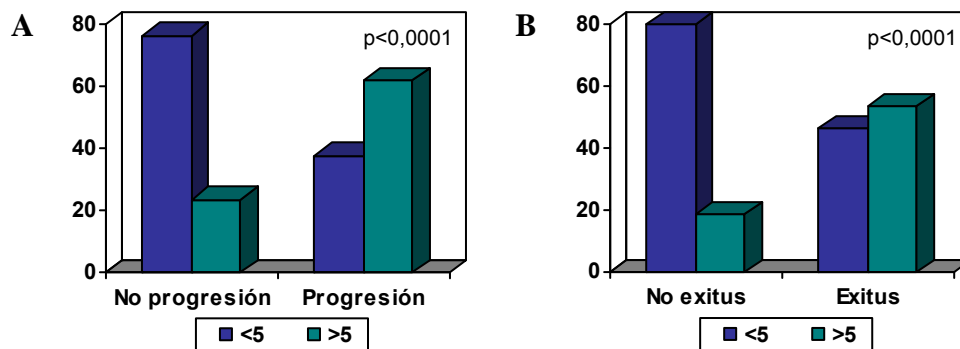


Figura 67: Representación de los casos con presencia de progresión (A) o de exitus (B) en función de si el conteaje de mitosis es superior o inferior a 5 mitosis en 50HPF.

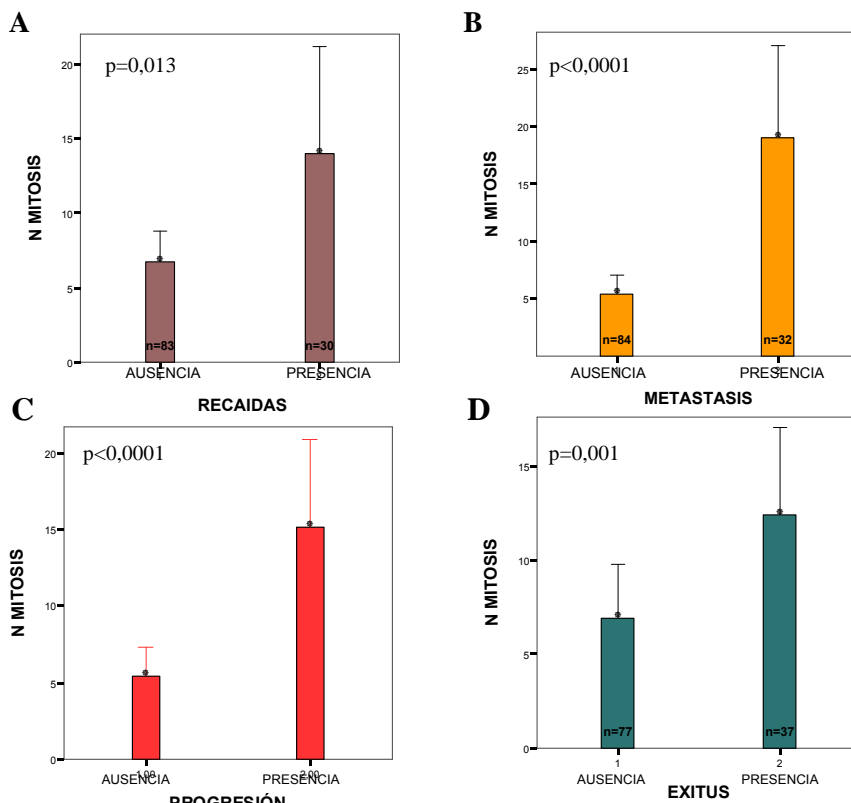


Figura 68: Asociaciones directas entre el nºmitosis y la presencia o ausencia de recaídas (A), metástasis (B), progresión (C) y exitus (D).

• NECROSIS

La presencia de necrosis se asocia significativamente con el desarrollo de metástasis ($p < 0,0001$). De hecho, un 46% de casos con presencia de necrosis desarrollan metástasis; y un 42,6% fallecen ($p = 0,025$) (Fig.69). Estos dos hechos tan significativos se deben al grupo de casos no tratados con glivec.

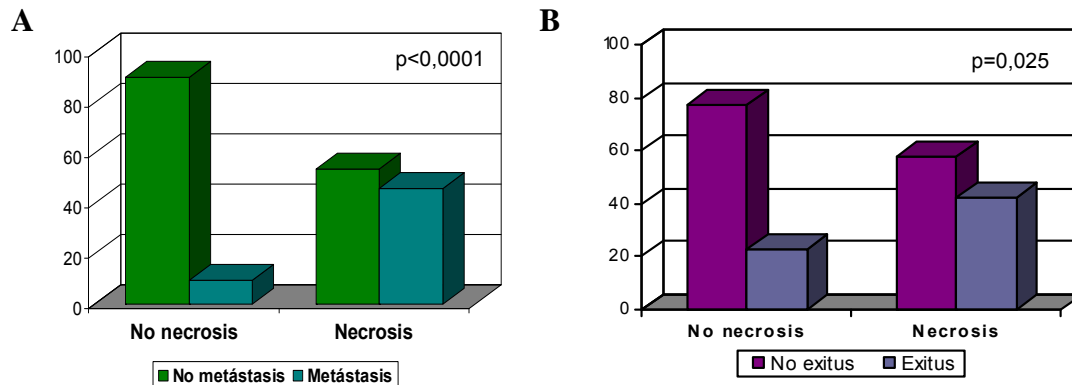


Figura 69: Presencia de necrosis en relación con la evolución de metástasis (A) y con el exitus de los pacientes (B).

• PLEOMORFISMO

Se observa un comportamiento muy similar a la presencia de necrosis con el pleomorfismo celular; un 36,7% de los casos que metastatizan presentan pleomorfismo ($p = 0,018$) y un 41% fallecen ($p = 0,048$) (Fig.70).

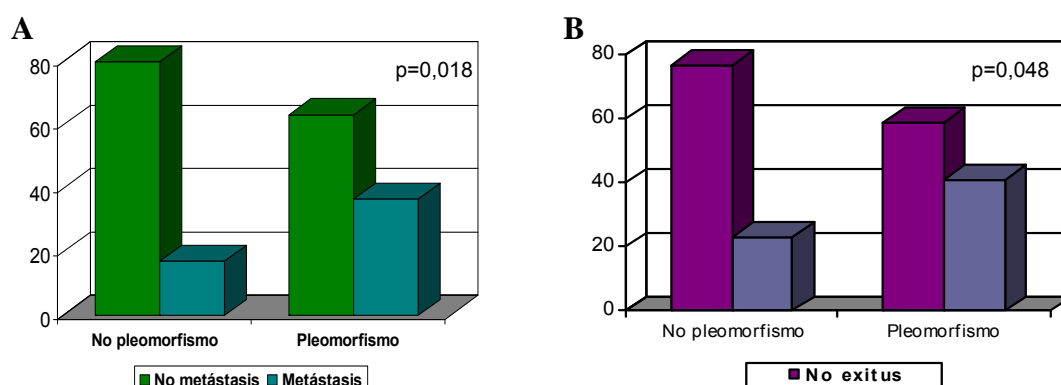


Figura 70: Presencia de pleomorfismo y la evolución de metástasis y exitus de los pacientes.

• RIESGO SEGÚN FLETCHER

Los casos que presentan evolución tumoral en cualquiera de los cuatro eventos estudiados tienen una alta asociación con el riesgo tumoral. Un 81% de los casos con recaídas son clasificados de alto riesgo, un 91% de pacientes con metástasis también se encuentran clasificados en este grupo de riesgo, un 83% de casos que progresan también y por consiguiente un 78% de los casos que fallecen también se encuentran clasificados de alto riesgo. En las clasificaciones de los casos que no evolucionan los porcentajes de los diferentes riesgos son muy similares ($p < 0,0001$). Estas significaciones se deben a que los casos que no son tratados con un riesgo alto tienen más frecuencia a los eventos de progresión (Fig.71).

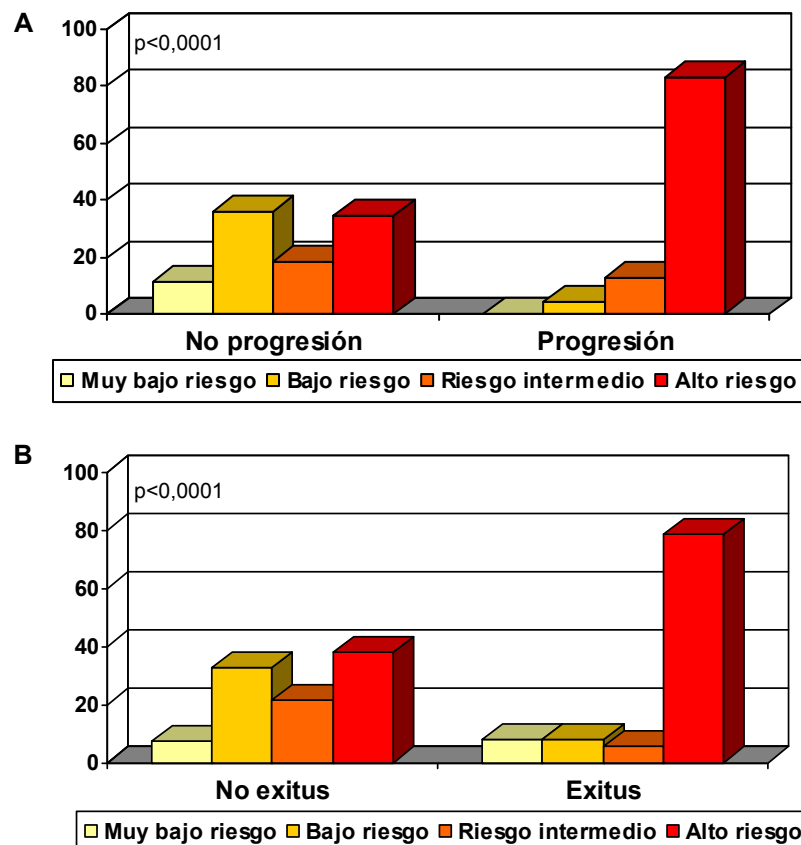


Figura 71: Correlación de los riesgos según los criterios de Fletcher y la presencia de progresión (A) y exitus (B).

- **RIESGO SEGÚN MIETTINEN**

Al analizar el riesgo según la clasificación de Miettinen ocurre exactamente el mismo comportamiento que observamos anteriormente en los grupos de riesgo según Fletcher, sin embargo prácticamente todos los casos tratados son también significativos para las recaídas, metástasis y progresión, por lo que la significación del conjunto global viene dada tanto por los casos no tratados con glivec como por los tratados. En la progresión tumoral más del 78% de los casos son clasificados de alto riesgo ($p < 0,0001$). Al analizar el exitus en la figura 72 observamos un comportamiento muy similar, 20 casos de los 29 casos que fallecen son clasificados de alto riesgo; frente a los 32 casos clasificados de bajo riesgo de 68 casos que no fallecen ($p = 0,002$).

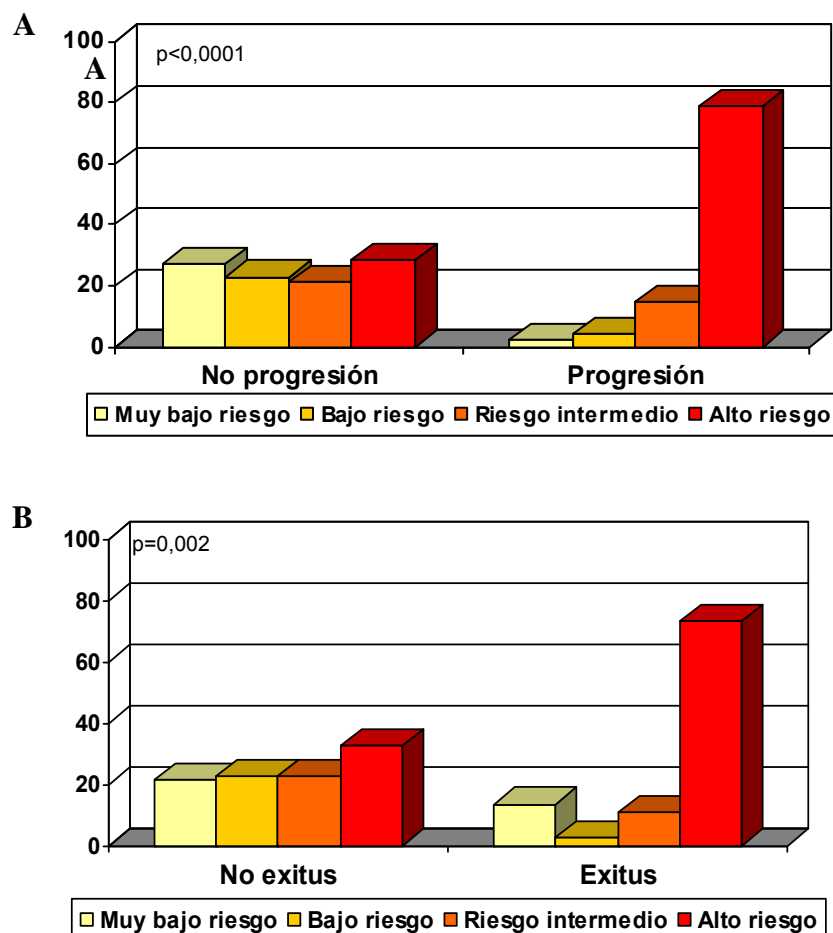


Figura 72: Correlación de los riesgos según los criterios de Miettinen y la presencia de progresión (A) y exitus (B).

4.4.-HALLAZGOS INMUNOHISTOQUÍMICOS

A continuación se procede a destacar los principales resultados de los diferentes marcadores inmunohistoquímicos utilizados entre los que se encuentran c-KIT, PDGFR α , CD34, AML, S-100, p53, KI 67, desmina, vimentina, cromogranina, MDM2, CD99 y PGP9,5. Además, se comentan las correlaciones más significativas halladas entre los marcadores inmunohistoquímicos con los parámetros clínicos y anatomopatológicos.

La evaluación de los casos se ha realizado basándose en la escala semicuantitativa previamente establecida en material y métodos.

La evaluación de las positividads de los marcadores inmunohistoquímicos del estudio retrospectivo se realizó mediante dos matrices tisulares. En aquellos casos que no ha sido posible realizar la evaluación en las matrices, porqué la inmunohistoquímica haya resultado no valorable (NV), debido a que la presencia de las células tumorales en el core tisular no alcanza el número mínimo de 100, o a causa de que estaba desintegrado o porque estaba conformado con tejido no tumoral; se ha procedido a realizar la inmunohistoquímica con el marcador fallido de manera individual, en la sección histológica completa.

Seguidamente destacamos los hallazgos inmunohistoquímicos (Tabla 20) para cada biomarcador incluyendo el análisis de frecuencias y una breve descripción de lo que se ha observado durante el análisis, con imágenes representativas de los diferentes marcadores.

Todos los controles tanto internos como externos, con su positividad o negatividad respondieron a los anticuerpos como se esperaba.

Tabla 20: Resumen de la frecuencia de la inmunoreactividad en el panel de biomarcadores evaluados en este estudio.

MARCADOR	NºCASOS	POSITIVO (%)	NEGATIVO (%)
c-KIT	144	91	9
PDGFR α	76	61,9	38,2
CD34	128	67,7	32,3
AML	122	58,3	41,7
DESMINA	114	20,5	79,5
VIMENTINA	81	99,4	5,1
S-100	121	38,3	61,7
KI-67	105	52,9	41,7
CROMOGRANINA	82	22	78
SINAPTOFISINA	75	16	84
PGP9,5	29	86,2	13,8
CD99	72	56,3	43,7
MDM2	59	43,1	56,9
P53	80	42,3	57,7

4.4.1- c-KIT (CD117).

El marcador por excelencia de los GIST es c-KIT (CD 117); se ha considerado positivo cuando se ha detectado tinción citoplasmática/ de membrana en las células tumorales. Podemos destacar que un 91% de los tumores son positivos a c-KIT; de los cuales tienen una expresión intensa 79 casos (54%), 31 tienen una expresión moderada (22%) y 21 una expresión débil (15%). Trece casos (9%) de GIST han resultado ser negativos para este marcador pero con la ayuda de otros marcadores como el CD34 ó las mutaciones presentes en el gen *c-KIT* o *PDGFR α* se pudo confirmar su diagnóstico (Fig. 73 y 74).

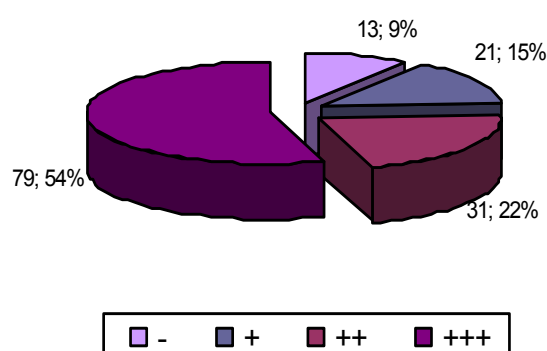


Figura 73: Representación de las diferentes positividades de c-KIT en la serie analizada.

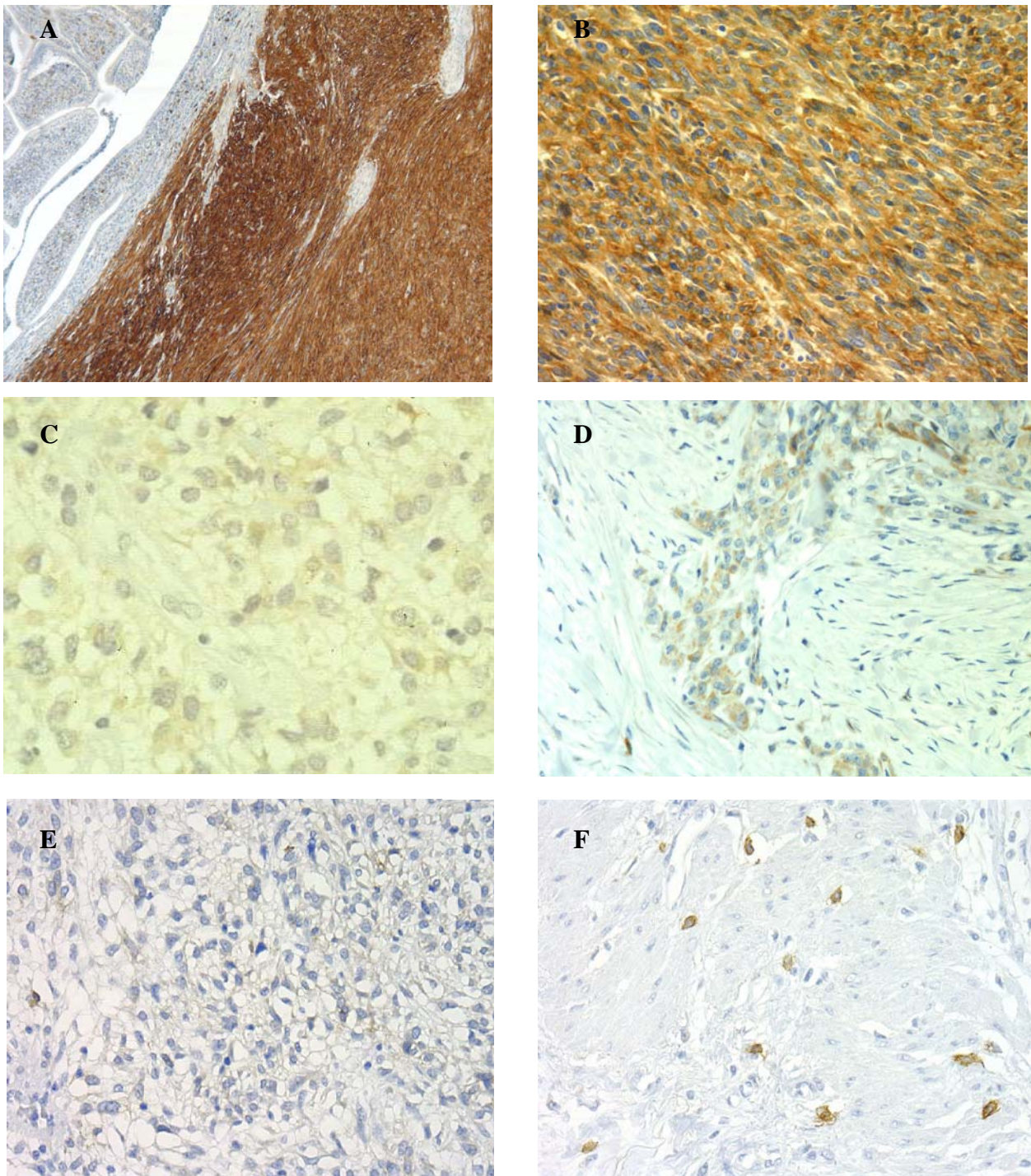


Figura 74: Imágenes de diferentes grados de expresión para el marcador CD 117 (c-KIT). (A Y B) GIST con positividad muy intensa a 10X y 20X, (C) moderadamente positivo a 40X, (D y E) positivo débil a 20, (F) Negativo a 20X con control interno en los mastocitos.

4.4.2- CD34.

La proteína CD34 ha sido considerada positiva cuando se ha detectado tinción citoplasmática/membrana en las células tumorales (Fig.75); siendo el 67,7% de los GIST de nuestra serie positivos a este antígeno con diferentes grados de intensidad, reflejados en la tabla 21.

Tabla 21: Positividades de CD34 en la serie.

CD34	Nº	Positivos %
-	43	32,3
+	12	10,2
++	25	19,7
+++	53	37,8

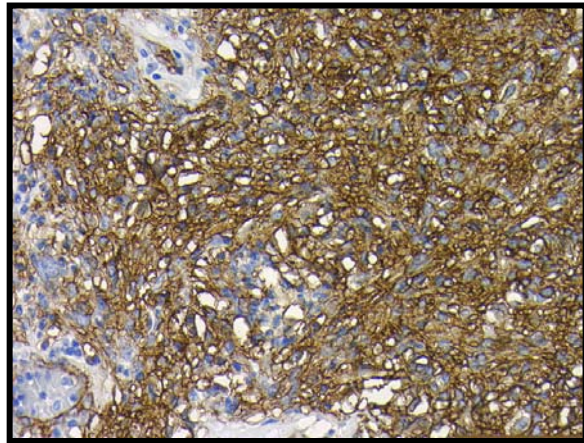


Figura 75: Imagen de un GIST con intensa positividad para CD 34 a 10X.

Al analizar las correlaciones del marcador **CD34** se ha hallado que los casos localizados en el **estómago** presentan en un 84,4% positividad para dicho marcador, siendo la intensidad media o elevada en un 76,5% de todos los casos positivos. Como se puede ver en la figura 76 el intestino delgado y el resto de localizaciones presentan expresión en aproximadamente el 50% de los casos ($p < 0,0001$).

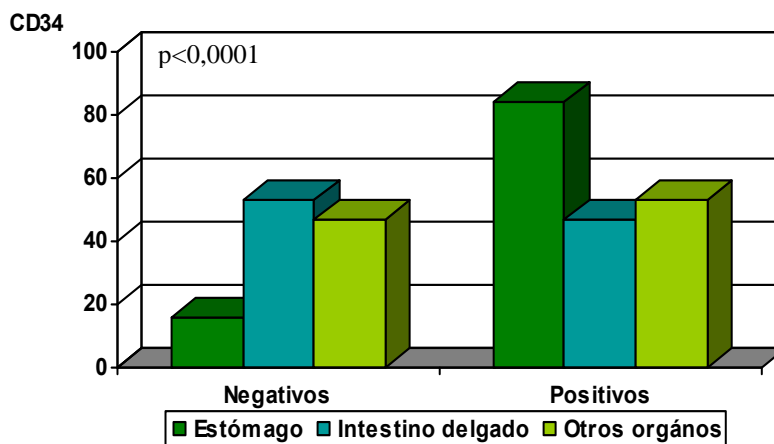


Figura 76: Expresión del marcador CD34 en las diferentes localizaciones, destacando la positividad de los casos localizados en el estómago.

4.4.3- ACTINA DEL MÚSCULO LISO

Se ha observado que un 58,3% de los casos expresan tinción citoplasmática para el marcador AML en las células tumorales de la serie analizada (Tabla 22 y Fig.77). No encontramos ninguna asociación con los parámetros anatomopatológicos estudiados.

Tabla 22: Positividades de AML en la serie.

AML	Nº	Positivos %
-	49	41,7%
+	27	20,8%
++	23	18,3%
+++	25	19,2%

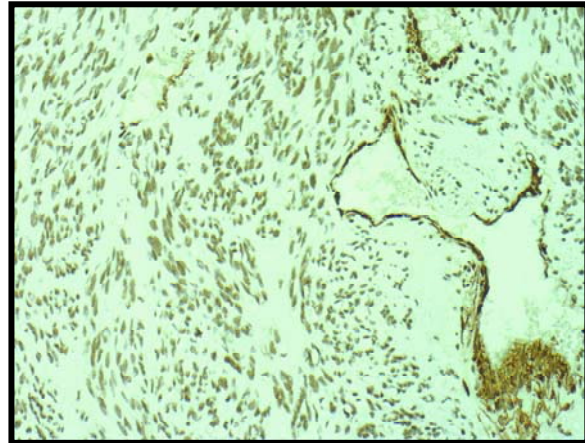


Figura 77: Imagen de un GIST positivo para AML a 10X.

4.4.4- DESMINA

La expresión inmunohistoquímica de la desmina ha sido considerada positiva cuando se ha observado tinción citoplasmática. Se ha dado en un 20,6% de los casos; siendo un 79,5% negativos para este marcador (Tabla 23 y figura 78).

Tabla 23: Positividades de desmina en la serie.

DESMINA	Nº	Positivos %
-	94	79,5
+	11	9,8
++	5	4,5
+++	7	6,3

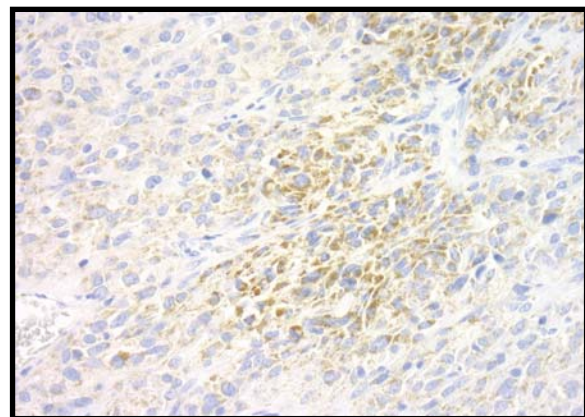


Figura 78: Positividad débil de desmina para un GIST a 20X.

4.4.5- VIMENTINA

En la serie el 95% de los casos han sido positivos con tinción citoplasmática para el marcador de la vimentina (Tabla 24 y figura 79).

Tabla 24: Positividades de vimentina en la serie.

VIMENTINA	Nº	Positivos %
-	5	5,1
+	10	12,8
++	20	25,6
+++	47	56,6



Figura 79: Positividad muy intensa de vimentina para un GIST a 10X.

4.4.6- S-100

La expresión de S-100 se ha considerado positiva en un 36,4% de los casos cuando observamos tinción nuclear. De los 44 casos positivos cuatro son diagnosticados como GANT (“Tumor neural autonomic gastrointestinal”) (Tabla 25 y figura 80).

Tabla 25: Resultados del marcador S-100 en la serie.

S-100	Nº	Positivos %
-	78	63,6
+	24	19,8
++	16	10,3
+++	6	3,4

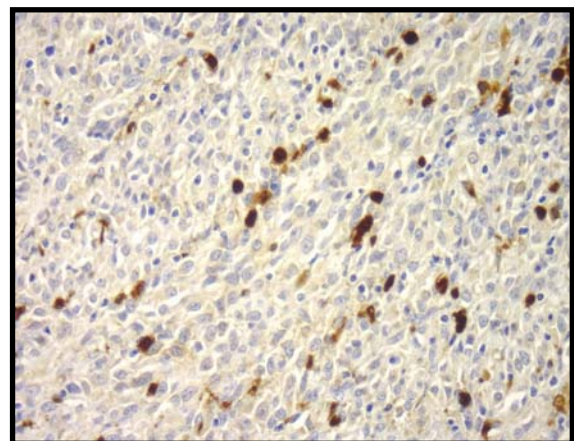


Figura 80: Positividad muy intensa de S-100 en un GANT a 10X.

Del mismo modo que existe una asociación entre CD34 y la localización del tumor en el estómago también la encontramos entre el marcador neural **S-100** y la localización del **intestino delgado**, siendo un 67,9% de los casos con dicha localización positivos para S-100. Contrariamente, S-100 es negativa en la mayoría de casos localizados en el estómago (70,5%) y el resto de localizaciones (78,1%) ($p < 0,0001$) (Fig.81).

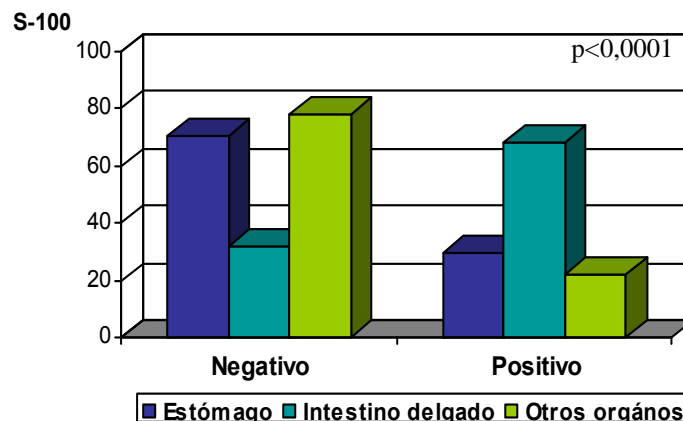


Figura 81: Expresión del marcador S-100 en las localizaciones de los tumores GISTs.

4.4.7- PDGFR α

La expresión inmunohistoquímica del PDGFR α ha sido considerada positiva cuando se ha observado tinción citoplasmática/ membrana en las células tumorales. Se ha obtenido una positividad de un 61,9%, con una distribución de 16 casos (21,1%) con expresión débil, 17 casos (22,4%) con intensidad moderada y 14 casos (18,4%) con alta intensidad. Un 66,6% de casos con celularidad epitelial han sido positivos para este marcador (Tabla 26 y Fig.82).

Tabla 26: Positividades de PDGFR α en la serie.

PDGFR α	Nº	Positivos %
-	31	39
+	18	23
++	17	21
+++	14	17

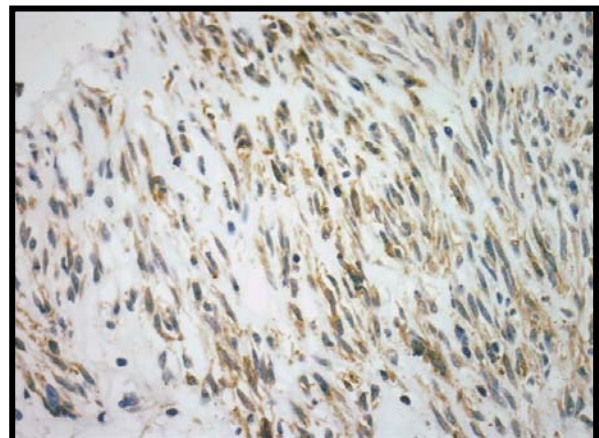


Figura 82: Imagen representativa de un GIST PDGFR α moderadamente positivo a 20X.

4.4.8- KI-67

La actividad proliferativa de nuestra serie la determinamos mediante detección inmunohistoquímica de Ki-67. Consideramos positivos los casos cuando $>5\%$ de las células tumorales muestran tinción nuclear y $\leq 5\%$ de núcleos teñidos, como positivo muy débil diferenciándolos de los casos totalmente negativos. En nuestra serie se ha detectado expresión de Ki-67 en el 54% de los casos; en 16 casos con positividad en más de un 5% de las células tumorales y 41 en menos del 5% (Tabla 27 y Fig.83).

Tabla.27: Positividad para Ki-67 en la serie.

KI-67	Nº	Positivos %
-	50	46
<5%	42	39
>5%	16	15

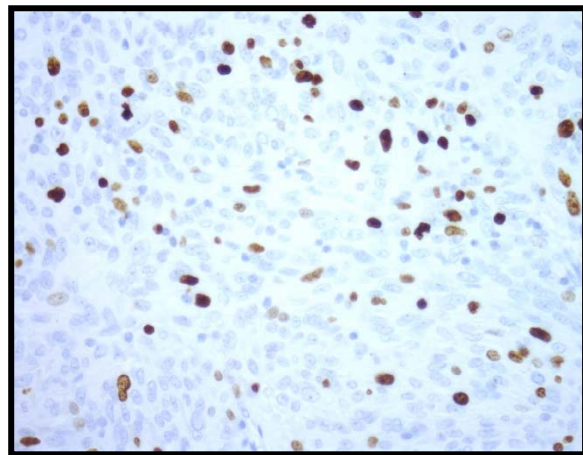


Figura 83: Positividad de Ki-67 $> 5\%$ para un GIST a 10X.

Observamos una asociación directa entre la expresión de **Ki-67** con el **tamaño tumoral** (Fig.84).

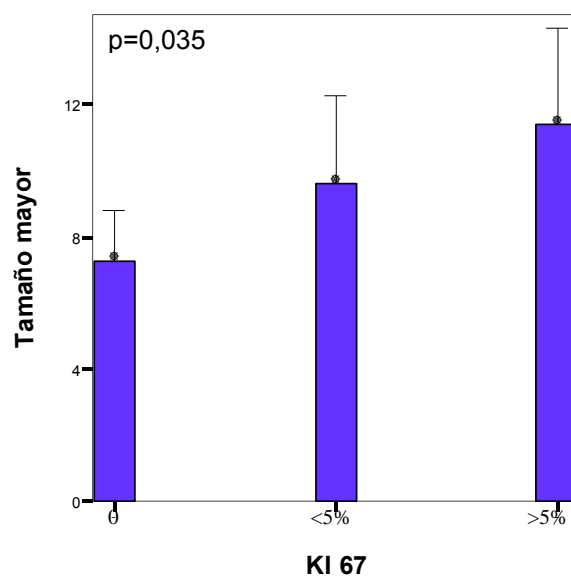


Figura 84: Correlación entre el tamaño tumoral y la expresión de Ki-67.

Cómo era de esperar, también se ha observado una asociación directa entre la expresión de **Ki-67** y las **mitosis** presentes en el tumor. El 50,9% de los casos con positividad para Ki-67 presentan más de 5 mitosis en 50HPF y contrariamente un 83,3% de casos negativos para el marcador presentan menos de 5 mitosis. ($p < 0,0001$) (Fig.85).

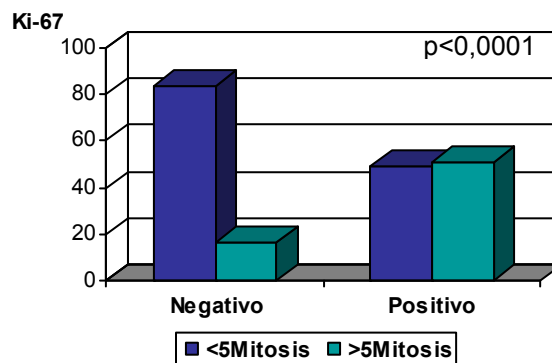


Figura 85: Asociación directa entre el índice proliferativo Ki-67 y el número de mitosis en las neoplasias.

Cuando estudiamos la correlación entre la expresión de **Ki-67** con la **clasificación** de riesgo según **Miettinen** ; destaca que el 79% de los casos con expresión mayor al 5% del marcador son clasificados de alto riesgo y un 21% de riesgo intermedio, sin embargo no hay ningún caso clasificado de bajo o muy bajo riesgo. Cuando se observa la Fig.86 también son clasificados de alto riesgo un 45% de los casos con expresión de Ki-67 en menos de 5% de núcleos celulares. Por el contrario, los casos negativos para Ki-67 presentan porcentajes similares en los tres primeros grupos de riesgo y en menor número en el de alto riesgo ($p = 0,001$) (Figura 86).

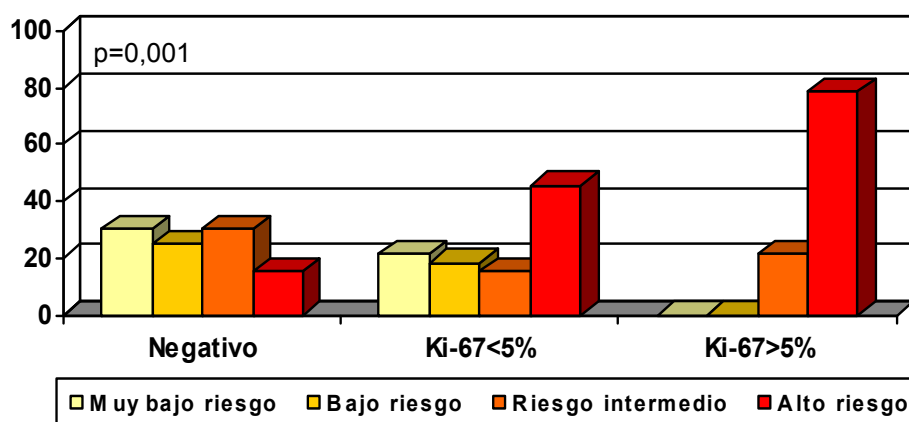


Figura 86: Asociación de la expresión de Ki-67 y la clasificación de riesgo según los criterios de Miettinen; destaca que los casos con una expresión mayor al 5% del marcador de proliferación celular son clasificados en su mayoría de alto riesgo.

4.4.9- CROMOGRANINA

En la serie analizada, un 22% de casos presentan positividad citoplasmática para la cromogranina; un 15,9% de los casos expresan el marcador débilmente (Tabla 28 y figura 87). No se ha observado ninguna asociación con parámetros clínicos e histopatológicos.

Tabla.28: Positividad para cromogranina.

CROMO	Nº	Positivos %
-	65	78
+	13	15,9
++	4	4,9
+++	1	1,2

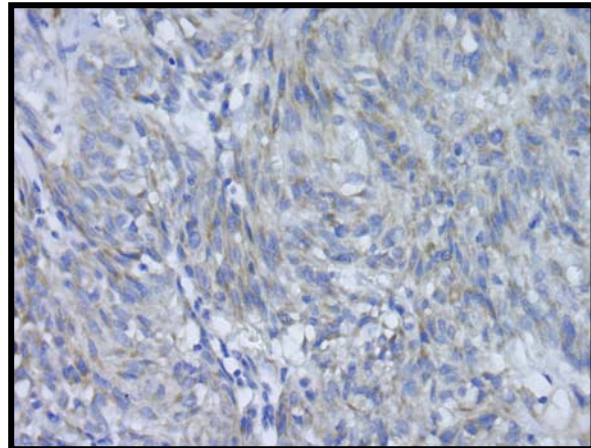


Figura 87: Positividad débil de cromogranina para un GIST a 10X.

4.4.10- SINAPTOFISINA

La expresión inmunohistoquímica de la sinaptofisina se ha considerado positiva cuando observamos tinción citoplasmática. La gran mayoría de los casos (84%) han sido negativos para este marcador (Tabla 29 y figura 88).

Tabla.29: Positividad para sinaptofisina.

SINAPTOFISINA	Nº	Positivos %
-	65	84,3
+	9	15,7
++	2	4,8
+++	1	1,2

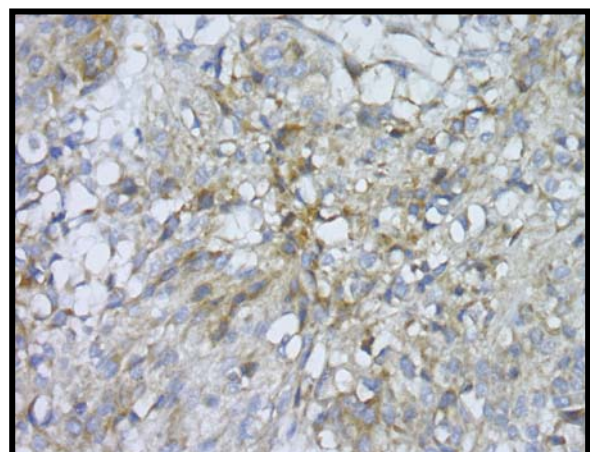


Figura 88: Positividad moderada de sinaptofisina para un GIST a 10X.

4.4.11- PGP9.5

Se ha observado en un 86,2% de positividad citoplasmática en las células tumorales para el marcador inmunohistoquímico PGP 9,5 (Tabla 30 y figura 89).

Tabla.30: Positividad HIQ para PGP 9,5.

PGP9,5	Nº	Expresión %
-	4	12,9
+	2	6,5
++	7	22,6
+++	18	58,1

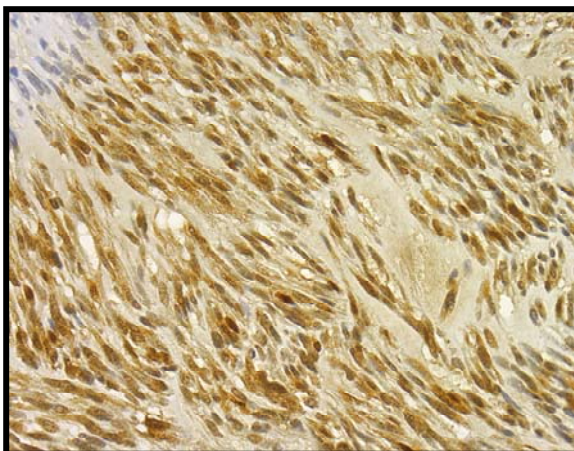


Figura 89: Positividad muy intensa de PGP9.5 para un GIST a 10X.

4.4.12- CD99

La expresión inmunohistoquímica de CD99 ha sido considerada positiva cuando observamos tinción citoplasmática en las células tumorales. Siendo positivos un 56,3% de los casos (Tabla 31 y figura 90).

Tabla.31: Positividad HIQ para CD99

CD99	Nº	Expresión %
-	31	41,9
+	18	24,3
++	14	18,9
+++	11	14,9

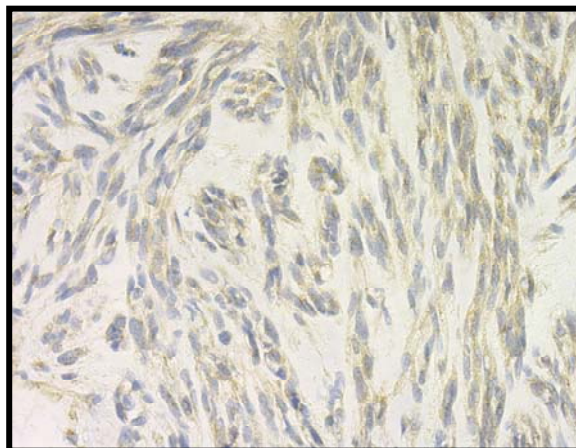


Figura 90: Positividad moderada de CD99 a 20X.

4.4.13- P53

La expresión inmunohistoquímica de p53 en nuestra serie es de un 42,3 % y su localización es siempre nuclear en las células tumorales (Tabla 33 y figura 91).

Tabla 32: Positividad para p53 en la serie.

P53	Nº	Positivos %
-	45	57,7
+	27	33,3%
++	7	6,4%
+++	2	2,6%

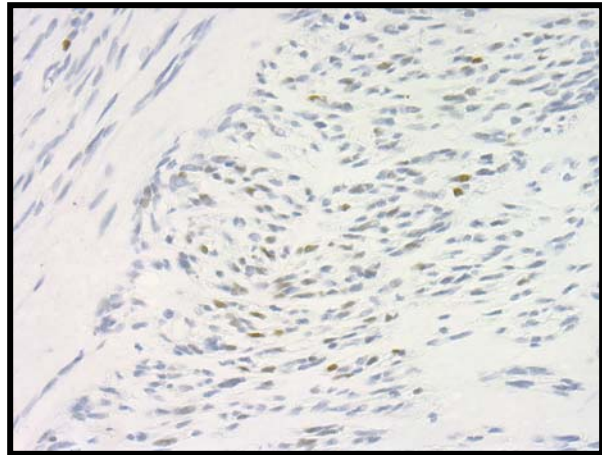
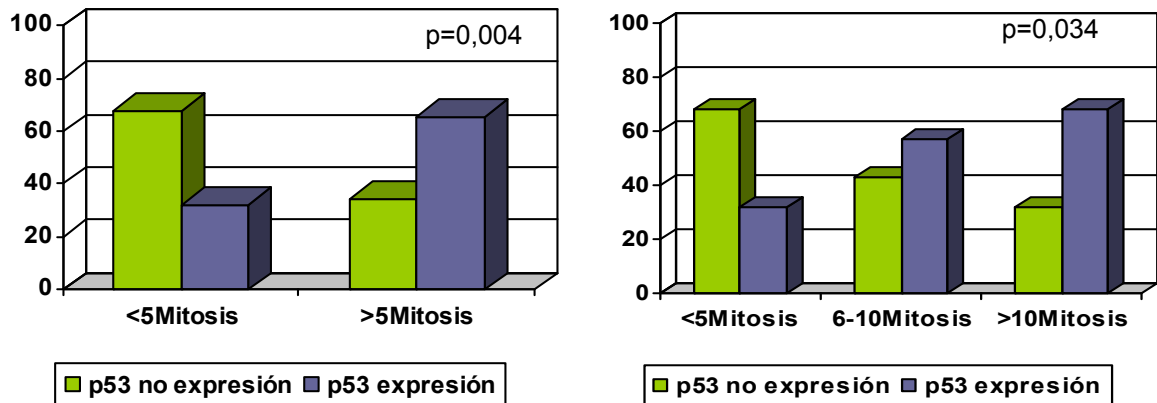


Figura 91: Positividad débil de p53 a 10X.

Existe una correlación directa entre la expresión de **p53** y el número de **mitosis**. El 68% de los casos con ausencia de expresión en p53 tienen menos de 5 mitosis en 50HPF y un 65,5% de casos con expresión de p53 presentan más de 5 mitosis (Fig.92). Además, analizadas en conjunto, aquellos GIST con expresión de p53 muestran mayor número de mitosis (Fig.93).



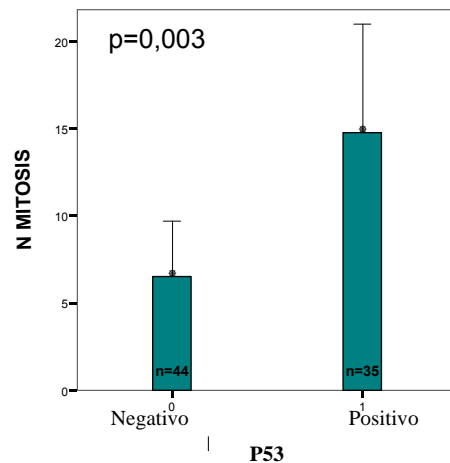


Figura 93: Asociación entre el la media de mitosis y la positividad del marcador p53.

La expresión de **p53** está inversamente relacionada con la clasificación de **bajo riesgo** según los criterios de Fletcher y además observamos que en aquellos casos que sí expresan p53 más del 72% son clasificados de riesgo alto ($p=0,022$) (Fig.94).

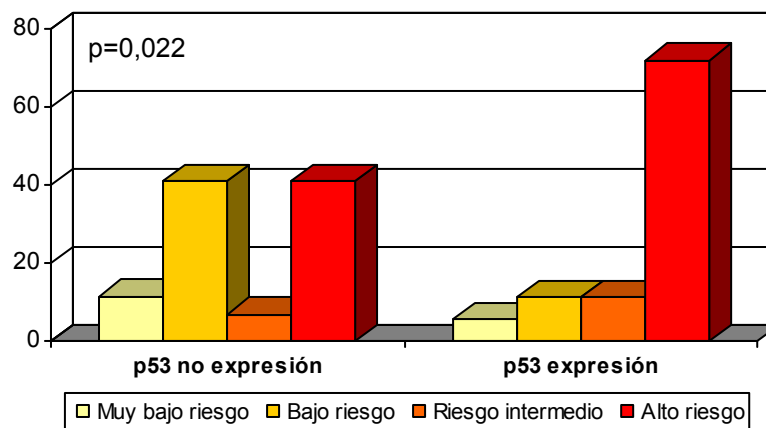


Figura 94: Asociación directa entre la expresión de p53 y el riesgo según Fletcher.

Al igual que acabamos de observar en la clasificación de Fletcher, según la clasificación de Miettinen también encontramos una asociación con la expresión de p53 (Fig. 95). Observamos como los casos negativos para p53 se caracterizan por ser tumores de bajo riesgo y viceversa.

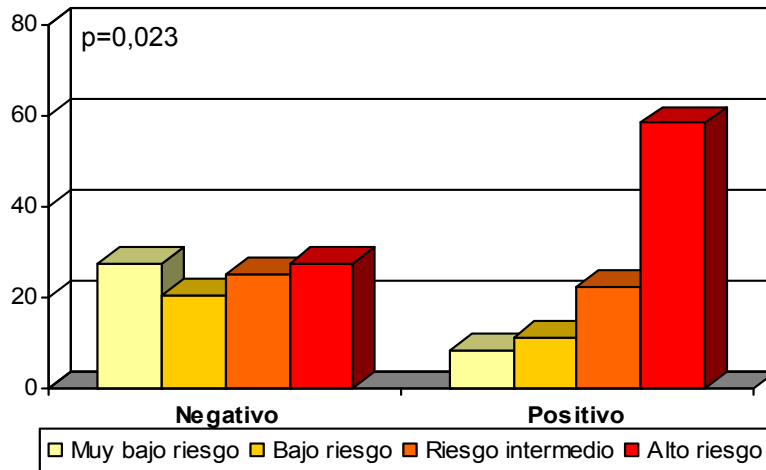


Figura 95: Correlación entre la expresión de p53 y el riesgo según Miettinen.

También se ha detectado una correlación entre la presencia de expresión de **p53** con la expresión de **Ki-67**; se observa que a medida que aumenta la expresión de Ki-67 mayor es el número de casos que expresan p53 (Fig. 96) ($p=0,005$).

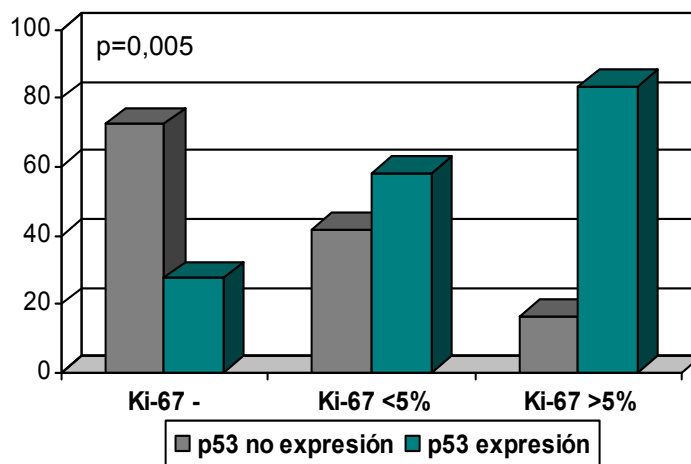


Figura 96: Correlación entre la expresión de Ki-67 y p53.

4.4.14- MDM2

La expresión inmunohistoquímica de MDM2 ha sido considerada positiva cuando observamos tinción nuclear en las células tumorales. En nuestra serie son positivos un 43,1% de los tumores (Tabla 32 y Fig.97). Cabe destacar que el marcador MDM2 no ha sido valorado en los dos arrays a causa de una tinción inespecífica en todos los casos.

Tabla 33: Positividad HIQ para MDM2

MDM2	Nº	Positivos %
-	25	42,4
+	9	15,3
++	8	13,6
+++	17	28,8

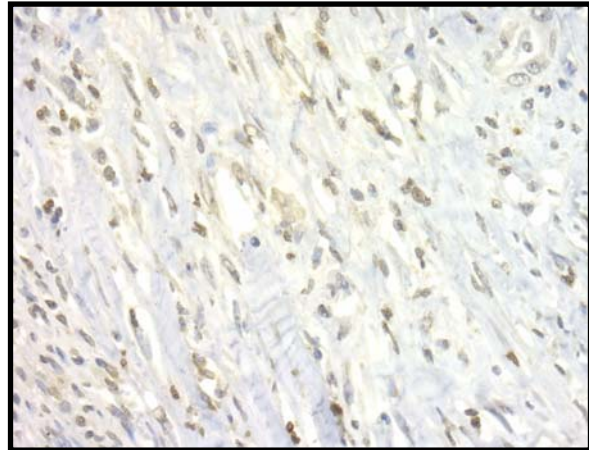


Figura 97: Positividad moderada de MDM2 a 10X.

Se ha observado una asociación directa entre el marcador **MDM2** y la expresión de **P53**, en la figura 99 se observa que cuando p53 es negativa el 66,66% de casos también lo son para MDM2 ($p=0,012$).

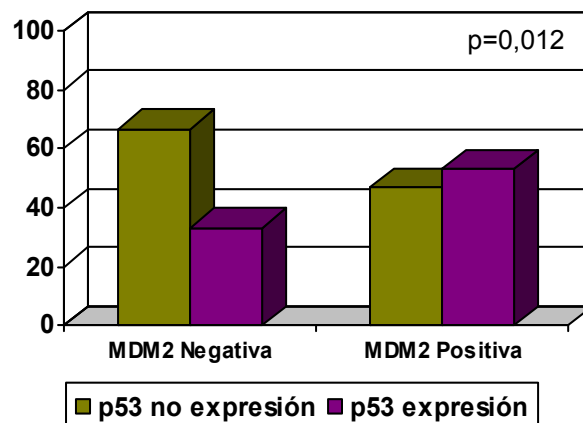


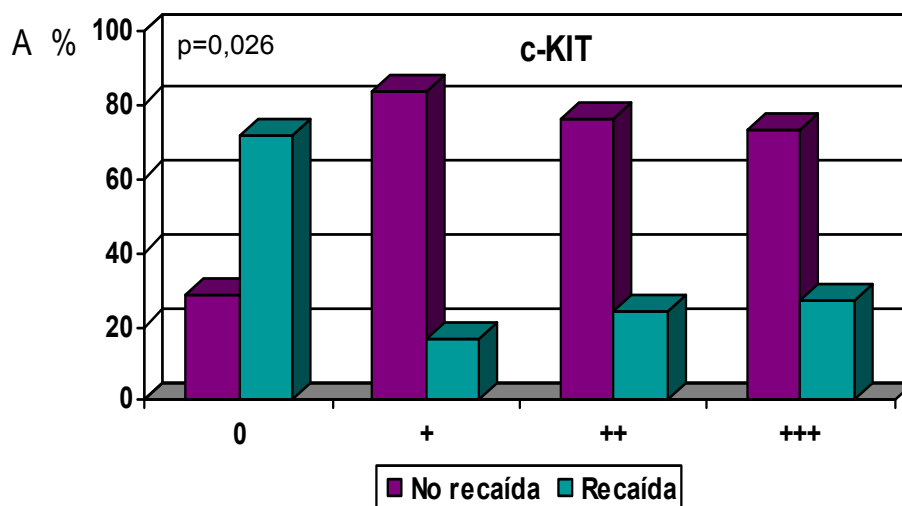
Figura 98: Asociación entre el marcador inmunohistoquímico MDM2 y la presencia de expresión de p53.

4.5-PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD CORRELACIONADA CON LOS MARCADORES IHQ

Al analizar las correlaciones existentes entre los marcadores con los eventos de progresión tumoral (recaídas, metástasis, progresión y exitus), como queda reflejado en la tabla 34 prácticamente no se han obtenido resultados significativos en ninguno de los tres grupos analizados: serie global, casos no tratados con Glivec y casos tratados. Cabe destacar que no se ha observado ninguna asociación entre la inmunohistoquímica y los eventos de progresión tumoral en el grupo de pacientes tratados con Glivec. Seguidamente procedemos a comentar los hallazgos más significativos.

- **c-KIT**

Como se puede apreciar en la figura 99 los casos negativos para el marcador c-KIT presentan un alto porcentaje de recaídas (71,4%) y también de progresión (72,8%); contrariamente los porcentajes en los casos positivos para c-KIT se encuentran por debajo del 42% en las diferentes positividadades tanto a nivel de progresión ($p=0,045$) como por debajo del 26% a nivel de recaídas ($p=0,026$).



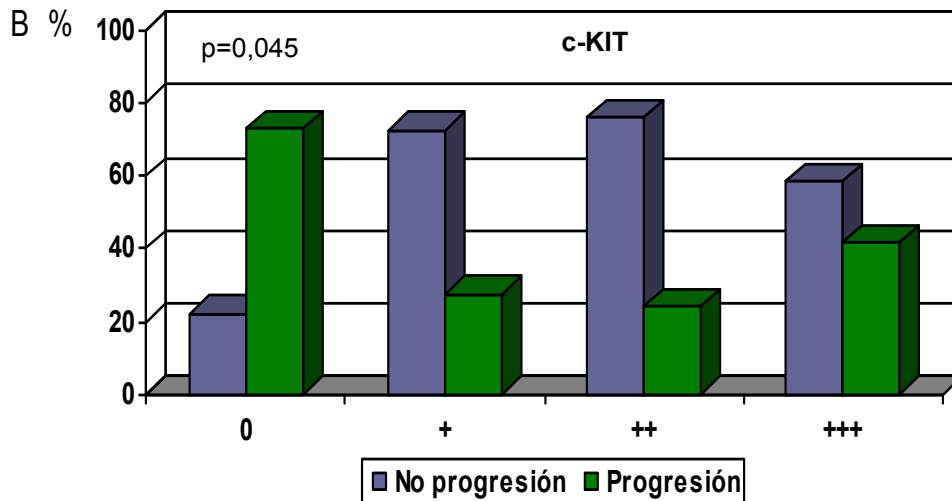


Figura 99: Asociaciones directas entre las recaídas (A) y la progresión (B) con la expresión del marcador c-KIT, destacando que los casos negativos presentan un porcentaje mayor de eventos.

Cuando se analiza el marcador c-KIT con la presencia de metástasis se aprecia a diferencia de los resultados obtenidos en recaídas y progresión, que el 71,4% de las metástasis expresan muy intensamente el marcador, en comparación con un 47,6% de los casos que no presentan metástasis ($p=0,07$) (Fig.100).

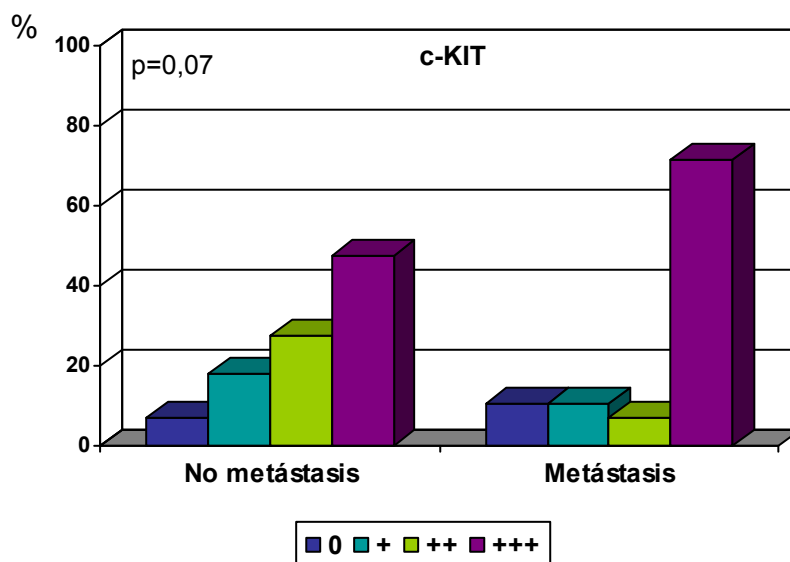


Figura 100: Expresión de c-KIT y la presencia de metástasis.

Tabla 34: Significación de las recaídas, metástasis, progresión y exitus con los marcadores inmunohistoquímicos en la serie global, los casos no tratados y los casos tratados con Glivec.

PARÁMETROS	SERIE GLOBAL				NO TRATADOS CON GLIVEC				TRATADOS CON GLIVEC			
	Recaídas	Metástasis	Progresión	Exitus	Recaídas	Metástasis	Progresión	Exitus	Recaídas	Metástasis	Progresión	Exitus
MARCADORES HIQ												
c-KIT	0,045	0,07	0,026	0,847	0,013	0,104	0,015	0,836	0,383	0,145	0,9	0,637
PDGFR α	0,497	0,895	0,266	0,418	0,672	0,967	0,881	0,487	0,172	0,688	0,203	0,186
CD34	0,165	0,656	0,239	0,518	0,054	0,565	0,318	0,536	0,666	0,5	0,905	0,706
AML	0,111	0,564	0,539	0,086	0,527	0,766	0,801	0,122	0,077	0,403	0,414	0,382
Desmina	0,037	0,352	0,243	0,477	0,694	0,485	0,609	0,403	0,275	0,367	0,170	0,397
Vimentina	0,392	0,725	0,268	0,408	0,436	0,661	0,359	0,504	0,316	0,518	0,856	0,551
S-100	0,470	0,306	0,348	0,127	0,892	0,156	0,767	0,346	0,546	0,705	0,687	0,463
KI-67	0,401	0,010	0,008	0,246	0,684	<0,0001	0,015	0,105	0,486	0,801	0,481	0,576
Cromogranina	0,430	0,262	0,166	0,271	0,686	0,145	0,264	0,548	0,494	0,599	0,154	0,502
Sinaptofisina	0,031	0,424	0,199	0,210	0,122	0,674	0,310	0,575	0,346	0,223	0,875	0,239
PGP9,5	0,582	0,412	0,373	0,123	0,715	0,385	0,343	0,147	0,324	0,568	0,190	0,157
CD99	0,591	0,348	0,780	0,371	0,998	0,111	0,361	0,087	0,245	0,815	0,466	0,239
MDM2	0,859	0,618	0,419	0,717	0,222	0,485	0,186	0,653	0,325	0,5	0,737	0,325
P53	0,605	0,329	0,376	0,802	0,606	0,817	0,923	0,412	0,890	0,203	0,215	0,801
P53 agrupada	0,811	0,132	0,176	0,450	0,502	0,502	0,858	0,140	0,732	0,111	0,554	0,1

- **CD34**

La asociación que hemos observado entre la expresión de CD34 y las recaídas sólo ha sido significativa en los casos no tratados con glivec. Observando que la negatividad del marcador CD34 está asociada con un mayor porcentaje de recaídas en un 57% (Fig.101).

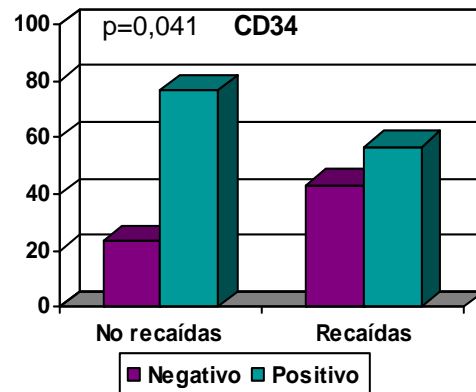


Figura 101: Imagen de la positividad del marcador CD34 y la presencia de recaídas en los casos no tratados con Glivec.

- **Ki-67**

Al analizar los eventos de progresión de la enfermedad con el marcador proliferativo Ki 67 se observa que un 75% de los casos que desarrollan metástasis expresan el marcador. Por el contrario, los pacientes que no desarrollan metástasis tienen tumores que expresan Ki-67 en un 50% de los casos ($p=0,010$). Al analizar la progresión tumoral se aprecia un comportamiento similar al que acabamos de ver, un 56,1% de casos que no progresan expresan Ki 67 frente a un 76,6% en el grupo que progresa ($p=0,008$) (Fig.102).

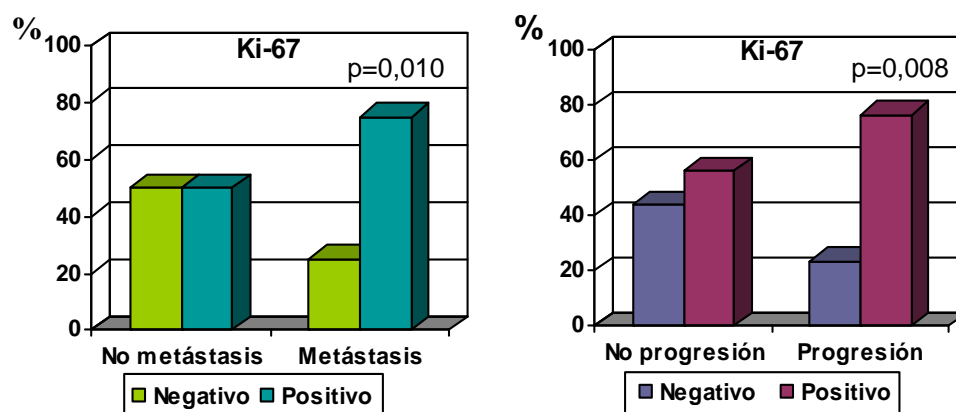


Figura 102: Representación de la positividad del marcador Ki-67 y la presencia de metástasis y progresión.

- **SINAPTOFISINA**

Se aprecia una asociación directa entre la expresión de sinaptofisina y la presencia de eventos de recaída, de modo que en el grupo de pacientes que no recaen la expresión de sinaptofisina es del 9,3% frente al 21,2% del grupo de pacientes que recaen (Fig.103).

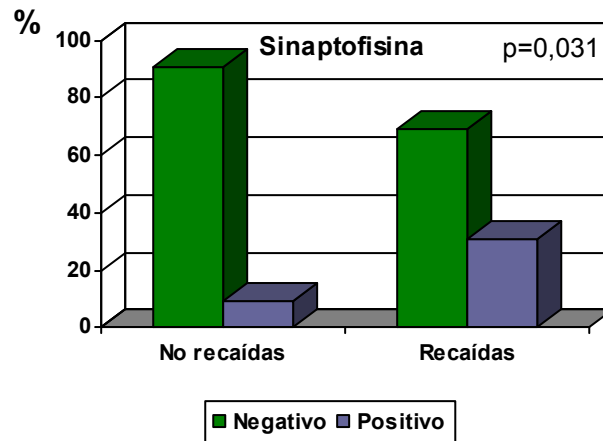


Figura 103: Representación de la negatividad de la sinaptofisina y la ausencia de recaídas.

4.6-HALLAZGOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

A continuación se procede a comentar los hallazgos obtenidos en el estudio molecular de los exones 9, 11,13 y 17 de *c-KIT* y 12 y 18 de *PDGFR α* .

Debido a que los casos diagnosticados antes de 1998 se incluyen dentro del global de casos comentados, seguidamente realizamos un pequeño resumen de los hallazgos moleculares de este subgrupo de casos. Del total de 31 casos analizados de este subgrupo se han encontrado 15 mutaciones (48%), 12 localizadas en el exón 11 de *c-KIT* y tres en el exón 18 de *PDGFR α* .

En el total de los casos hemos encontrado un total de noventa y seis mutaciones primarias de los ciento cuarenta y cinco pacientes (66%) y dos secundarias (mutaciones adquiridas en la progresión del tumor diferentes a las primarias y que proporcionan una mayor agresividad). Ochenta y siete (91%) se localizan en el gen *c-KIT* y únicamente 9 mutaciones en el gen *PDGFR α* (9%).

Las mutaciones en *c-KIT* ocurren con mayor frecuencia en el exón 11 con un total de 76 mutaciones (80% del total de mutaciones), seguidas de las 8 encontradas en el exón 9 de *c-KIT* (8% del total de mutaciones), dos en el 17(2%) y una en el exón 13(1% del total de mutaciones). Respecto al gen *PDGFR α* , hemos encontrado nueve mutaciones en el exón 18 (9% del total de mutaciones) (Fig. 104); cabe destacar que se ha encontrado una mutación en el exón 12 pero corresponde a un pólipo fibroide inflamatorio el cual no es incluido dentro de la serie y será comentado posteriormente. Además, en dos pacientes se ha encontrado una doble mutación en el gen *c-KIT* con diferentes exones implicados que posteriormente también serán comentados.

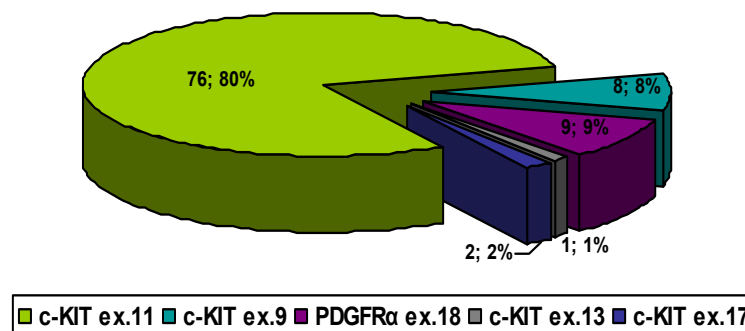


Figura 104: Distribución de las mutaciones según el exón afectado.

4.6.1- *c-KIT*

Pasamos ahora a detallar las mutaciones encontradas en cada uno de los exones de *c-KIT*, cuya distribución aparece reflejada en la Fig.105.

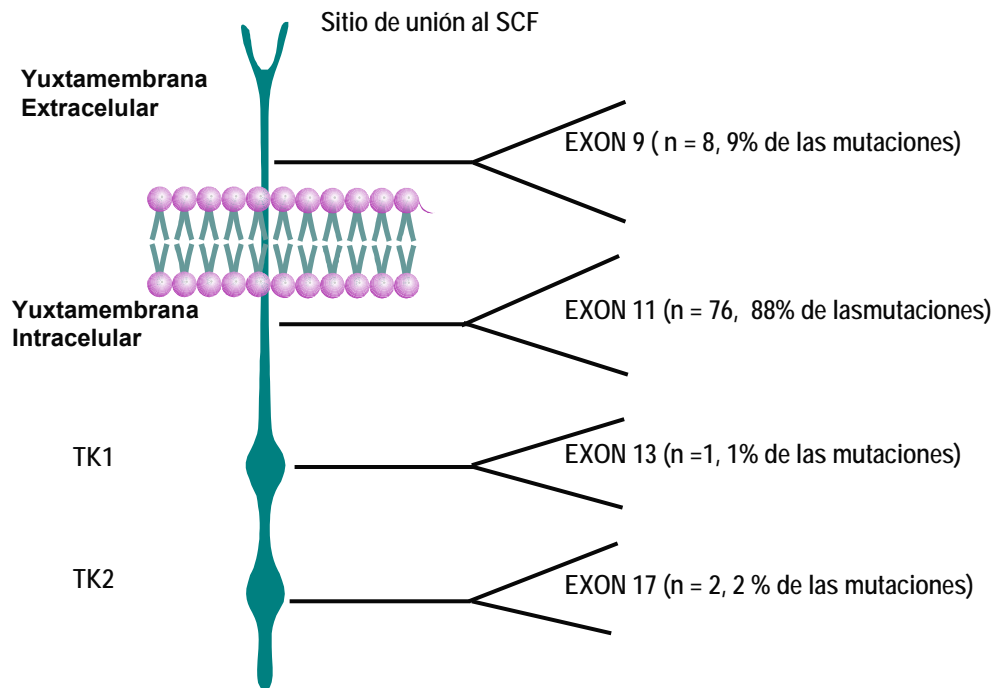


Figura105: Distribución de los porcentajes de las mutaciones en el gen *c-KIT*.

A) Mutaciones en el exón 11.

De las setenta y seis mutaciones halladas en el exón 11, 72 corresponden a tumores primarios, tres a recaídas y una a metástasis. Uno de los casos, no estudiado en el tumor primario, es un caso consulta en el que no ha sido posible acceder al tumor primario y confirmar la mutación descrita. En otro de los casos, el tumor primario no se encontraba mutado pero la recaída sí; el tercer caso pertenecía a un caso consulta en el que se empezó el seguimiento en la recaída y se pudo confirmar la mutación con las metástasis posteriores. El último caso, donde se localiza la mutación en la metástasis, será comentado posteriormente con duplicación en el exón nueve y en la metástasis adquisición de la mutación en el exón 11.

Ha habido 13 casos en los que hemos podido realizar el seguimiento de la enfermedad y hemos podido confirmar las mutaciones primarias en las recaídas o metástasis, Además en aquellos casos que previamente a la extirpación del tumor se les realizaba una biopsia para confirmar la posible

malignidad de la lesión, se estudiaba el estado mutacional y posteriormente se confirmaba en la pieza del tumor.

En el exón 11 encontramos los siguientes tipos de mutaciones (Fig.106): 45 casos presentaron **deleciones intersticiales** (59%), donde se han visto afectados desde los codones 550 al 579 (Fig.112), siendo los codones más frecuentemente afectados el 557, el 558 y el 559 con una gran diferencia respecto al resto (Fig. 107 y Fig.112). Eventualmente también hemos hallado deleciones en los codones 573-577 y 579 (Fig.108). Las deleciones intersticiales pueden afectar un único codón o hasta 20 codones, siendo el número de codones delecionados más frecuente el de dos. Además de las deleciones intersticiales hemos encontrado diecisiete **mutaciones puntuales** (22%) las cuales se concentran en los codones 557 (3 casos), 559 (7), 560 (3), 567 (1) y 576 (3). Hemos observado una mutación puntual en el codón 557 dando origen a un codón stop, el codón más afectado por las mutaciones puntuales es el 559 (Fig.109).

Nueve casos presentan **deleciones más mutaciones puntuales** (12%), las deleciones ocurren en todo el exón, siendo más frecuentes en la región comprendida entre los codones 550-572 y las mutaciones puntuales se concentran en los codones 553 (1 caso), 557 (3), 559 (2), 565 (1) y 575 (1) (Fig.110). De todos estos codones los que se encuentran más afectados son los codones 557 y 559.

Otra alteración que podemos encontrar en el exón 11 son las **duplicaciones intersticiales** (7%), éstas únicamente se producen en la región comprendida entre los codones 573-591, implicando cualquier codón de esta región (Fig.112). En concreto se han encontrado cinco duplicaciones; de las cuales dos afectan a los codones 575 y 576 y una de ellas presenta además una mutación puntual en el codón 574 Thr (ACA) > Pro (CCA). De las otras tres duplicaciones, una duplica desde el codón 573 al 578, otra empieza en el mismo codón anterior pero finaliza en el 580 y la última es la duplicación más grande iniciándose en el codón 577 hasta el 591 (Fig.111).

Observando los resultados obtenidos en el exón 11 podemos distinguir dos regiones, una primera que abarcaría desde los codones 550-572 y una segunda región entre los codones 573 y 591. En la primera región se concentrarían las deleciones y mutaciones puntuales sobretodo y en la segunda todas las duplicaciones más alguna deleción o mutación puntual, se puede apreciar este hecho en la figura 112.

Cabe destacar que los codones que con más frecuencia se ven afectados de mutaciones son el 557, 558 y 559; estando implicados en 39 mutaciones el codón 557, en 40 el 558 y en 27 el 559; destacando que tanto en el codón 557 y 559 se describen mutaciones puntuales y deleciones pero en el codón 558 sólo hay deleciones (Fig.112).

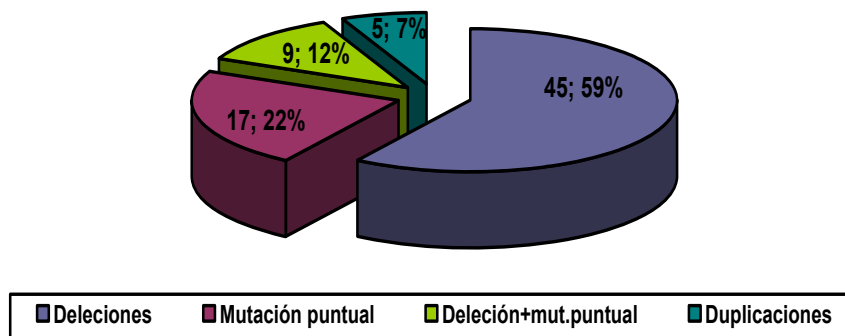


Figura 106: Distribución de las mutaciones presentes en el exón 11 de *c-KIT* en nuestra serie.

En la serie se han descrito cinco mutaciones en **homocigosis**; todas ellas corresponden a la primera región del exón. De las cinco, dos corresponden a la deleción de los codones 557-558, otra además de ser portadora homocigota de esa deleción tiene una mutación puntual del codón 559 Val (GTT)> Phe (TTT); otro de los casos presenta una deleción desde el codón 554 al 559 y la quinta mutación en homocigosis encontrada es una mutación puntual sin cambio de aminoácido del 558 más deleción de los codones 559 al 573. Cuatro de los casos en homocigosis presentan deleciones que afectan a los codones 557-558; todos los casos en homocigosis tienen implicado el codón 558 y tres de ellos el codón 559. Todos los casos por lo tanto tienen implicados los tres codones que se encuentran más mutados en la serie 557-558-559. Cabe destacar que no se ha hallado ningún caso en homocigosis con mutación puntual ni duplicación ni en otro exón que no sea el 11 de *c-KIT*.

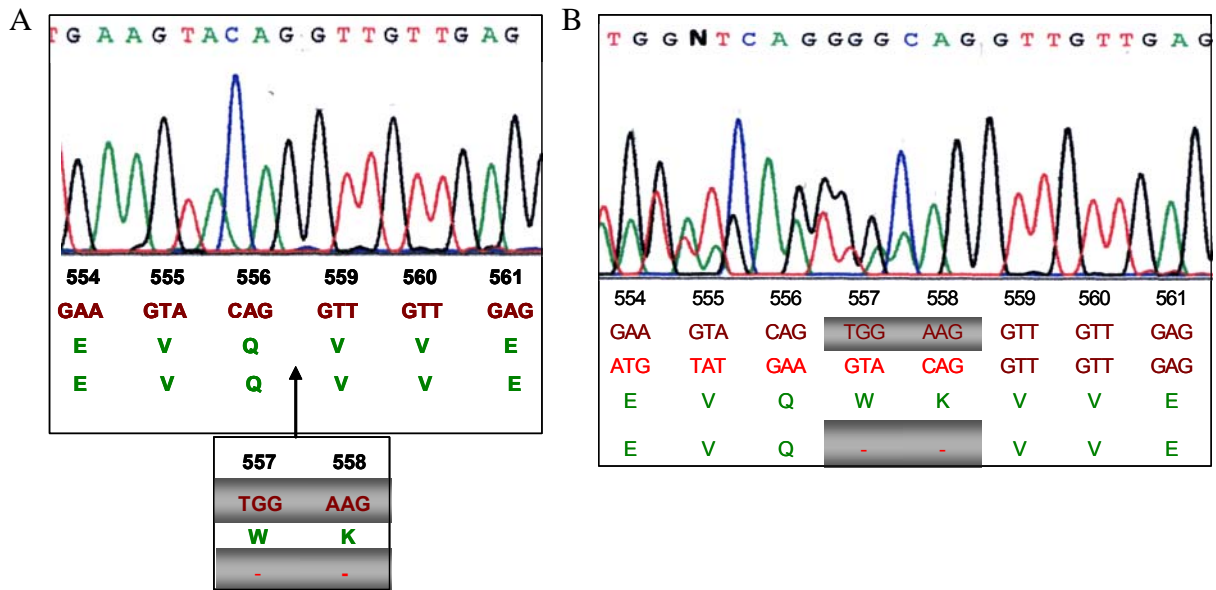


Figura 107: Electroferogramas representativos de una delección de los codones 557-558, en homocigosis (A) y en heterocigosis en una orientación reversa (B).

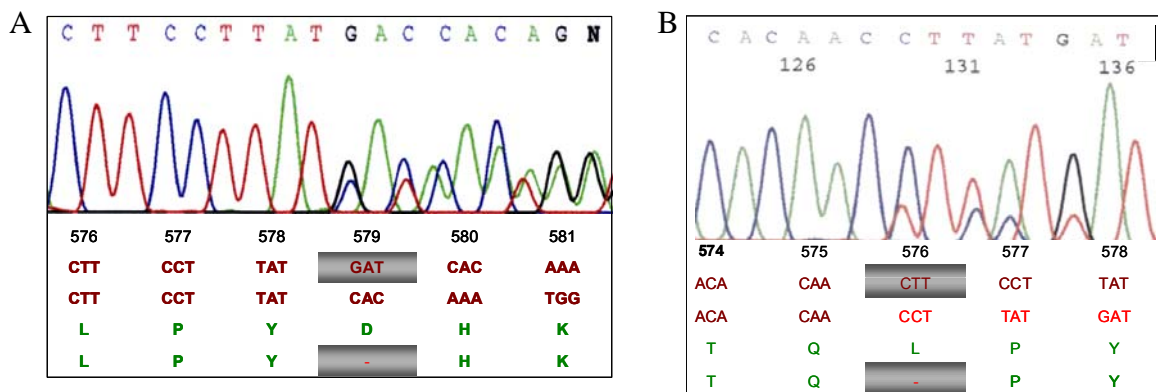
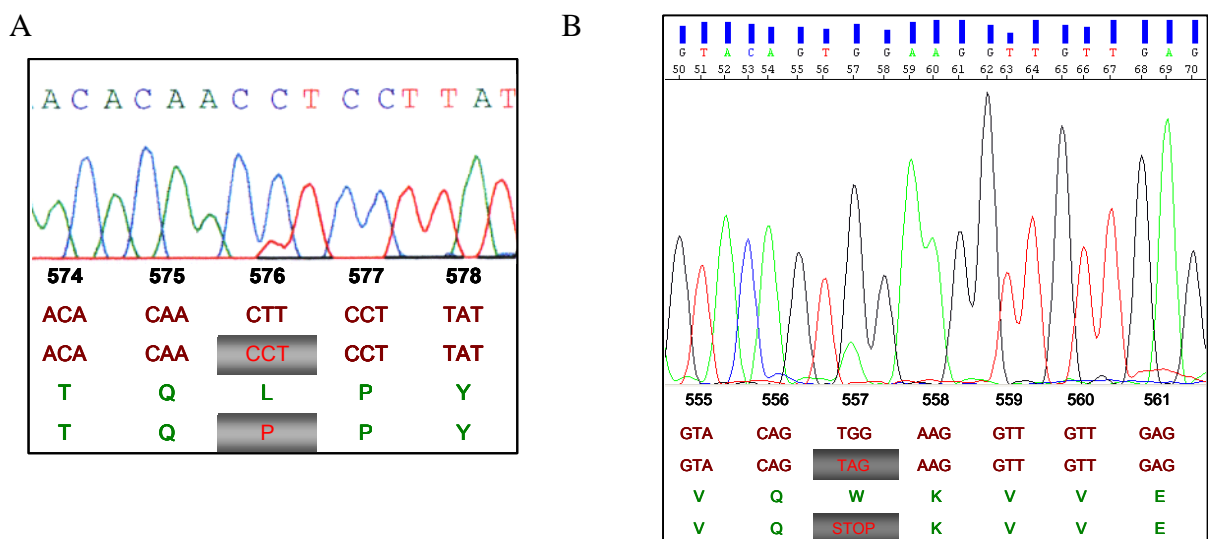


Figura 108: Electroferogramas representativos de una delección intersticial del codón 579 (A) y del codón 576 (B) ambas en una orientación forward.



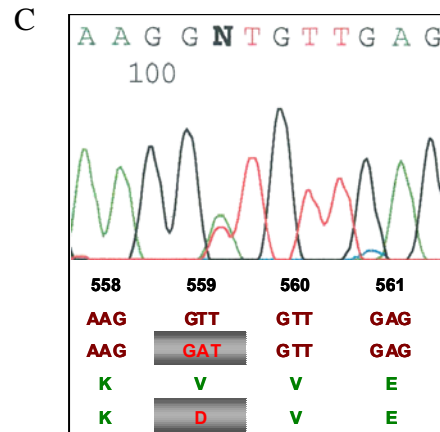


Figura 109: Electroferogramas representativos de mutaciones puntuales del codón 576 con cambio de Leucina a Prolina (A), codón 557 dando lugar a un codón STOP (B), del codón 559 con un cambio de aminoácido de Valina a Asparagina (C).

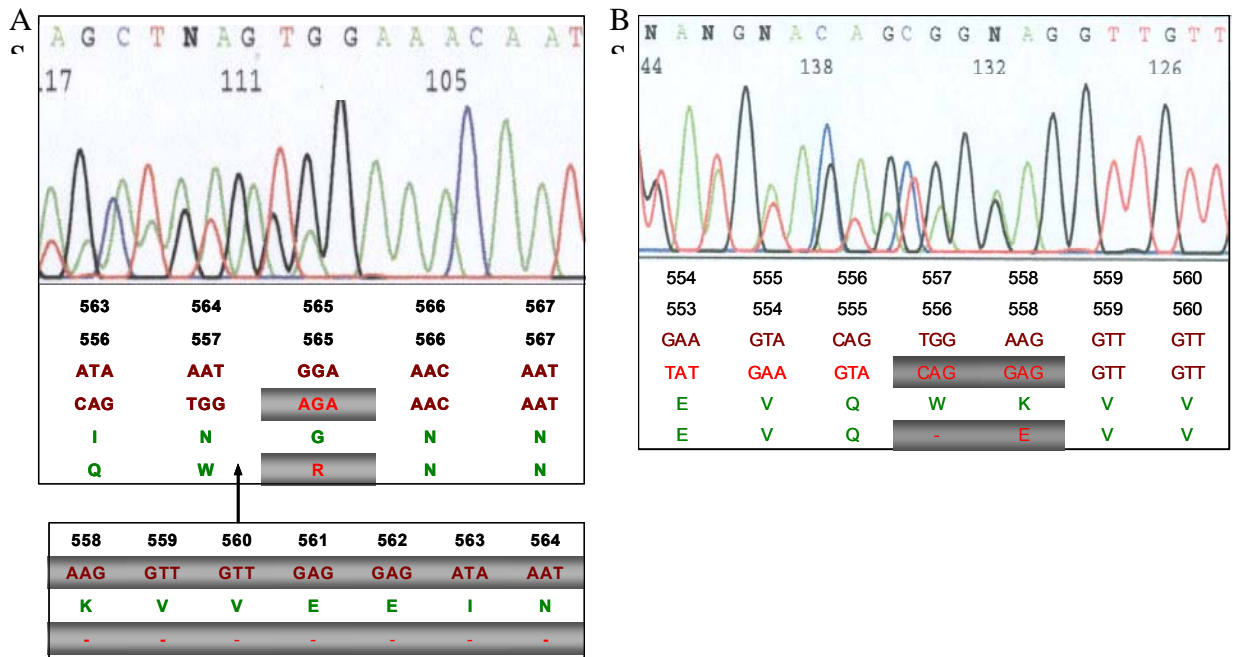


Figura 110: Electroferogramas que muestran en orientación reversa una deleción de los codones 558 al 564 más una mutación puntual en el codón 565 con cambio de aminoácido de Glicina a Arginina (A), deleción del codón 557 más una mutación puntual en el codón 558 con cambio de aminoácido de Lisina a ácido glutámico (B).

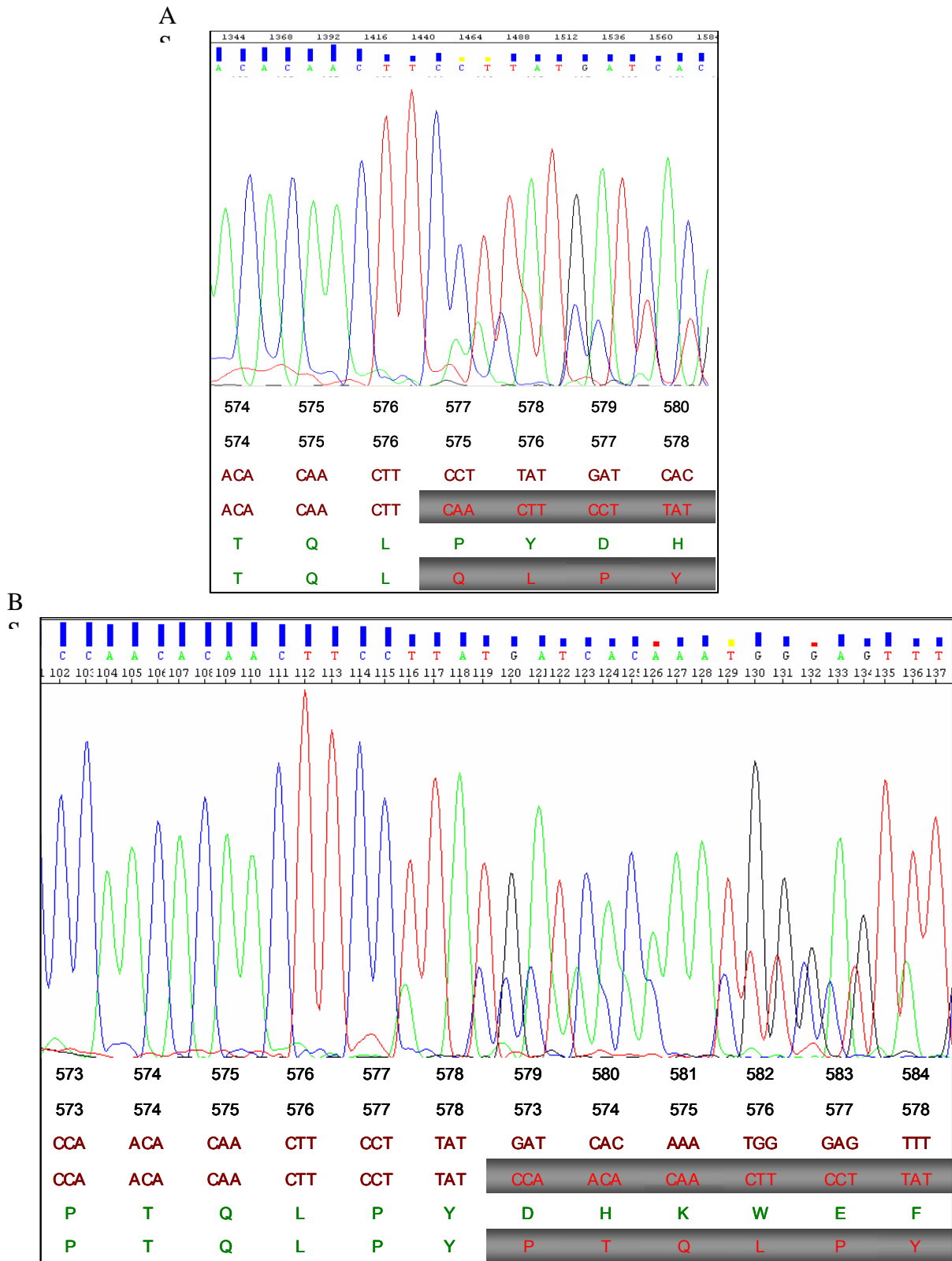


Figura 111: Electroferogramas que muestran en orientación forward duplicación de los codones 575-576 (A), duplicación des del codón 573 al 578 del exón 11 de *c-KIT* (B).

B

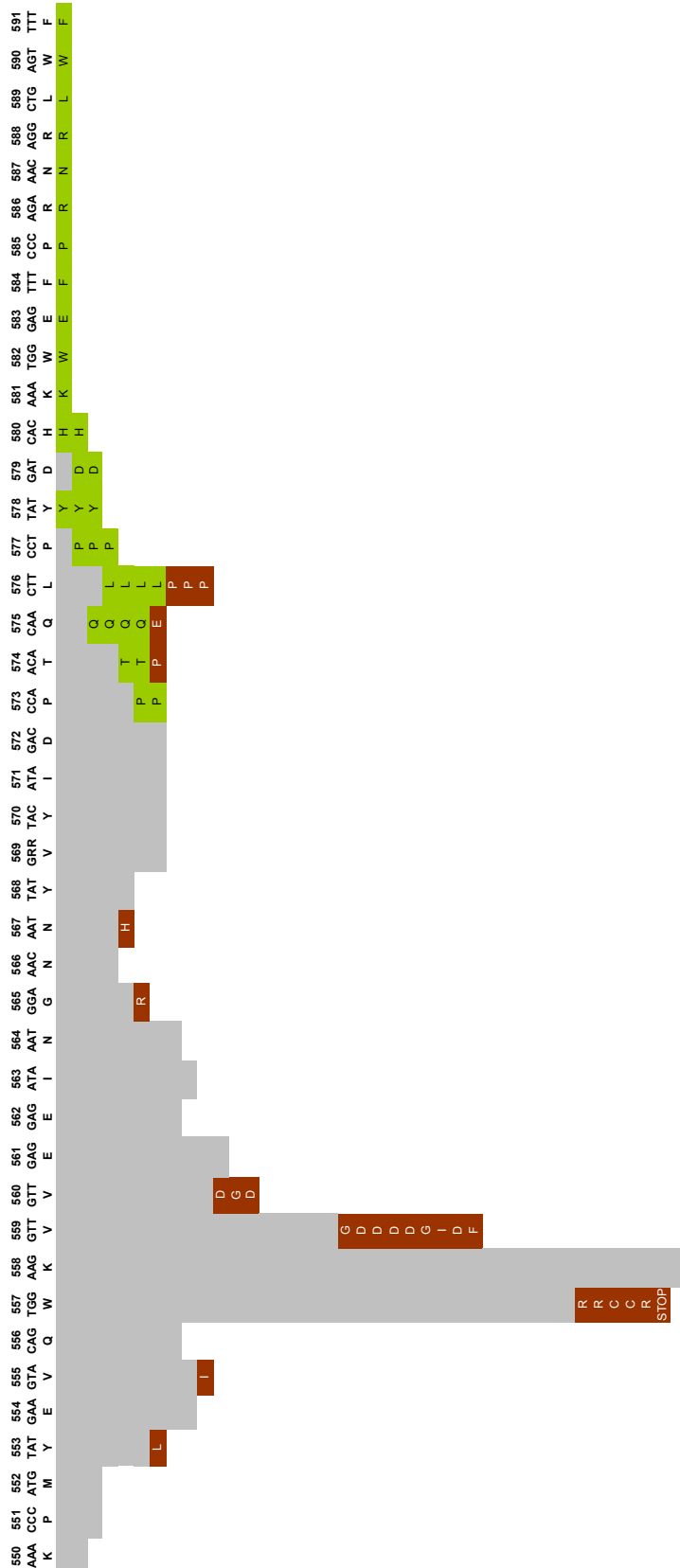


Figura 112: Representación de las frecuencias de las mutaciones identificadas en el exón 11 de *c-KIT*, en la imagen A se encuentran de manera individual todas las mutaciones del exón 11 y descrito el tipo de mutación (el color gris corresponde a las delecciones, el granate a las mutaciones puntuales y el verde a las duplicaciones). En la imagen B se han agrupado las mutaciones para destacar aquellos codones más mutados o el tipo de mutación que predomina en un codón.

B) Mutaciones en el exón 9.

Únicamente se han observado mutaciones en el exón 9 de *c-KIT* en ocho casos consistiendo en todos los casos en la duplicación de los codones 502-503 (figura 113). De este grupo de mutaciones destaca un caso en el que se realizó el estudio en la metástasis, obteniendo la duplicación en el exón nueve más una deleción de los codones 551 al 556 acompañada de una mutación puntual en el codón W557R (TGG-CGG) en el exón 11. De este mismo paciente, se recuperaron el tumor primario y la recaída y se procedió a su estudio molecular obteniendo en las dos muestras la duplicación del exón nueve pero no la mutación en el exón 11; por lo que se confirma que la deleción más mutación puntual en el exón 11 se adquiere como mutación secundaria en la metástasis del tumor.

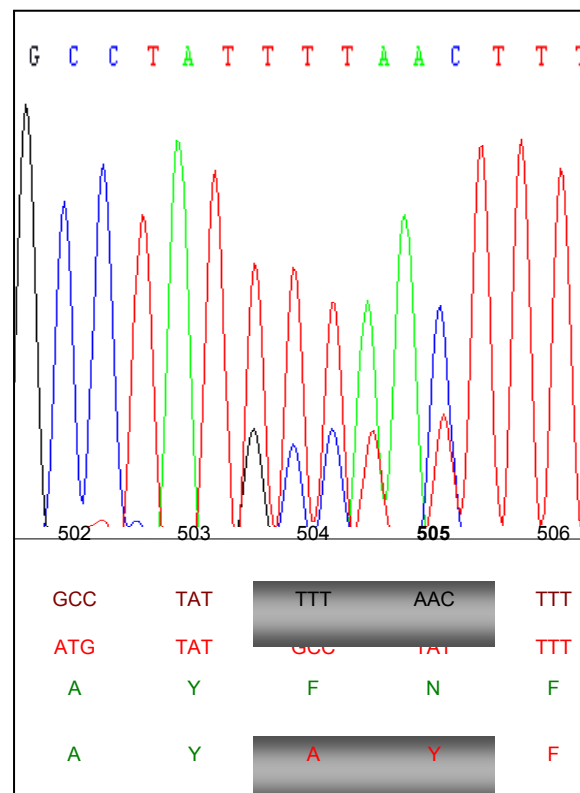


Figura 113: Electroferogramas representativo de una duplicación en el exón 9 de *c-KIT* de los codones 502-503.

C) Mutaciones en el exón 13 y 17 *c-KIT*.

En nuestro estudio, sólo hemos encontrado una mutación en el exón 13 y dos en el exón 17 (Fig.114). La mutación encontrada en el exón 13 corresponde a una mutación puntual en el codón 642 Lys (AAA)> Glu (GAA). Las mutaciones encontradas en el exón 17 son una mutación puntual en el codón 816 Asp (GAC)> Val (GTC) y la otra, también es una mutación puntual pero en el codón 823 Tyr (TAT)> Asp (GAT); está corresponde a una mutación secundaria a una deleción en el exón 11.

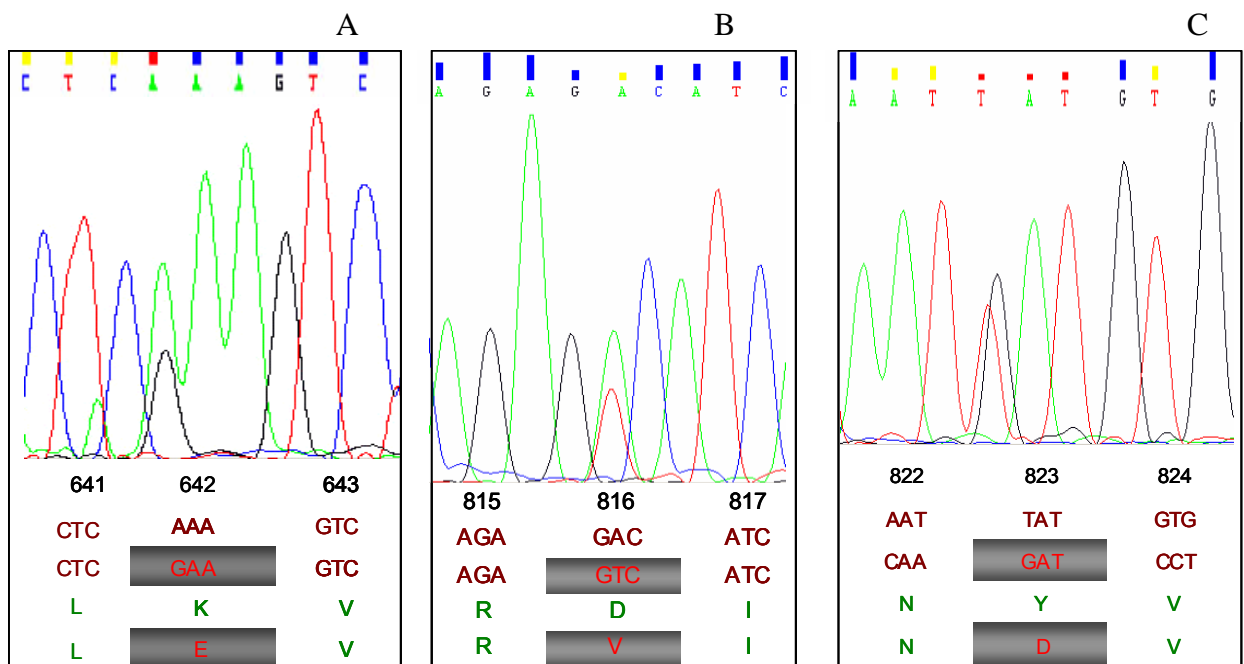


Figura 113: Electroferogramas representativos de mutaciones puntuales del codón 642 con un cambio de aminoácido de lisina a ácido glutámico en el exón 13 de *c-KIT* (A), del codón 816 con cambio de aminoácido de ácido aspártico a valina en el exón 17 y del codón 823 con cambio de aminoácido de tirosina a valina en el exón 17 de *c-KIT*.

4.6.2-PDGFR α

En el exón 18 se han encontrado nueve mutaciones, de las cuales 6 son la mutación puntual en el codón 842; las tres restantes son: una deleción de los codones comprendida entre el 842 y al 845; la otra es una deleción que abarca entre los codones 844 al 846 más una mutación puntual en el codón 847 Ser (TCG)> Pro (CCG), y por último, una deleción entre los codones 844-846. (Fig.115).

La única mutación observada en el exón 12 de *PDGFR α* es una deleción comprendida entre los codones 571 hasta el 576 que no corresponde a un GIST sino a un pólipo fibroide inflamatorio, este caso no ha sido incluido en el conjunto global de la serie y será comentado posteriormente.

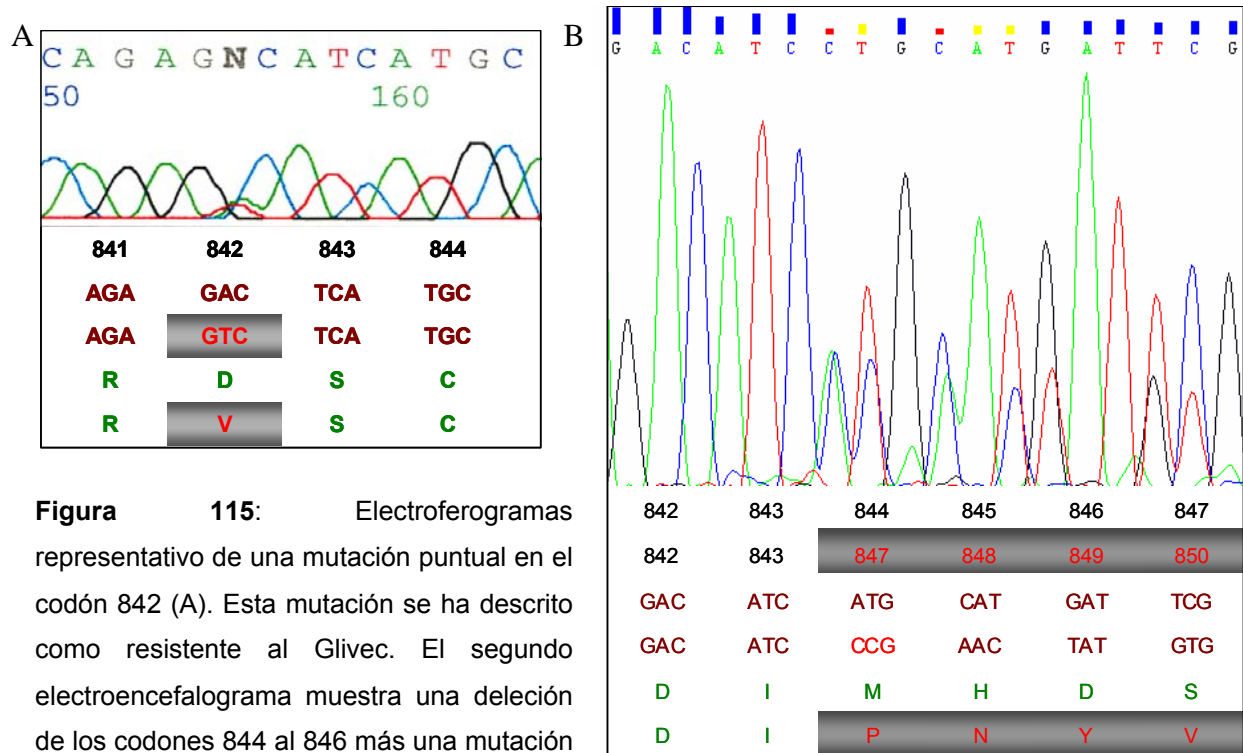


Figura 115: Electroferogramas representativo de una mutación puntual en el codón 842 (A). Esta mutación se ha descrito como resistente al Glivec. El segundo electroencefalograma muestra una deleción de los codones 844 al 846 más una mutación puntual en el codón 847 con cambio de aminoácido de serina a prolina (B).

4.7-ASOCIONES DE BIOLOGIA MOLECULAR

Seguidamente se reflejan las asociaciones encontradas entre los resultados de biología molecular y el resto de parámetros estudiados. No se ha obtenido ninguna asociación en el gen *PDGFR α* , debido fundamentalmente al escaso número de casos con mutaciones.

- **Tipo de mutación en el gen *c-KIT*.**

Los codones más implicados en las mutaciones anteriormente descritas (557-558-559) presentan la deleción como principal mutación (70%), seguido de mutaciones puntuales (16%) y deleciones más mutaciones puntuales (14%) (Fig.116)($p < 0,0001$).

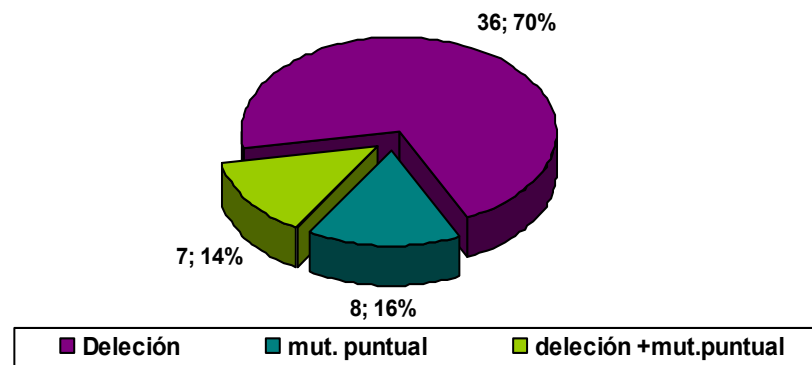


Figura 116: Representación del tipo de mutación más frecuente en los codones 557-558 y 559.

Al analizar el tipo de mutación presente en los tumores con la **mitosis** según la clasificación de Fletcher ($p=0,004$), destaca que los casos portadores de una deleción más mutación puntual presentan en un 71,4% más de 10 mitosis; todo lo contrario ocurre en las mutaciones puntuales donde un 93,8% de los casos presentan menos de 5 mitosis. Las duplicaciones y los casos no mutados presentan porcentajes similares, el 66% de los casos tienen un recuento mitótico inferior a 5 mitosis, un 15% entre 6 y 10 mitosis y más del 16% más de 10 mitosis a 40X en 50 HPF. Las deleciones presentan en un 46,3% de casos menos de 5 mitosis, en 24,4% entre 6-10 mitosis y en un 29,3% más de 10 mitosis (Fig.117).

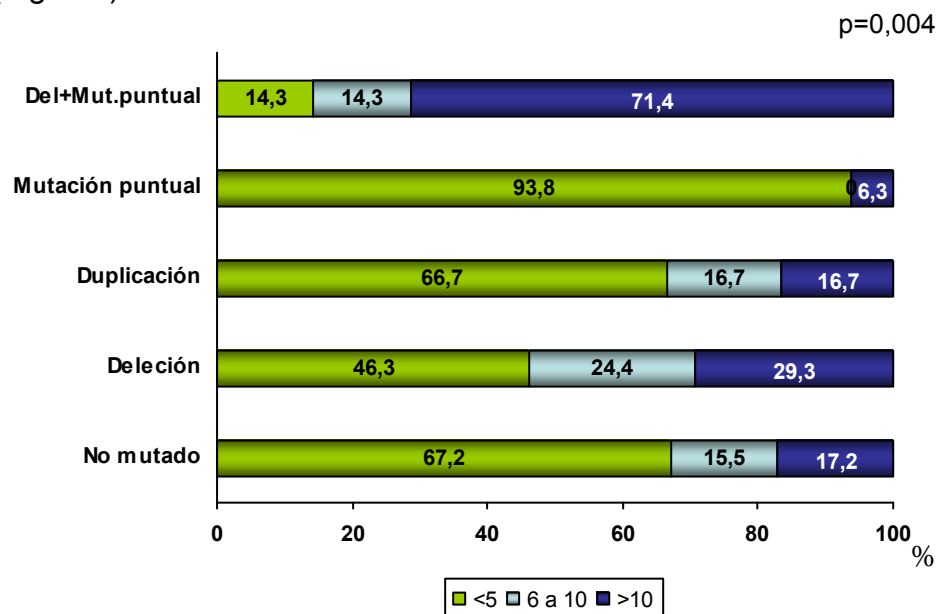


Figura 117: Asociación entre el grupo de mitosis y el tipo de mutación.

Se analiza la asociación entre el tipo de mutación y las **mitosis** presentes en el tumor en un número mayor o menor a 5 mitosis en 50 HPF, observamos que las deleciones más mutaciones puntuales presentan más de 5 mitosis en más del 85,7% de los casos frente a un 93,8% de casos con menos de 5 mitosis portadores de mutaciones puntuales. Tanto las duplicaciones como las no mutaciones presentan resultados muy similares, más del 66% de los casos presentan menos de 5 mitosis en 50 HPF. Por último las deleciones presentan casi un 50% de casos con más de 5 mitosis. Todos estos resultados quedan reflejados en la Fig.118 ($p=0,001$).

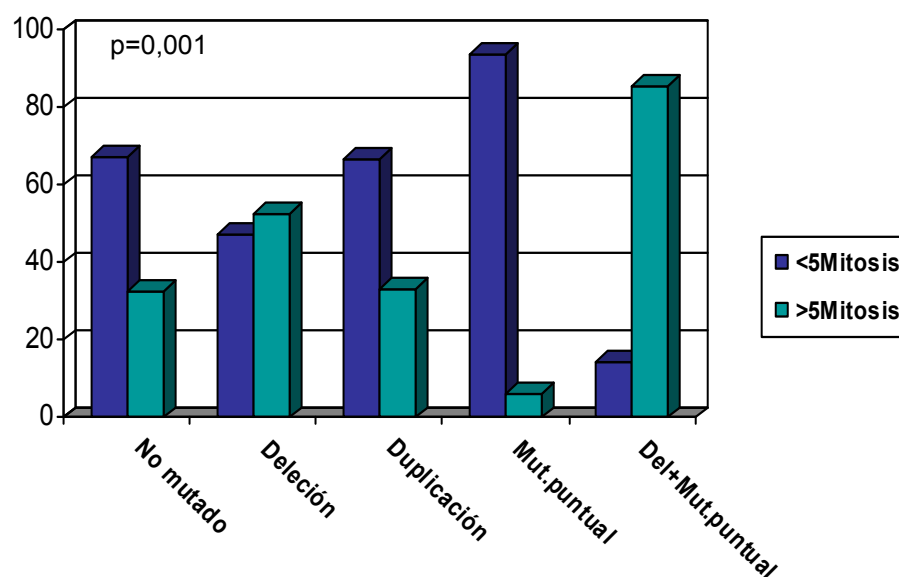


Figura 118: Asociación entre la cantidad de mitosis superior o inferior a 5 mitosis en 50 HPF respecto al tipo de mutación presente en el tumor.

Respecto a los grupos de **riesgo de Fletcher** se ha encontrado una asociación estadísticamente significativa con el tipo de mutaciones ($p=0,033$). Destaca, sobre todos los resultados, que los casos con una delección más mutación puntual son todos ellos de alto riesgo, también se encuentran clasificados en este grupo un 35,1% de casos con deleciones, un 10,4% de portadores de duplicaciones y un 39% de casos no mutados; en un número inferior se encuentran los casos con mutaciones puntuales (5,2%). En la clasificación de bajo riesgo y muy bajo riesgo, el tipo de mutación que más casos presenta en estos dos grupos son los casos no mutados y los portadores de mutaciones puntuales; en el grupo de riesgo intermedio no destaca excesivamente ningún tipo de mutación sobre el resto. Fig.119.

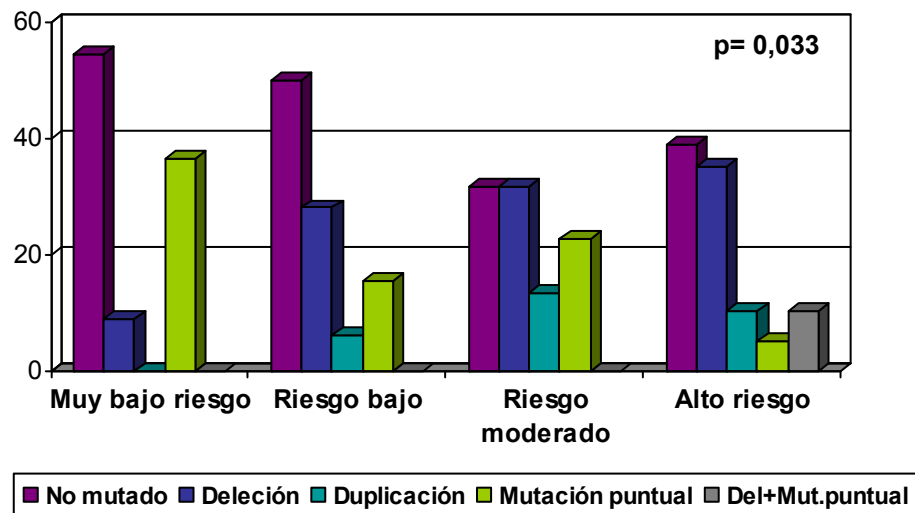


Figura 119: Asociación del riesgo histológico con los diferentes tipos de mutaciones descritas en la serie.

- **Deleción 558**

La **localización** más frecuente de los casos que son portadores de la deleción del codón 558 es el **estómago** (60%) seguido del intestino grueso (15%) y en menor número la localización extragastrointestinal e intestino delgado (10%), y por último dos casos localizados en el esófago (Fig.120). Al analizar los casos que no presentan la deleción 558 destaca que la localización en el intestino delgado supone un 31% de los casos, mientras que los casos localizados en el estómago es del 44% (Fig.120) ($p=0,043$).

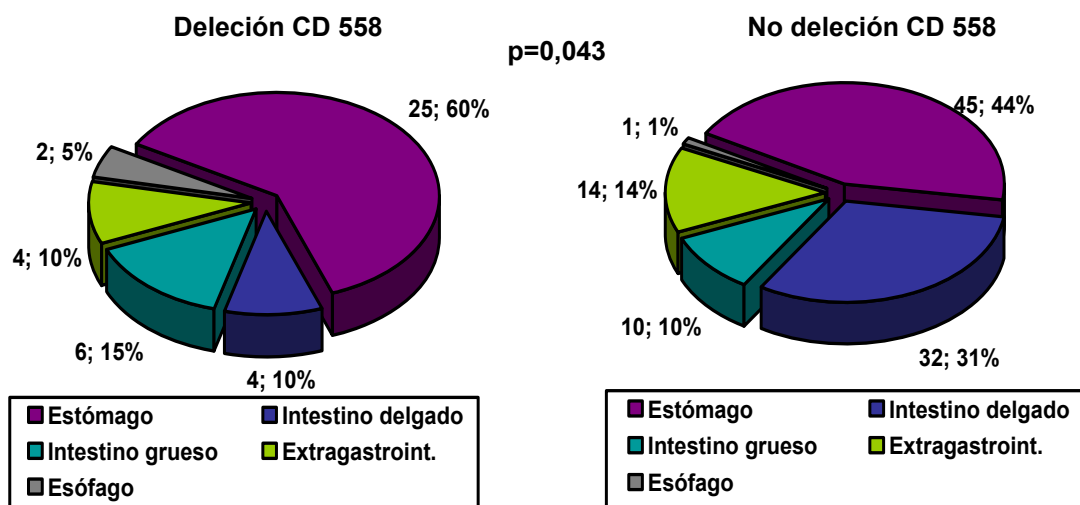


Figura 120: Distribución de aquellos casos portadores de la deleción del codón 558 respecto a la localización más frecuente en ellos.

Se observa una tendencia en aumento de los casos a medida que aumenta el **riesgo de Miettinen**. Los casos portadores de la deleción 558 son clasificados en un 38,5% en el grupo de alto riesgo (25 casos); siendo clasificados un 12,5% en el grupo de muy bajo riesgo (3 casos) (Fig. 121) ($p=0,040$).

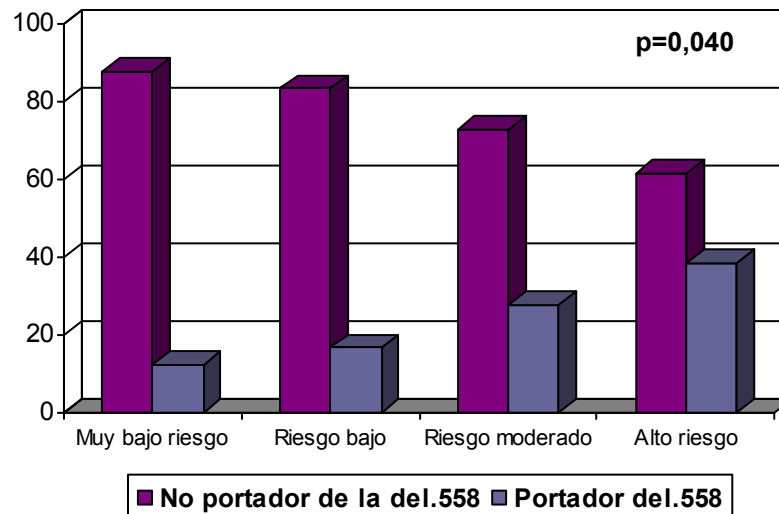


Figura 121: Clasificación de riesgo según los criterios de Miettinen y la presencia de la deleción 558.

- **Mutaciones que afectan cualquiera de los tres codones más alterados de la serie (557/558/559).**

Un 59,3% de los casos con deleción de los codones 557-558 tienen más de 5 **mitosis** en 50 HPF, en comparación con el 23% de los casos no portadores de la mutación que presentan más de 5 mitosis ($p=0,012$). También hemos observado que al analizar los codones por separado, un 57,1% de los pacientes con deleción del codón 559 tienen más de 5 mitosis ($p=0,05$); un 54,5% con deleción en el 557 ($p=0,027$); y un 61,1% cuando se encuentra implicado el codón 558 ($p=0,01$).

Un 61,1% de los casos que son portadores de la deleción 558 presentan más de 5 mitosis en 50 HPF ($p=0,001$) además, son clasificados en más del 79% de los casos de alto **riesgo** ($p=0,005$); igual ocurre en aquellos casos que tienen deleción más mutación 557-558 en un 70% ($p=0,017$) (Fig.122).

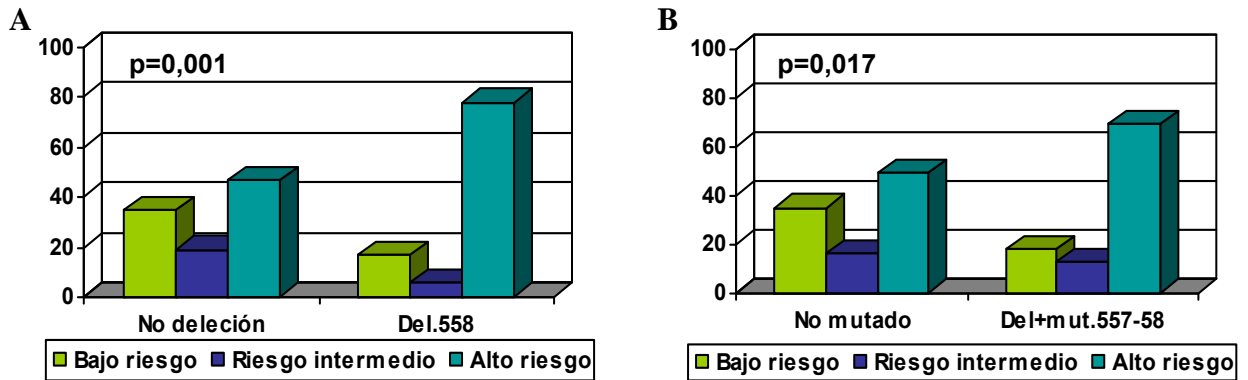


Figura 122: Correlación entre los diferentes riesgos histológicos según la clasificación de Fletcher y la presencia de deleción 558 (A) y la presencia de deleción más mutación 557-558 (B).

Aquellos casos que no son portadores de la deleción de los codones 557-558 presentan en un 67% de los casos menos de 5 **mitosis** como queda reflejado en la Fig.123; en comparación al 39% observado en el grupo con deleción en los codones 557-558 ($p=0,024$).

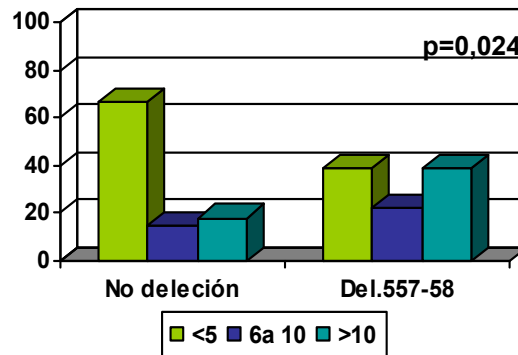


Figura 123: Histograma que representa la frecuencia de los distintos grupos de mitosis en función de la presencia o ausencia de la deleción 557-558.

Cuando analizamos el número global de mitosis, destaca que los casos mutados para el gen *c-KIT* presentan un mayor número de **mitosis** respecto a los no mutados. Los tipos de mutaciones con más número de mitosis son la deleción y las deleciones más mutaciones puntuales. Por el contrario, los casos que menos mitosis tienen son los portadores de las mutaciones puntuales seguidas de las duplicaciones y los no mutados ($p=0,002$). Además si se analizan los casos no mutados frente a las deleciones y con las deleciones más mutaciones puntuales también podemos encontrar diferencias estadísticamente

significativas ($p=0,014$ y $p=0,027$ respectivamente). No ocurre con el resto de tipos de mutaciones. También cabe destacar que los casos con presencia de la delección 557-558 o delección 557 más mutación 558 o los codones analizados de manera individual presentan un mayor número de mitosis.

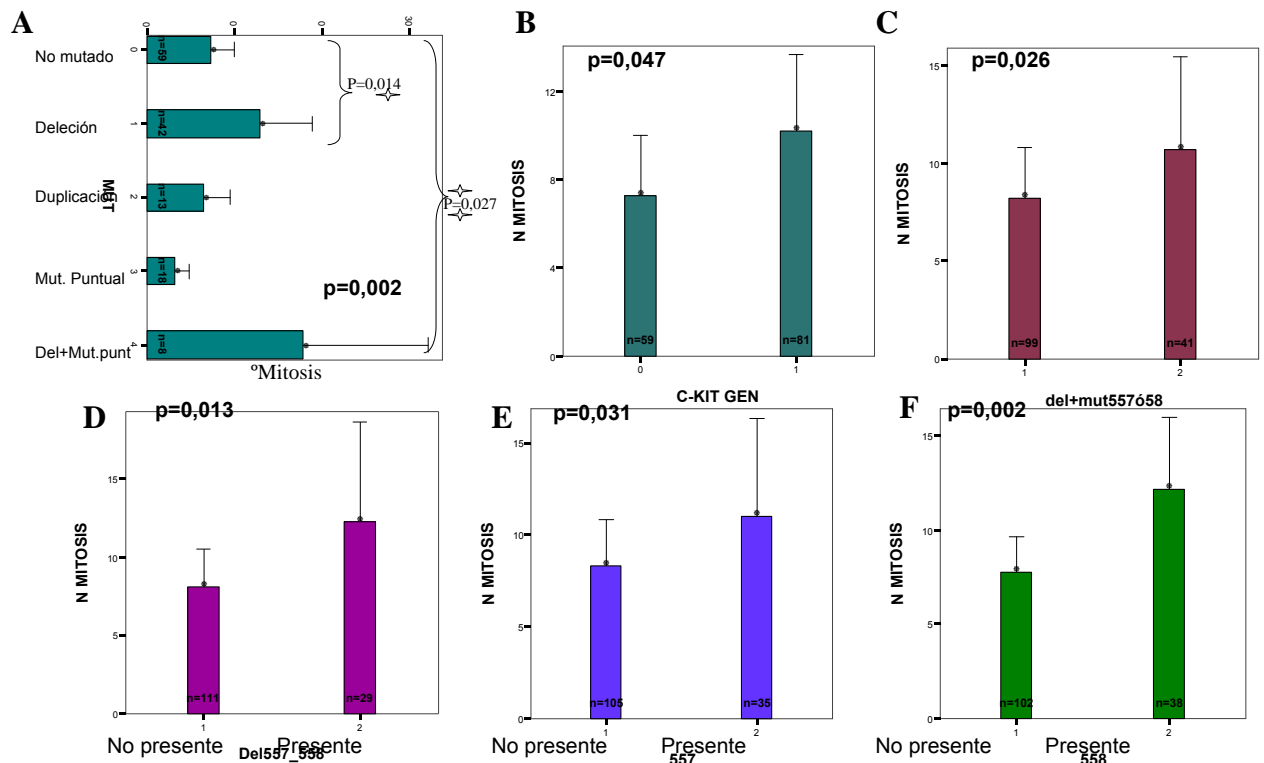


Figura 124: Relación entre el número de mitosis presente en los diferentes tumores con el tipo de mutación descrita (A), presencia de gen mutado (B), delección codón 557 más mutación del 558 (C), presencia de la delección 557-558 (D), alterado el codón 557 (E) y el 558 (F).

• Homocigotos

Los 5 casos mutados en homocigosis; a nivel histopatológico presentan un tamaño mayor de 5cm ($p=0,04$), con un número de mitosis de más de cinco mitosis en 50 HPF ($p=0,004$), y además a nivel celular cuatro casos son fusocelulares y el otro epitelial. Como queda reflejado en la figura 125 tienden a ser de mayor tamaño que el resto ($p=0,05$).

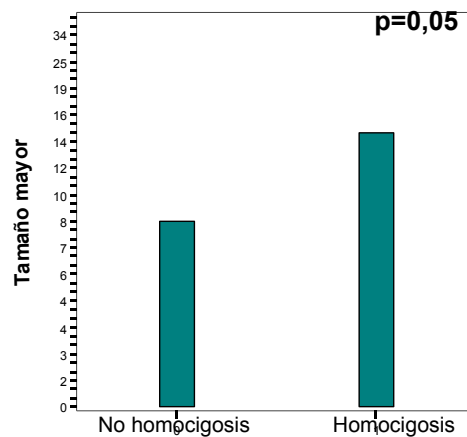


Figura 125: Histograma en el que se representa la mediana del tamaño tumoral para aquellos casos portadores de una mutación en homocigosis con el resto de casos.

- **Duplicación de los codones 502-503 en el exón 9 de *c-KIT*.**

De los nueve casos con duplicación en el exón 9 de *c-KIT*, cinco corresponden a **localización intestinal** (62,5%). Por el contrario, aquellos que no muestran la duplicación se localizan más frecuentemente en el estómago (Fig.126) ($p=0.042$).

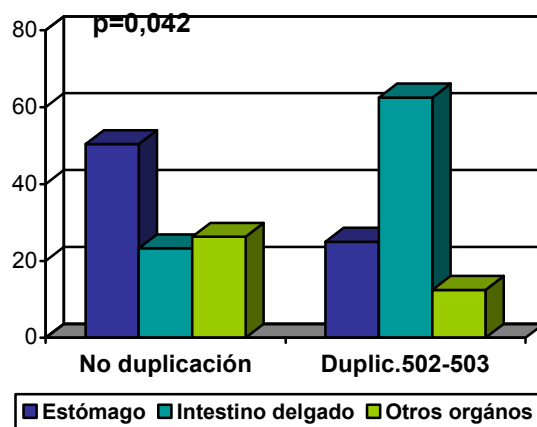


Figura 126: Distribución de la duplicación 502-503 en los órganos implicados en GIST.

- **Marcador inmunohistoquímico *c-KIT*.**

Al observar la relación que existe entre el marcador inmunohistoquímico de *c-KIT* y las mutaciones del gen, observamos que existe una asociación directa entre la intensidad del marcador inmunohistoquímico y la presencia de

mutaciones en el gen (Fig.127 A) ($p=0,003$). Por el contrario, cuando se observan los casos mutados en *PDGFR α* lo que se encuentra es una asociación inversamente proporcional entre la presencia de mutaciones de *PDGFR α* y la expresión de c-KIT (Fig.127 B) ($p=0,062$).

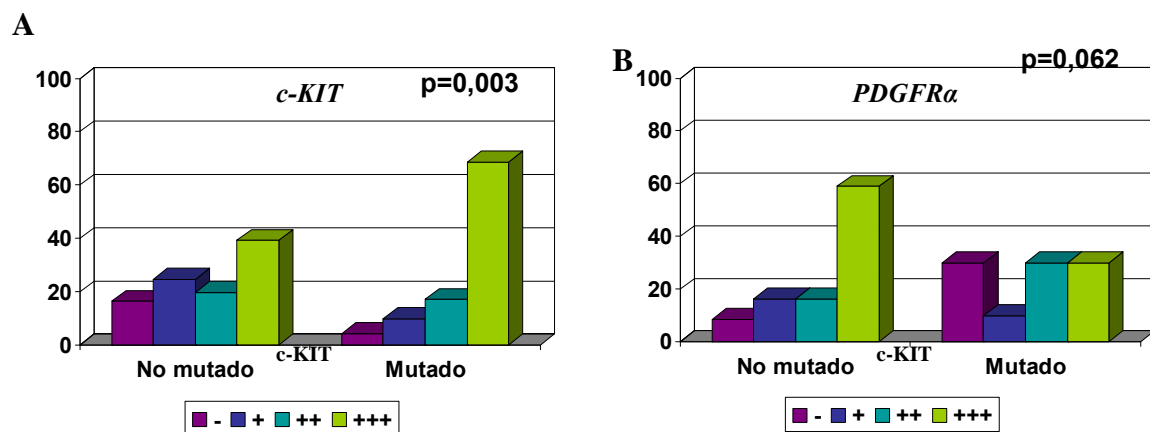


Figura 127: Relación que existe entre las mutaciones en el gen de *c-KIT* (A) y la expresión de c-KIT y las mutaciones en el gen *PDGFR α* y la expresión en c-KIT (B).

4.8.-CORRELACIONES DE LAS MUTACIONES DE *c-KIT* Y *PDGFR α* CON LA PROGRESIÓN TUMORAL

A continuación vamos a exponer los principales hallazgos entre la biología molecular y la progresión tumoral (Tabla 35).

- **Presencia de la mutación en el gen *c-KIT*.**

Se observa una asociación directa entre la presencia de mutaciones en el gen *c-KIT* con la presencia de recaídas ($p<0,0001$), metástasis ($p=0,002$) y con la progresión ($p<0,0001$). De hecho, los casos que recaen, metastatizan y progresan presentan mutaciones en el gen *c-KIT* en más de un 80% de los casos (Fig. 128)

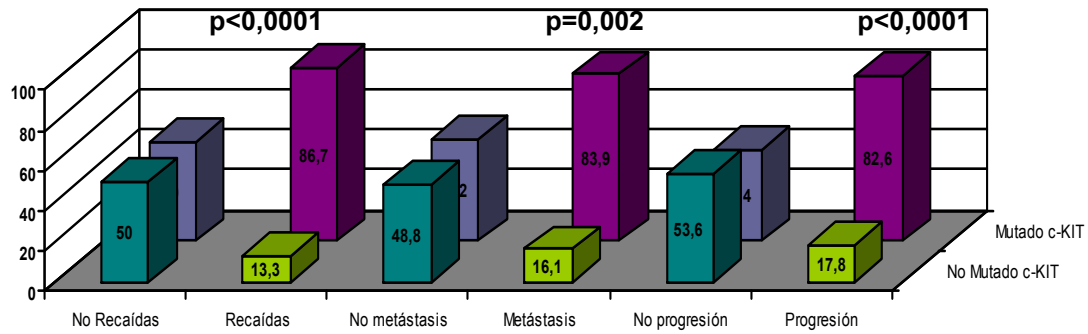


Figura 128: Representación de la asociación entre los eventos de progresión tumoral con el estatus de mutaciones en *c-KIT*.

• **Exón mutado de *c-KIT***

La presencia de un exón mutado u otro en el gen *c-KIT* también está asociado con la aparición de recaídas ($p=0,001$), metástasis ($p=0,003$) y en definitiva con la progresión ($p<0,0001$). Hay que destacar como queda reflejado en la tabla 35 que la significación de todos los casos se debe tanto a los casos no tratados para recaídas y progresión; y a los casos tratados para metástasis y progresión.

Como se puede apreciar en la figura 129 la incidencia de recaídas en los casos no mutados es del 11,8%, todo lo contrario a lo que ocurre en los casos que se encuentran mutados para el exón 9 en los que la tasa de progresión es del 85,2%. En los casos con mutación en el exón 11 se observa una frecuencia de progresión de 49,2%.

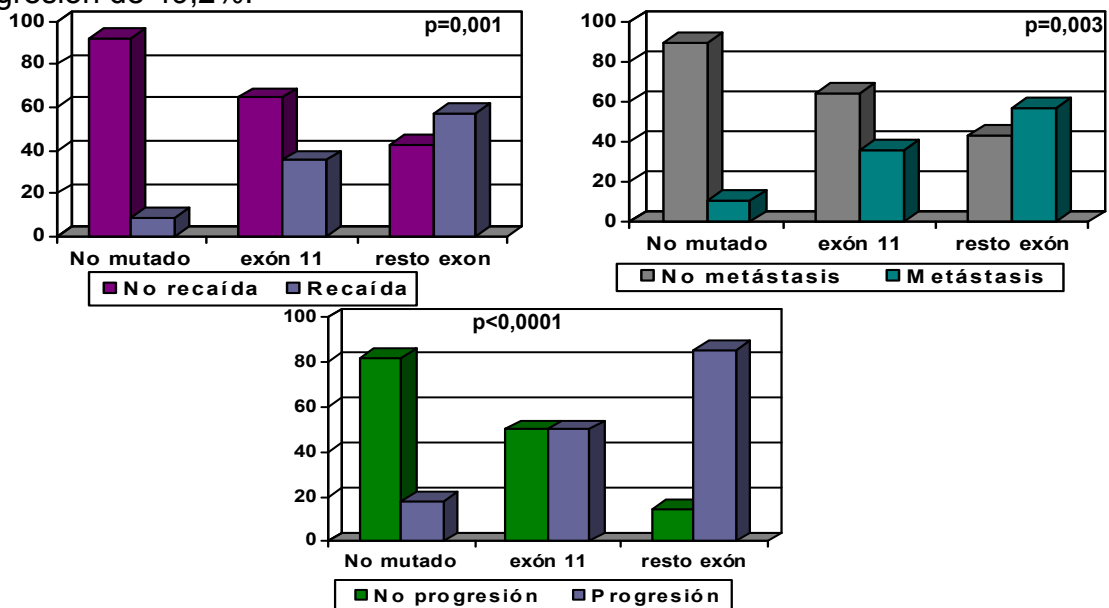


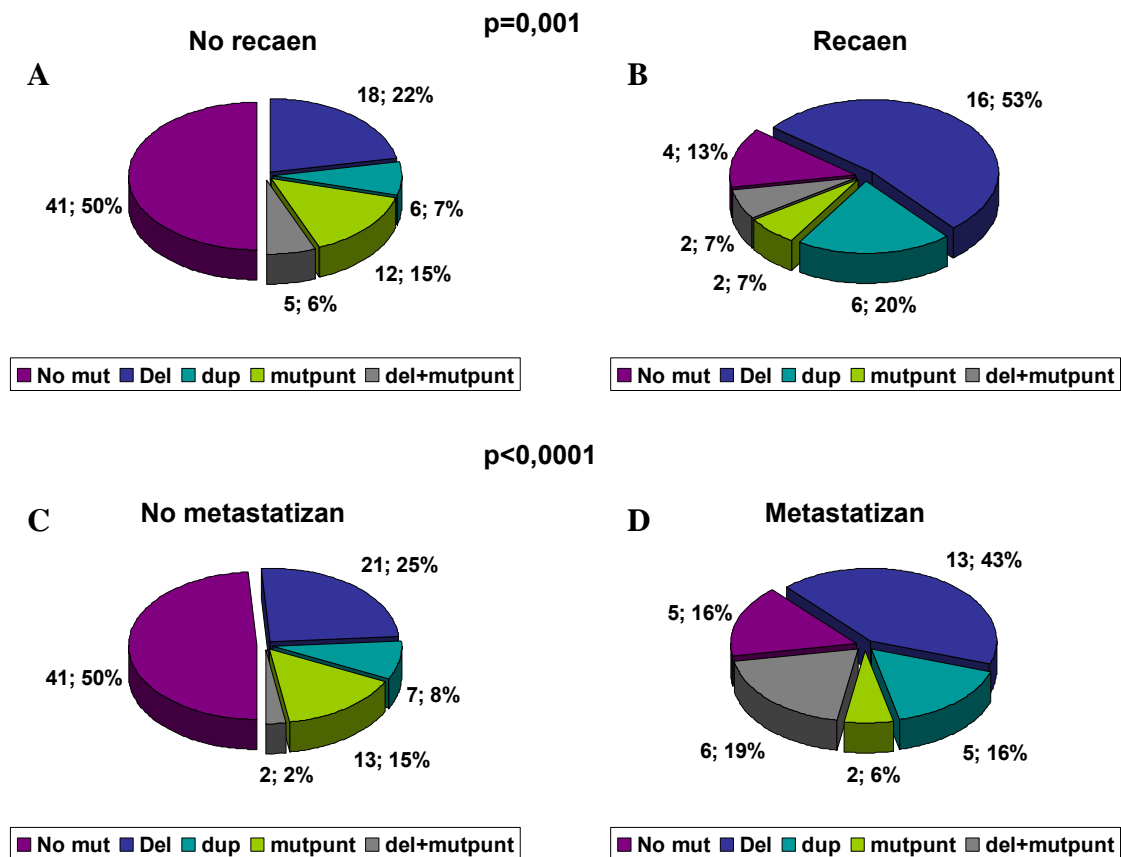
Figura 129: Correlaciones entre las recaídas, metástasis y progresión con las mutaciones en los distintos exones de *c-KIT*.

Tabla 35: Significación hallada entre las asociaciones existentes entre los parámetros de biología molecular y los parámetros de progresión.

PARÁMETROS	TODOS LOS CASOS			CASOS NO TRATADO			CASOS TRATADO					
	Recaidas	Metástasis	Progresión	Exitus	Recaidas	Metástasis	Progresión	Exitus	Recaidas	Metástasis	Progresión	Exitus
BIOL.MOLECULAR												
c-KIT GEN	<0,0001	0,002	<0,0001	0,948	0,014	0,390	0,053	0,8	0,467	0,010	0,049	0,122
c-KIT exón	0,003	0,006	<0,0001	0,528	0,002	0,117	0,035	0,332	0,523	0,053	0,252	0,355
c-KIT exones (0,1,1,9)	0,001	0,003	<0,0001	0,315	0,006	0,059	0,057	0,219	0,699	0,027	0,143	0,277
Mutaciones c-KIT	0,001	<0,0001	<0,0001	0,281	0,064	0,165	0,091	0,765	0,351	0,048	0,219	0,16
Mut.homocigosis	0,213	0,915	0,529	0,429	0,370	0,656	0,977	0,267	-	-	-	-
Del.557-558	0,027	0,101	0,022	0,629	0,087	0,547	0,089	0,780	0,613	0,152	0,346	0,124
Del.557	0,060	0,019	0,010	0,803	0,169	0,743	0,197	0,950	0,981	0,019	0,133	0,320
Del.558	0,025	0,008	0,002	0,317	0,344	0,163	0,049	0,496	0,293	0,055	0,092	0,886
Del.559	0,552	0,101	0,071	0,477	0,983	0,451	0,6	0,247	0,75	0,337	0,256	0,474
Mut 557-558-559	0,056	0,021	0,009	0,563	0,356	0,193	0,126	0,380	0,576	0,149	0,152	0,366
Del+mut 557-558	0,051	0,018	0,008	0,797	0,414	0,579	0,233	0,943	0,524	0,026	0,061	0,833
Dupl.502-503	0,038	0,058	0,011	0,014	0,017	0,021	0,081	0,086	0,791	0,865	0,601	0,920
PDGFRα gen	0,161	0,544	0,335	0,598	0,488	0,636	0,756	0,320	0,263	0,279	0,078	0,294
PDGFRα exón	0,161	0,544	0,335	0,598	0,488	0,636	0,756	0,320	0,263	0,279	0,078	0,294
PDGFRα mutación	0,397	0,550	0,483	0,632	0,753	0,355	0,610	0,6	0,263	0,279	0,078	0,294

- **Tipo de mutación presente en el gen *c-KIT*.**

Además, se observa una asociación directa entre el tipo de mutación y la presencia de recaídas ($p=0,001$), metástasis ($p<0,0001$) y progresión ($p<0,0001$). Anteriormente ya se ha mencionado que aquellos casos no mutados recaen, metastatizan y progresan en un bajo porcentaje. Hemos encontrado una asociación entre el tipo de mutación y los eventos de progresión, de modo que el 53% de los casos que recaen tienen mutaciones del tipo de deleciones intersticiales, seguidos de un 20% de duplicaciones, que contrasta con el grupo de pacientes que no recaen donde el porcentaje de deleciones intersticiales es del 22% y el de duplicaciones del 17% (Fig.130 A y B) ($p=0,001$). Como se puede observar en la figura 130 se aprecia un comportamiento similar en el caso de las metástasis y eventos de progresión.



p<0,0001

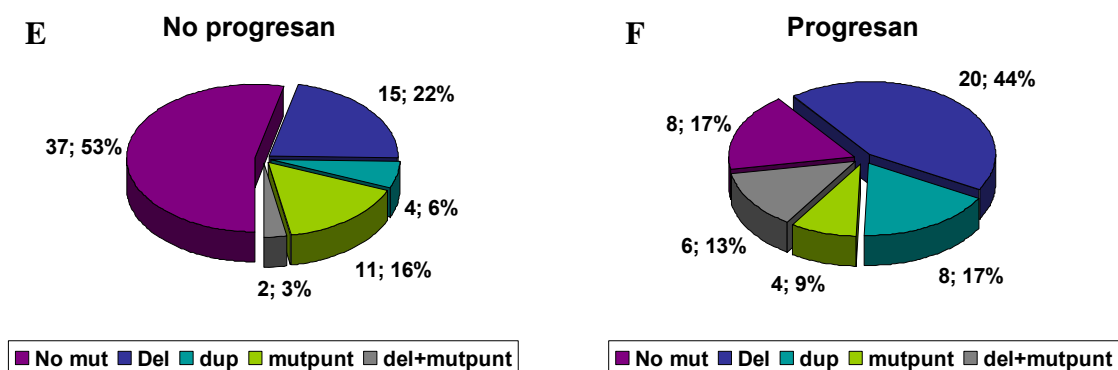


Figura 130: Relación que existe entre el tipo de mutación con los eventos de progresión tumoral. Recaídas (A-B), metástasis (C-D) y progresión (E-F).

• Deleción 557-558

Cuando analizamos la presencia de la deleción 557-558 con la progresión de la enfermedad observamos que un 45,5% de los casos que recaen son portadores de la deleción, frente al 21,2% de casos que no recaen y son portadores de esta deleción ($p=0,025$). Cuando se analiza la progresión respecto a la deleción, se puede apreciar como la presencia de estas deleciones son más frecuentes en los casos que progresan (Fig.131) ($p=0,022$).

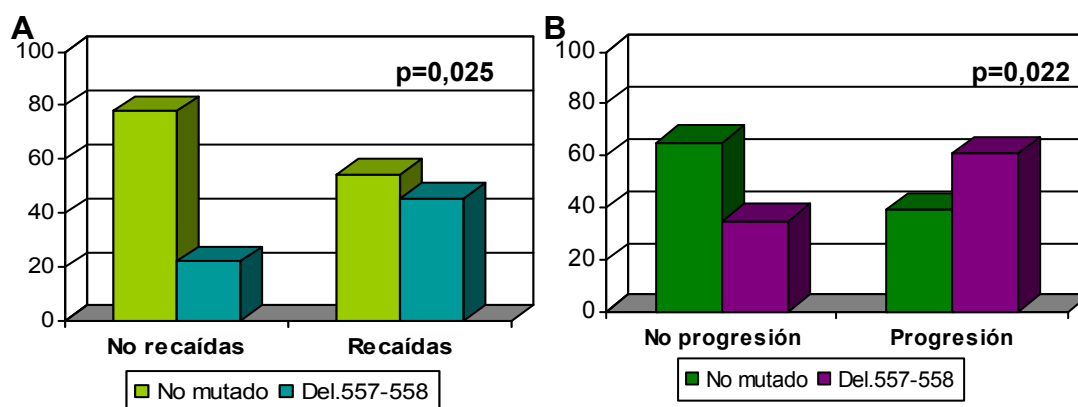


Figura 131: Representación de los casos portadores de la deleción 557-558 y la asociación con las recaídas (A) y progresiones (B).

• Deleción 557

Al analizar la progresión de la enfermedad con los 28 casos que son portadores de la deleción del codón 557 en el exón 11 de *c-KIT*; se observa que los casos que presentan dicha deleción recaen ($p=0,060$), metastatizan ($p=0,019$) y progresan ($p=0,010$) en más de un 35% de casos en los tres grupos;

contrariamente más de un 80% de casos que no presentan esta deleción no evoluciona el tumor (Fig.132).

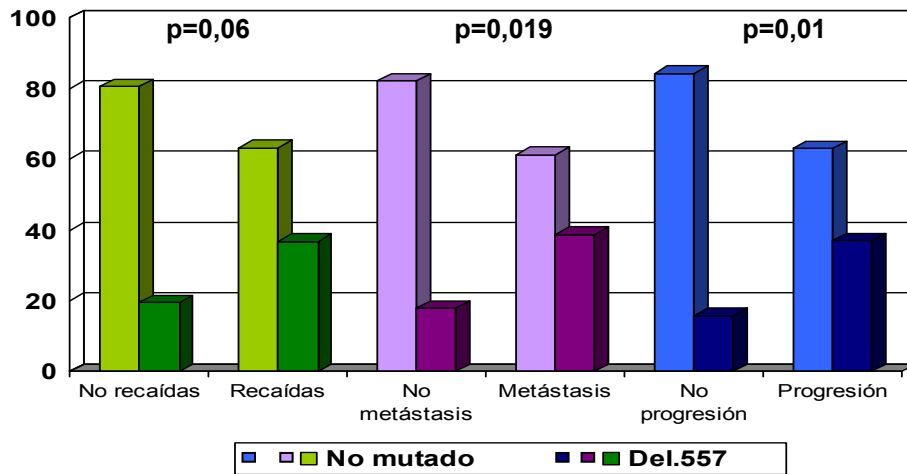


Figura 132: Histograma representativo de la asociación de la deleción 557 y los eventos de progresión tumoral.

• Deleción 558

Como ocurre en las deleciones del codón 557, se observa una asociación entre los casos con deleción del codón 558 y la frecuencia de recaídas ($p=0,025$), metástasis ($p=0,008$) y progresión ($p=0,002$). Así pues, más del 40% de pacientes que recaen o presentan metástasis o progresan han tenido tumores con alteraciones genéticas que afectan al codón 558. Sin embargo, los casos que no presentan la deleción del codón 558 en un 78% de los casos no evolucionan en ninguno de los tres eventos analizados (Fig.133).

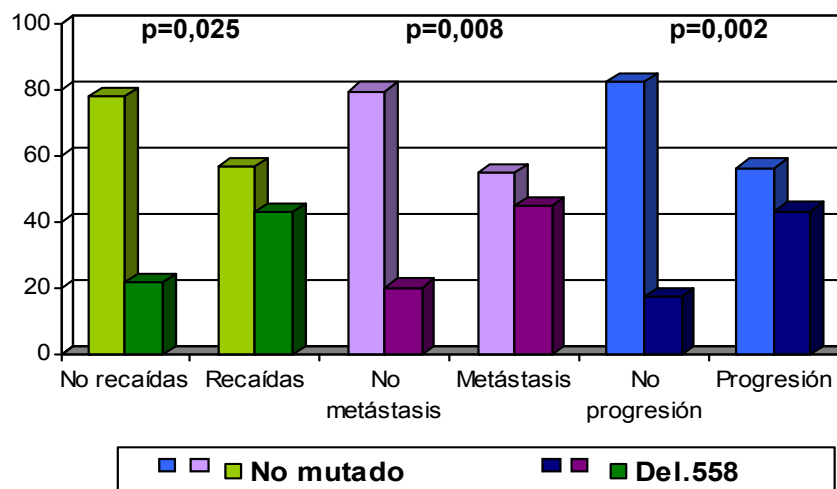


Figura 133: Asociación entre la presencia de deleción en el codón 558 con los eventos de progresión tumoral.

- **Delección más mutación 557- 558.**

En el análisis de los 34 casos que presentan la delección del codón 557 más la mutación puntual del codón 558 se detecta la evolución en recaídas ($p=0,051$), metástasis ($p=0,018$) y progresión ($p=0,008$); con la presencia de dicha mutación (40%) y contrariamente, cuando no se encuentra presente está mutación en más del 75% de los casos no evoluciona la enfermedad (Fig.134).

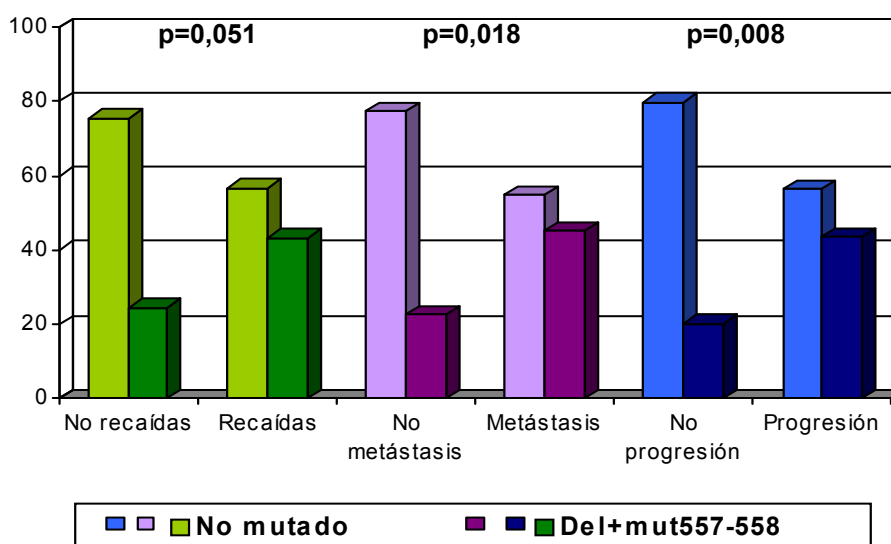


Figura 134: Asociación entre la presencia de delección en el codón 557 más mutación en el 558 con los eventos de progresión tumoral.

- **Mutaciones en cualquiera de los tres codones más alterados de la serie (557/558/559).**

Se ha estudiado la posible correlación de los 41 casos que presentan alterados alguno de los tres codones más afectados en todo el estudio: 557 ó 558 ó 559 y los factores de progresión de la enfermedad; observando que existe una asociación entre aquellos casos que presentan mutados cualquiera de los codones 557,558 ó 559 y la presencia de recaídas ($p=0,056$), metástasis ($p=0,021$) y progresión ($p=0,009$). En la figura 135 se observa que en aquellos casos que muestran cualquiera de los tres codones alterados más de un 50% de los casos recaen; metastatizan y progresan.

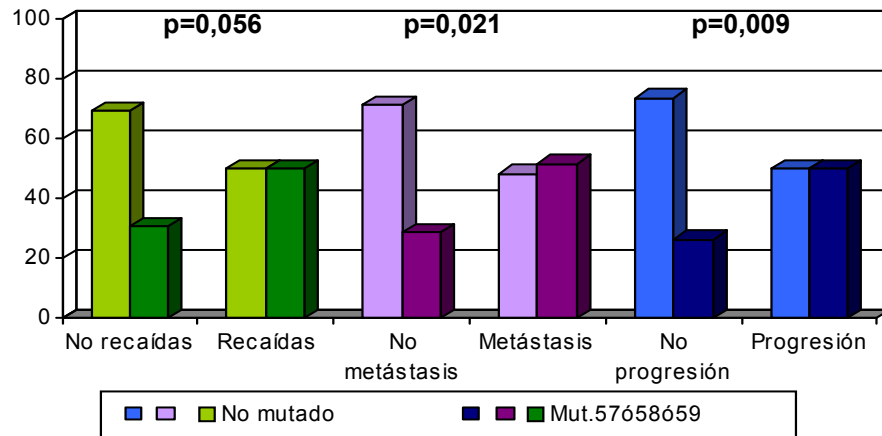


Figura135: Asociación de la presencia de alguna alteración genética en alguno de los codones 557,558 y 559 con los eventos tumorales de progresión.

- **Duplicación de los codones 502-503 en el exón 9 de *c-KIT*.**

En el análisis de casos portadores de la duplicación de los codones 502-503 en el exón 9 con las recaídas y metástasis se detecta que los eventos de progresión son más frecuentes en aquellos casos con la mutación. Obteniendo significación tanto en las recaídas ($p=0,038$), metástasis ($p=0,058$), progresión ($p=0,011$) y exitus ($p=0,014$). Hasta ahora no se había encontrado ningún parámetro relacionado con el evento de exitus; sin embargo, el 13,3% de los casos con la duplicación de estos codones fallecen (Fig136).

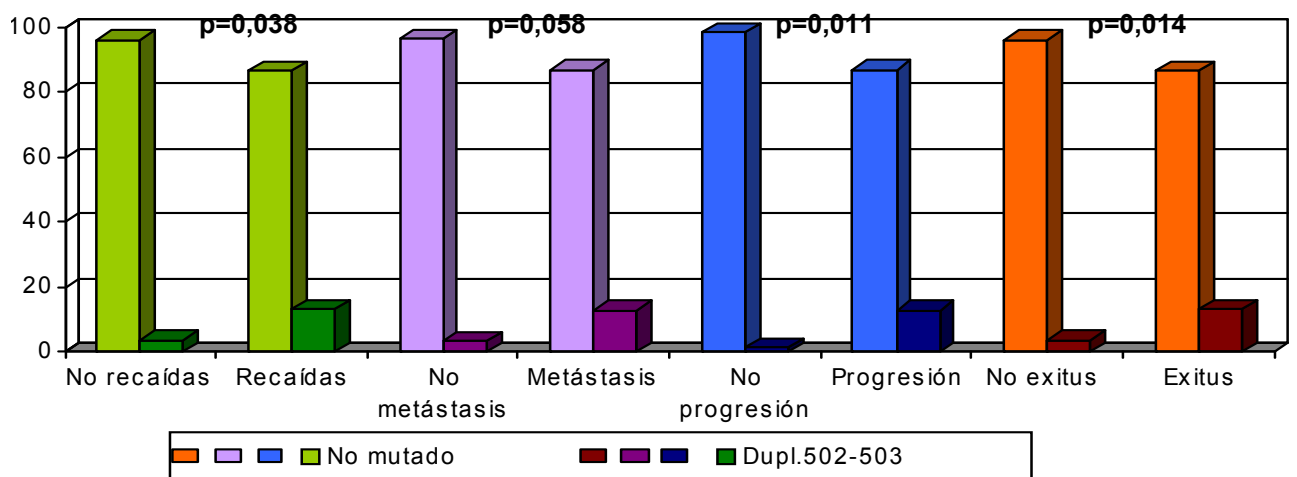


Figura 136: Asociación de la presencia de la duplicación 502-503 del exón nueve de *c-KIT* con los eventos tumorales de progresión.

4.9-CASOS PARTICULARES

4.9.1-CASOS CON DOBLE MUTACIÓN

En nuestra serie hay dos casos que han presentado una adquisición de mutación en el desarrollo de la progresión tumoral; estos dos casos han sido ya mencionados anteriormente pero ahora realizaremos una breve descripción.

El primer caso es una consulta externa de una mujer de 33 años que presenta un tumor localizado en el intestino delgado mayor de 10 cm, con morfología fusocelular y con recuento mitótico de 8 mitosis por 50HPF. El caso fue remitido cuando a la paciente se le diagnosticó metástasis en el hígado catorce años después y al ser tratada con Glivec se observó que no había respuesta. La primera mutación ya descrita por el centro fue confirmada y en el tejido metastático se encontró una mutación resistente a Glivec en el exón 17 de *c-KIT*.

El segundo caso es una mujer de 59 años con un tumor localizado en el epiplón con un tamaño superior a 10 cm, con morfología fusocelular, con presencia de necrosis y con 5 mitosis en 50 HPF. El caso también fue remitido cuando se detectó la presencia de metástasis al cabo de diez años y se procedió a realizar el estudio mutacional a esta pieza detectando duplicación de los codones 502-503 en el exón 9 y delección de los codones 551-556 más mutación puntual con cambio de aminoácido de triptófano a arginina en el exón 11 de *c-KIT*. El análisis mutacional no se había realizado en el tumor primario por diagnóstico de leiomioma por lo que fueron remitidos los bloques más representativos del tumor primario y de la recaída (al cabo de cinco años) hallando que ambos casos únicamente presentaban la duplicación del exón 9 pero no la mutación del exón 11; siendo esta la mutación secundaria.

Tabla.36: Resumen de los datos más relevantes de los dos casos que presentan doble mutación.

Nº	Sexo	Edad	Edad 2ª mut	Tamaño	Órgano	Morfología	Mutación	Riesgo
1	M	33	47	>10 cm	Int.delgado	Fusocelular	<i>c-KIT</i> ex.11: Del.554-559 <i>c-KIT</i> ex.17: V823D	Alto
2	M	59	69	>10 cm	Int.delgado	Fusocelular	<i>c-KIT</i> ex.9: Dupl.502-503 <i>c-KIT</i> ex.11:Del.551-556 + W557R	Bajo

4.9.2-c-KIT NEGATIVOS

En la serie se han descrito 28 casos con ausencia de expresión del marcador inmunohistoquímico c-KIT, entre los cuales 15 no han sido diagnosticados de GIST, siendo en su mayoría leiomiomas. Hay que destacar que en la serie se ha hallado un caso negativo para c-KIT portador de una mutación en el exón 12 de *PDGFR α* , produciendo una delección de los codones 567 al 571 y una mutación puntual en el codón 566 con cambio de aminoácido de Serina a Arginina. Debido a que a nivel histológico se observó la presencia de capas de cebolla entorno a los vasos y un gran número de células inflamatorias, en su mayoría neutrófilos, el caso fue diagnosticado de pólipo fibroide inflamatorio²⁹⁰.

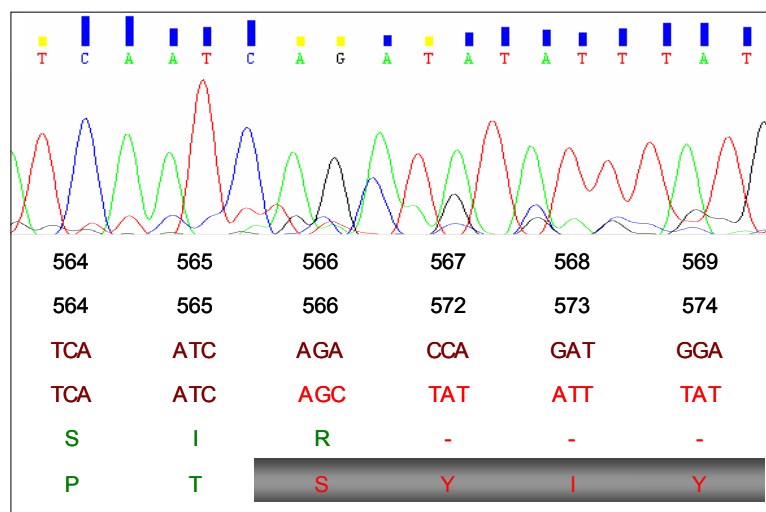


Figura 137: Delección en el exón 12 de *PDGFR α* ; afectando a los codones 567-571 más mutación puntual del codón 566 de Serina a Arginina.

En definitiva, 13 casos *c-KIT* negativos fueron catalogados como GISTs. Cabe destacar que 11 son casos de consulta externa y únicamente dos casos pertenecen al Hospital Clínico de Valencia, se procede a hacer una breve descripción de estos casos (Tabla 37):

De los trece casos, siete son hombres y seis mujeres con una media de edad de 56 años (rango 36-74). El tamaño tumoral varía entre casos menores de 2 cm (3 casos), un caso menor de 5 cm, cuatro entre 6 y 10 cm. y 5 casos mayores de 10 cm. La mayoría de estos casos se encuentran localizados en el estómago (6), seguido de cuatro casos localizados en el intestino delgado, un caso en el intestino grueso, uno extragastrointestinal y uno en el esófago. Son

clasificados según el riesgo histológico de Fletcher 9 alto riesgo, uno intermedio y tres de bajo riesgo. Seis casos presentan necrosis y cuatro pleomorfismo. Respecto al tipo histológico de los tumores: dos casos son epitelioides, 8 fusocelulares y tres poseen patrón mixto. En este subgrupo se han reportado cuatro recaídas, tres metástasis y dos exitus; siendo tratados con Glivec tres pacientes de los cuales uno fallece. Se han encontrado 4 mutaciones en el gen de *c-KIT* y 2 en el *PDGFR α* . Las mutaciones en el gen *c-KIT* son deleciones de más de seis codones: deleción codones 553-572; mutación puntual 567 Asn (AAT)> Lys (AAG) + deleción 568-574+ mutación puntual 575 Gln (CAA)> Glu (GAA); mutación puntual 567 Asn (AAT)>- His (CAT) + deleción 569-576 y por último, una mutación puntual en el codón 816 (cambio de aminoácido de aspártico a valina) en el exón 17. En el gen *PDGFR α* las dos mutaciones halladas son la mutación puntual en el codón 842 Asp (GAC)> Val (GTC).

Tabla 37: Principales datos de los GISTs negativos.

Nº	Sexo	Edad	Tamaño	Órgano	Celularidad	Mutación	Riesgo
1	V	38	6-10cm	Int.delgado	Fusocelular	<i>c-KIT</i> ex.11:deleción 553-572	Alto
2	M	74	<5cm	Int.delgado	Mixta	No mutado	Bajo
3	M	50	6-10cm	Estómago	Fusocelular	<i>c-KIT</i> .ex.11:N567K+del. 568-574+Q575E	Alto
4	V	70	6-10cm	Int.grueso	Epitelial	<i>c-KIT</i> ex.17:D816V	Bajo
5	V	67	6-10cm	Estómago	Epitelial	<i>PDGFRα</i> : D842V	Alto
6	V	37	>10cm	Estómago	Fusocelular	No mutado	Alto
7	M	68	>10cm	Estómago	Mixta	<i>PDGFRα</i> : D842V	Alto
8	V	36	6-10cm	Int.delgado	Fusocelular	No mutado	Alto
9	M	37	>10cm	Int.delgado	Fusocelular	<i>c-KIT</i> ex.11:N567H:Asn-His + Del. 569-576	Alto
10	M	48	>10cm	Extragastróint	Fusocelular	No mutado	Alto
11	V	63	<5cm	Estómago	Fusocelular	No mutado	Bajo
12	M	48	>10cm	Extragastróint	Fusocelular	No mutado	Alto
13	V	62	<5cm	Estómago	Mixta	No mutado	Intermedio

Seguidamente destacaremos las asociaciones más significativas entre los GISTs negativos y los parámetros clínico-histopatológicos y moleculares:

- **Edad:** los casos que son negativos inmunohistoquímicamente se concentran entre las edades de 36 a 70 años y no se presenta ningún caso en edades juveniles; siendo la distribución diferente en los *c-KIT* positivos, los cuales se concentran de los 51 años en adelante ($p=0,018$).

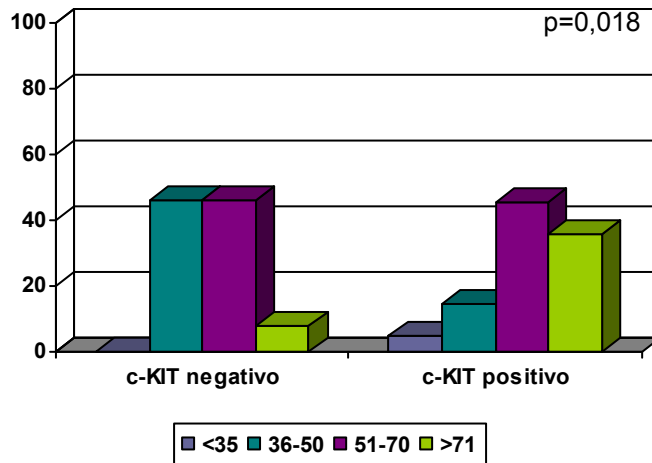


Figura 138: Histograma con las edades distribuidas en los c-KIT negativos y los c-KIT positivos inmunohistoquímicamente.

- **CD34:** el 70,3% de los casos c-KIT positivos presentan también positividad para el marcador inmunohistoquímico CD34; no obstante 41,7% de casos c-KIT negativos son positivos para este marcador, ayudando así al diagnóstico de GIST.

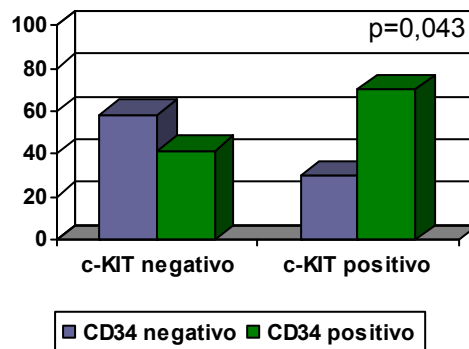


Figura 139: Asociación entre los marcadores inmunohistoquímicos c-KIT y CD34.

- **Gen c-KIT:** los casos negativos para c-KIT en un 69% no se encuentran mutados, por el contrario 60,2% de los casos mutados muestran expresión para c-KIT.

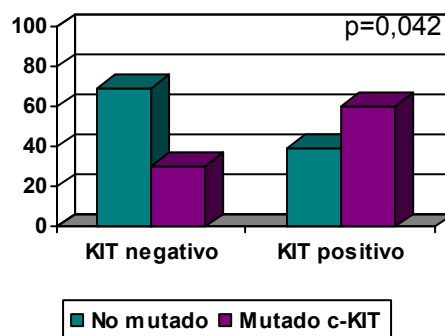


Figura 140: Representación de los casos mutados para el gen c-KIT y la asociación con su marcador inmunohistoquímico.

- Exón mutado del gen *c-KIT*:** cuando analizamos los casos negativos, observamos como se ha mencionado anteriormente que el 69,2% de los casos no se encuentran mutados y las cuatro mutaciones se distribuyen :tres en el exón 11 y una en el 17. Sin embargo, de los casos KIT positivos el 52,8% presentan mutación en el exón 11 y 39,8% no se encuentran mutados.

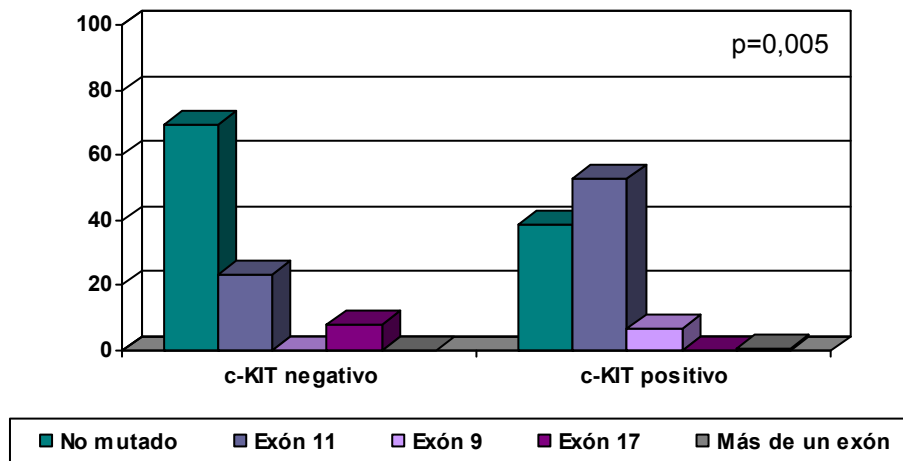


Figura 141: Histograma representativo de la distribución de mutaciones en el gen *c-KIT* en los casos negativos y positivos para el marcadores inmunohistoquímico.

- Mutación en los codones 557-558-559:** Como anteriormente se ha mencionado, los exones más mutados en la serie son los codones 557-558 y 558; sin embargo en las mutaciones presentes en los casos c-KIT negativos sólo un caso es portador de estos codones.

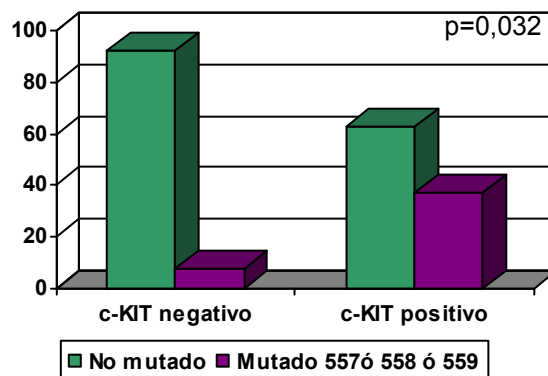


Figura 142: Asociación entre los casos c-KIT negativos y los codones más mutados de la serie.

- **Gen *PDGFRα*:** Los casos c-KIT negativos en un 23,1% presentan mutación en el gen *PDGFRα*, por el contrario los casos c-KIT positivos presentan mutación en dicho gen en un 6,7%.

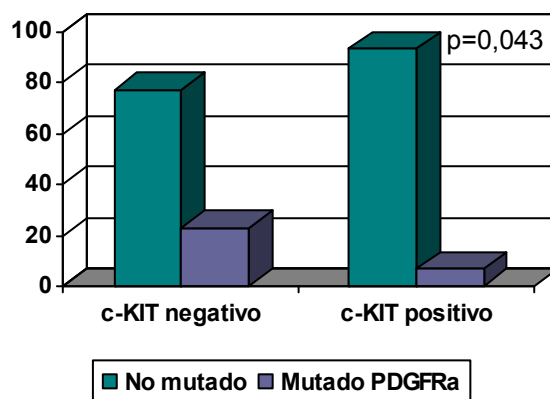


Figura 143: Histograma representativo de la asociación entre los casos c-KIT negativos y las mutaciones en el gen *PDGFRα*.

- **Progresión tumoral:** Cuando se analizan la progresión tumoral en los casos c-KIT negativos se observa como éstos presentan mayor número de recaídas (71,4%) y de progresión (77,8%); contrariamente los casos positivos para el marcador recaen en un 24,5% y progresan en un 36,8%.

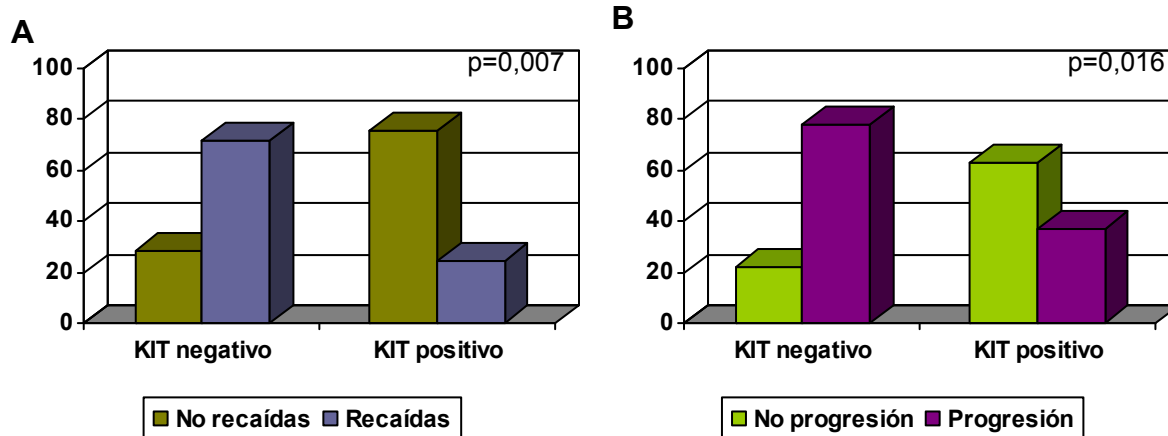


Figura 144: Histogramas representativos de la asociación entre la positividad o negatividad de c-KIT y los eventos de progresión: recaídas (A) y progresión (B).

4.10-ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA

Se ha realizado el estudio de progresión y de supervivencia en todos aquellos GIST de los que se disponía de la evolución clínica del paciente, siendo éstos un total de 111 casos. Por falta de seguimiento se han excluido 34 casos.

En la muestra total de casos diagnosticados de GIST, la mediana de seguimiento ha sido de 52 meses, con un rango de entre 1 a 244,9 meses. Con una supervivencia de la serie a los 5 años del 45% de los casos.

4.10.1-FUNCIONES DE SUPERVIVENCIA PARA EL INTERVALO LIBRE DE PROGRESION

De los 111 GIST de la serie han recidivado 30, han metastatizado 32 y han fallecido a causa del tumor 36.

En el intervalo libre de progresión se incluye el primer evento de progresión que se manifiesta en el paciente, ya sea recaída o metástasis. En la tabla 38 que sigue a continuación también son anotadas las significaciones del intervalo libre de recurrencia y de metástasis:

Tabla 38: Resumen de las principales significaciones en los eventos de progresión tumoral.

Parámetros	ILR p	ILM p	ILP p
CLINICOS			
Sexo	0,2889	0,3033	0,1680
Edad	0,0297	0,5816	0,0654
Tratamiento con Glivec	<0,0001	<0,0001	<0,0001
ANATOMOPATOLÓGICOS			
Tamaño	0,0736	0,1065	0,0181
Tamaño<5/>5	0,0116	0,018	0,0017
Localización	0,6820	0,5515	0,4571
Localización (est,ID, otros)	0,3911	0,3033	0,1888
Localización extragastroint.	0,5440	0,2320	0,3161
Resección completa	0,0014	0,5755	0,0014
Mitosis	0,0598	<0,0001	0,0002
Mitosis<5/>5	0,0241	0,018	<0,0001
Necrosis	0,1784	<0,0001	0,0002
Pleomorfismo	0,1328	0,0179	0,0224
Celularidad	0,0364	0,0001	0,0003
Grado Fletcher	0,0001	0,0001	<0,0001
Grado Miettinen	0,0069	<0,0001	<0,0001
MARCADORES HIQ			
c-KIT	0,0484	0,0074	0,0027
PDGFRα	0,7591	0,4447	0,2391
CD34	0,6322	0,8641	0,6842
AML	0,0237	0,0237	0,0237
KI-67	0,4542	0,0004	<0,0001
MDM2	0,8014	0,4795	0,5804
P53	0,8570	0,8570	0,2788
S-100	0,2281	0,3036	0,0534

Tabla 38 (Cont.): Resumen de las principales significaciones en los eventos de progresión.

Parámetros	ILR p	ILM p	ILP p
BIOLOGÍA MOLECULAR			
<i>c-KIT</i> GEN	0,0041	0,0031	0,0007
<i>c-KIT</i> exón	0,0287	0,0287	0,0159
<i>c-KIT</i> exones (0,11,9)	0,0103	0,0102	0,002
Mutaciones <i>c-KIT</i>	0,0031	0,0008	0,0007
Mut.homocigosis	0,1678	0,7370	0,4735
Del.557-558	0,3004	0,3018	0,1971
Del.557	0,4804	0,079	0,1005
Del.558	0,1415	0,0124	0,004
Del.559	0,8517	0,0306	0,0524
Mut 557-558-559	0,2773	0,0408	0,0369
Mut+del. 557-558	0,2431	0,0349	0,0217
Dupl.502-503	0,1434	0,1979	0,1050
<i>PDGFRα</i> gen	0,2473	0,6729	0,4026
<i>PDGFRα</i> exón	0,2473	0,6796	0,4026
GIST/NO GIST	0,4996	0,2484	0,2788

A) ASOCIACIÓN DEL TIEMPO A LA PROGRESIÓN CON LOS PARÁMETROS CLÍNICO-HISTOPATOLÓGICOS:

En la tabla que sigue a continuación se resumen los resultados obtenidos al analizar los intervalos libres de progresión de los parámetros clínicos y anatomopatológicos. Además quedan reflejados en la tabla 39 el número de casos analizados, los eventos en cada grupo de los parámetros, la progresión acumulada y la significación estadística de cada parámetro estudiado:

Tabla 39: Resumen de las principales significaciones de los parámetros clínico-histopatológicos.

Parámetros	Nº	Eventos	%PA	%ILP	p
SEXO					0,1680
Masculino	68	31	35	54	
Femenino	48	16	30	67	
EDAD					0,0654
<35	6	1	42	67	
35-50	23	9	21	39	
51-70	49	18	25	51	
>70	38	7	77	82	
EDAD					0,0103
<70	78	40	21	49	
>70	38	7	77	82	
Res. no completa					0,038
No	16	10	13	38	
Sí	99	37	35	63	
Tto. con GLIVEC					<0,0001
No tratados	81	21	48	74	
Tratados	32	24	0	25	
TAMAÑO					0,0163
<2cm.	10	2	0	80	
5cm.	22	4	66	82	
6-10cm.	45	21	20	53	
10cm.	39	20	30	49	

Tabla 39 (Cont.): Resumen de las principales significaciones de los parámetros clínico-histopatológicos.

Parámetros	Nº	Eventos	%PA	%ILP	p
TAMAÑO					0,0014
<5cm.	32	6	49	81	
>5cm.	84	41	27	52	
LOCALIZACIÓN					0,33
Estómago	57	16	58	72	
Int.delgado	29	13	35	55	
Int.grueso	13	7	14	38	
Extragaointest.	16	10	15	37	
Otros	1	0		100	
LOCALIZACIÓN					0,1888
Estómago	57	16	58	72	
Int.delgado	29	13	35	55	
Otros	29	17	11	41	
EXTRAGASTROINT.					0,3161
No	100	37	42	63	
Sí	16	10	15	38	
MITOSIS					<0,0001
<5	67	16	55	76	
6-10	21	12	12	43	
>10	24	8	19	33	
MITOSIS					<0,0001
<5	67	16	55	76	
>5	45	27	16	38	
NECROSIS					0,0001
No	63	16	39	75	
Sí	49	27	35	45	
PLEOMORFISMO					0,032
No	63	20	37	69	
Sí	49	23	36	53	
HISTOLOGIA					0,0004
Epitelial	12	2	70	83	
Fusocelular	81	30	29	63	
Mixto	19	13	11	32	
RIESGO FLETCHER					<0,0001
Muy Bajo-Bajo	34	2	83	94	
Medio	18	4	44	78	
Alto	62	39	10	37	
RIESGO MIETTINEN					<0,0001
Muy Bajo	20	1	86	95	
Bajo	16	1	92	94	
Medio	18	5	44	72	
Alto	44	30	15	32	

- **Edad**

Cuando se analiza la progresión en función de la edad, se observa que el mayor intervalo libre de progresión (ILP) se encuentra en aquellos pacientes mayores de 70 años como queda reflejado claramente en la figura 145. El resto de grupos presentan intervalos muy similares.

Parámetros	Nº Eventos	%PA	%ILP	p
EDAD				0,0654
<35	6	1	42	67
35-50	23	9	21	39
51-70	49	18	25	51
>70	38	7	77	82
EDAD				0,0103
<70	78	40	21	49
>70	38	7	77	82

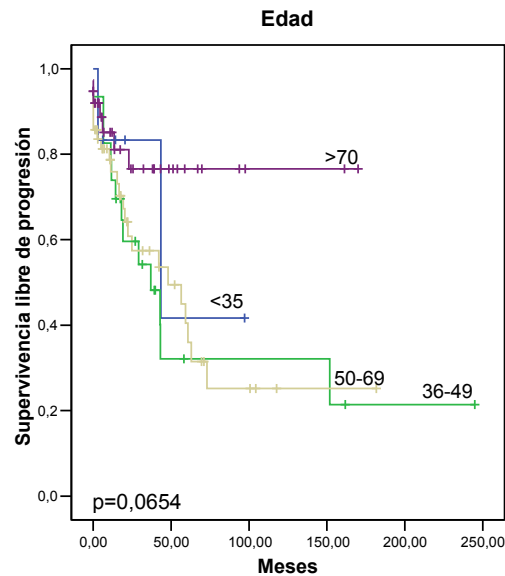


Figura 145: Representación de Kaplan-Meier de los grupos de edades en relación al ILP.

Debido a los resultados obtenidos anteriormente, dividimos los pacientes en los grupos de edad tomando la edad de 70 años como punto de corte. De esta forma se observa que pacientes mayores de 70 años muestran un menor intervalo de progresión respecto a los casos menores de 70 (Fig.146).

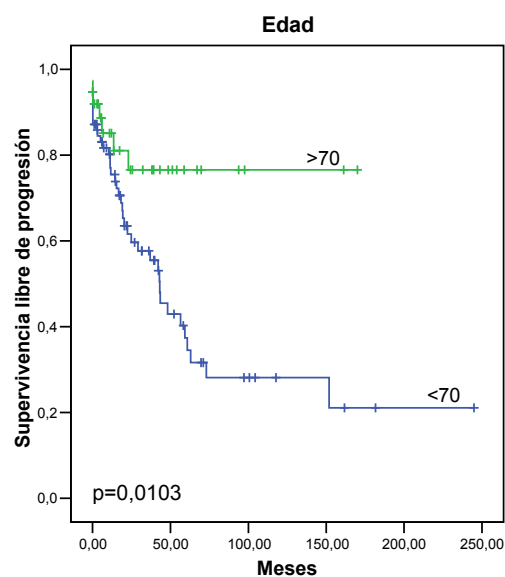


Figura 146: Representación de Kaplan-Meier en función de la edad, tomando 70 años como punto de corte y su relación con el ILP.

- **Resección completa del tumor**

En aquellos casos a los que se les realiza una resección completa el ILP es de un 63% versus a los tumores irresecables que presentan el 38%, progresando de 16 casos a 10 (Fig.147).

Parámetros	Nº	Eventos	%PA	%ILP	p
Res. completa					0,038
No	16	10	13	38	
Sí	99	37	35	63	

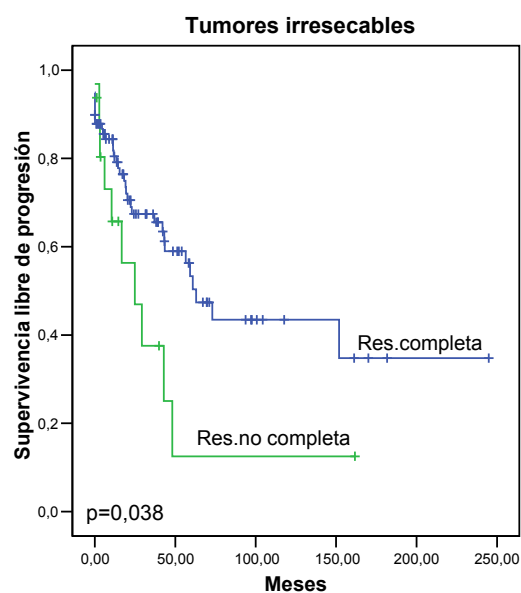


Figura 147: Representación de Kaplan-Meier en función de la resección completa del tumor y el ILP.

- **Tratamiento con Glivec**

Existe una diferencia muy significativa entre los pacientes tratados con mesilato de imatinib (25%) y los que no respecto (74%) al ILP (Fig.148).

Parámetros	Nº	Eventos	%PA	%ILP	p
Tto. con GLIVEC					<0,0001
No tratados	81	21	48	74	
Tratados	32	24	0	25	

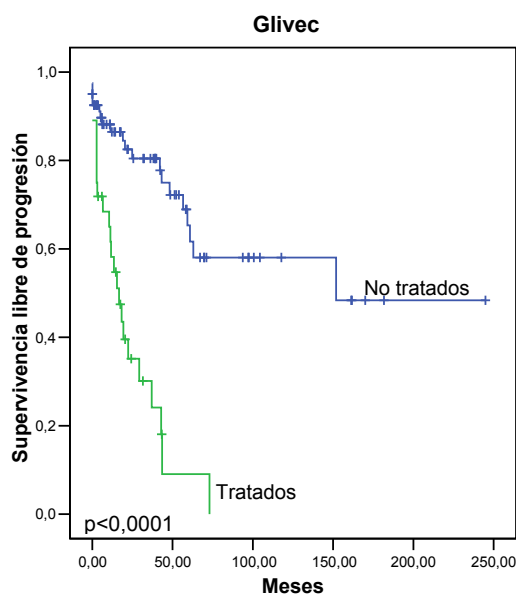


Figura 148: Representación de Kaplan-Meier en función de los casos tratados con Glivec y el ILP, observando la rápida progresión de estos casos.

B) ASOCIACIÓN DEL TIEMPO A LA PROGRESIÓN CON LOS HALLAZGOS ANATOMOPATOLÓGICOS:

Parámetros macroscópicos

- **Tamaño**

Aquellos casos con un tamaño comprendido entre los 6 y 10 cm. no progresan en el 53% y aquellos con más de 10 cm. en el 49%. Contrariamente, los casos inferiores de 5 cm. presentan más de un 80% de ILP.

Lo que anteriormente se ha destacado respecto a los cuatro grupos de tamaño tumoral, al agrupar el tamaño tumoral en menor o mayor a 5cm observamos que aquellos casos con tumores menores de 5cm tienen un intervalo libre de progresión de más del 80% respecto a los superiores de 5 cm en que es inferior de 52% (Fig.149).

Parámetros	N°	Eventos	%PA	%ILP	p
TAMAÑO					0,0163
<2cm.	10	2	0	80	
<5cm.	22	4	66	82	
6-10cm.	45	21	20	53	
>10cm.	39	20	30	49	
TAMAÑO					0,0014
<5cm.	32	6	49	81	
>5cm.	84	41	27	52	

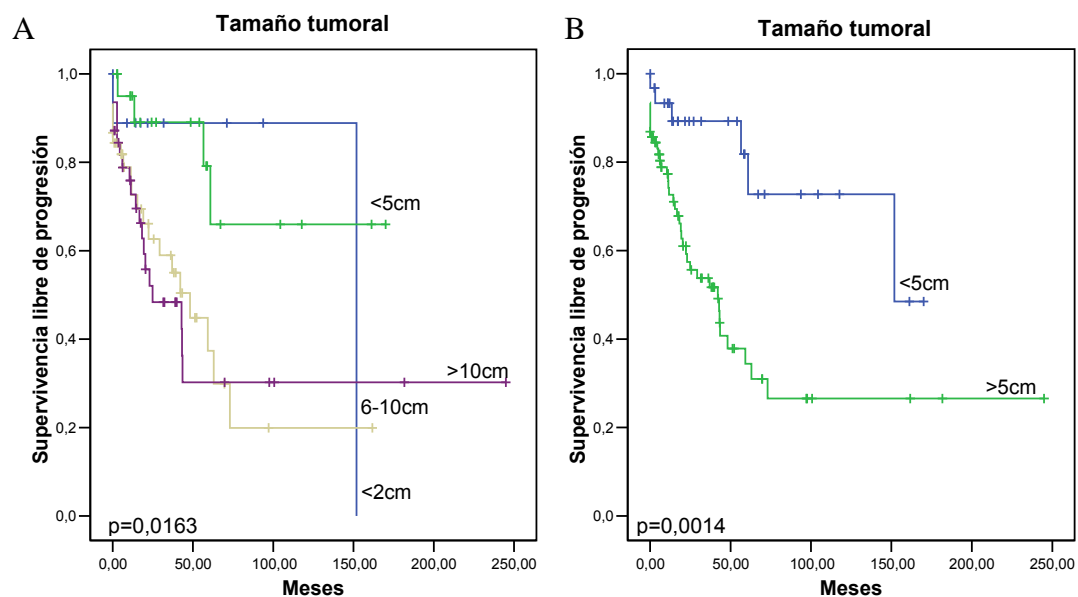


Figura 149: Representación de Kaplan- Meier en función de los diferentes grupos de los tamaños tumorales según los criterios de Fletcher respecto al ILP (A) y los casos que presentan un tamaño mayor o inferior a 5cm con el intervalo libre de progresión.

Parámetros microscópicos

- **Mitosis**

Cuando se analiza el número de mitosis respecto al ILP, observamos que presentan un elevado ILP aquellos casos con menos de cinco mitosis (un 76% de casos libres de progresión) y contrariamente, el resto de casos manifiestan menos del 40% de ILP (Fig.150).

Parámetros	Nº	Eventos	%PA	%ILP	p
MITOSIS					<0,0001
<5	67	16	55	76	
6-10	21	12	12	43	
>10	24	8	19	33	
MITOSIS					<0,0001
<5	67	16	55	76	
>5	45	27	16	38	

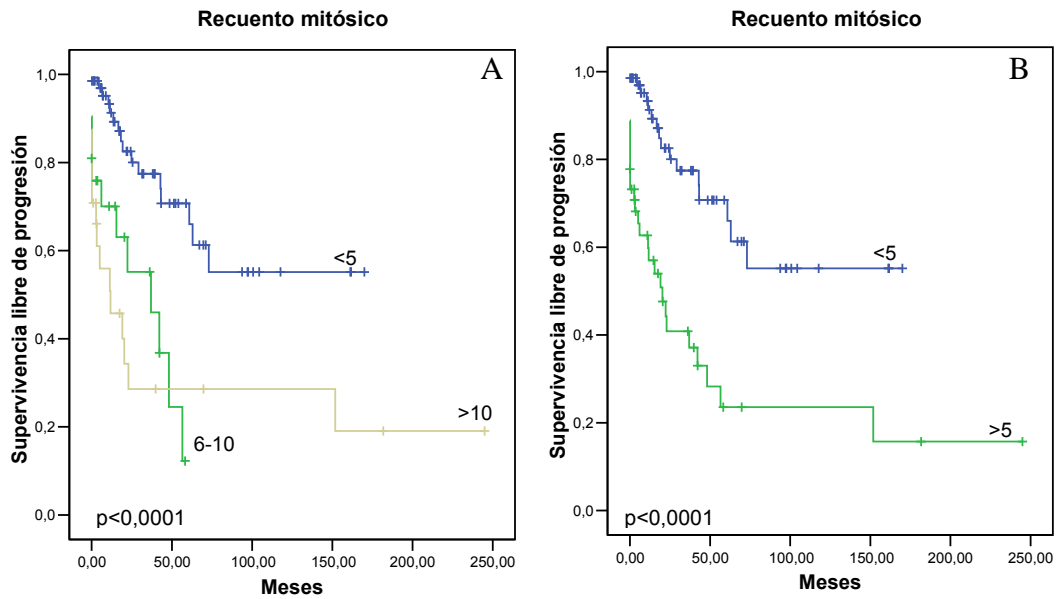


Figura 150: Representación de Kaplan-Meier del número de mitosis respecto al ILP, primer gráfico en tres grupos (A) y el segundo en dos (B). En los que se observa que los casos con menos de 5 mitosis no presentan mucha progresión.

• **Necrosis**

Un 75% de los casos que no presentan necrosis no progresan, mientras que los casos con necrosis presentan un 45% de ILP (Fig.151).

Parámetros	Nº	Eventos	%PA	%ILP	p
NECROSIS					0,0001
No	63	16	39	75	
Sí	49	27	35	45	

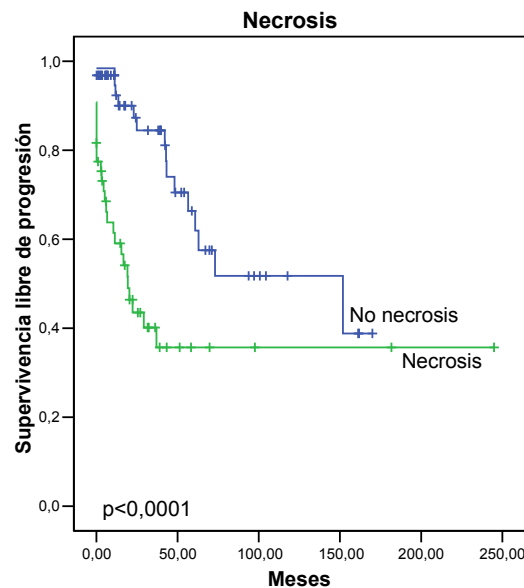


Figura 151: Gráfica de Kaplan-Meier en el que se representa la necrosis en relación con el ILP.

- **Pleomorfismo**

Cuando se analiza el pleomorfismo se obtiene un comportamiento muy parecido a la necrosis. El porcentaje de ILP es superior en aquellos casos sin pleomorfismo (69%) en comparación a los casos que presentan pleomorfismo (53%) (Fig.152).

Parámetros	Nº	Eventos	%PA	%ILP	p
PLEOMORFISMO					0,032
No	63	20	37	69	
Sí	49	23	36	53	

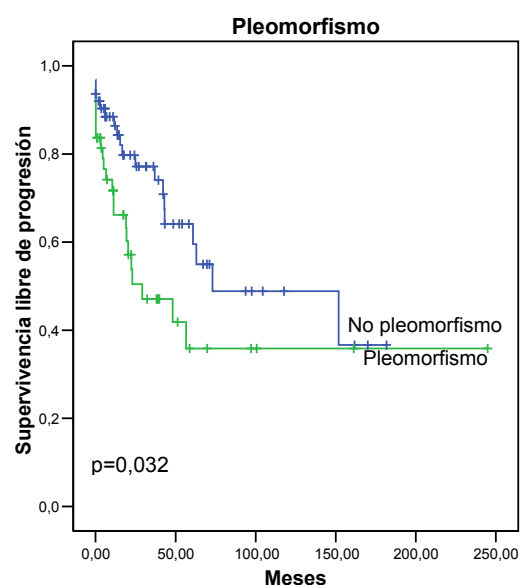


Figura 152: Gráfica de Kaplan-Meier que representa el pleomorfismo en relación con el ILP.

- **Tipo histológico.**

Cuando se estudia la celularidad de los diferentes tumores respecto el ILP, se observa que los GISTs de histología epitelioide presentan el mejor ILP (83%), en menor porcentaje se encuentra los GISTs fusocelulares (63%), seguida de los mixtos (32%) (Fig.153).

Parámetros	Nº	Eventos	%PA	%ILP	p
TIPO HISTOLOGICO					0,0004
Epitelioide	12	2	70	83	
Fusoceluloide	81	30	29	63	
Mixto	19	13	11	32	

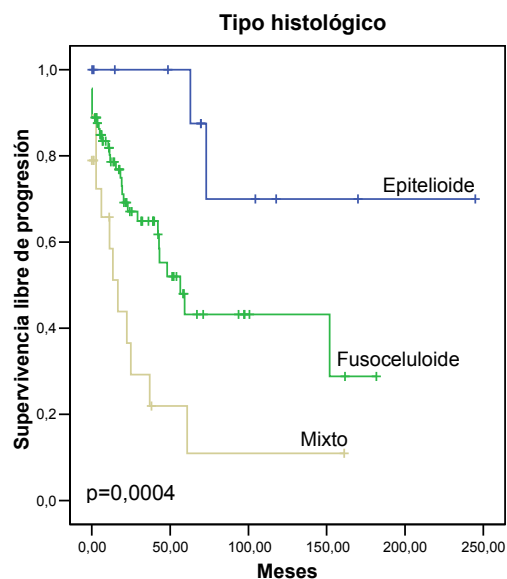


Figura 153: Representación de Kaplan-Meier de las diferentes celularidades respecto al ILP, destacando la progresión de los casos con celularidad mixta.

- **Grupo de riesgo según Fletcher**

En la clasificación del riesgo patológico del tumor según los criterios de Fletcher se observa muy claramente como aquellos casos clasificados de muy bajo y bajo riesgo se encuentran libres de progresión en un porcentaje muy elevado (100 y 93% respectivamente), también los casos clasificados de riesgo intermedio pero en menor número (68%); sin embargo los tumores clasificados de alto riesgo presentan ILP muy bajos (37%) (Fig.154).

Parámetros	Nº	Eventos	%PA	%ILP	p
RIESGO					<0,0001
Muy Bajo	8	0	8	100	
Bajo	27	2	25	93	
Medio	19	6	13	68	
Alto	62	39	23	37	

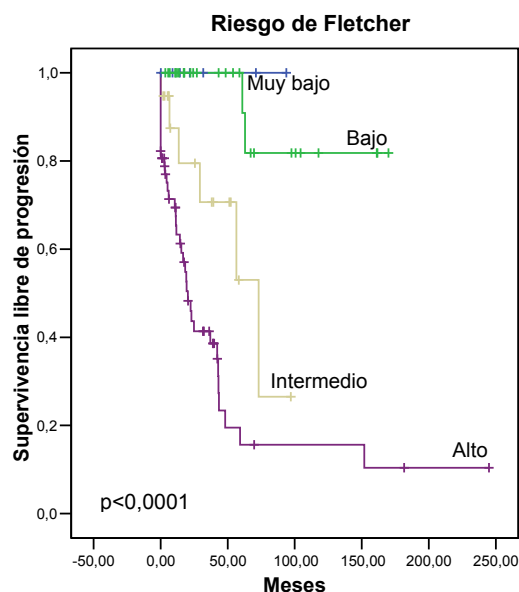


Figura 154: Gráfica de Kaplan-Meier en el que se representan los grupos de riesgo según la clasificación de Fletcher con el ILP.

- **Grupo de riesgo según Miettinen**

Se obtienen resultados muy similares de progresión a los del riesgo de Fletcher como se puede ver en la figura 155. En la clasificación del riesgo patológico del tumor según los criterios de Miettinen se observa muy claramente como aquellos casos clasificados de muy bajo y bajo riesgo se encuentran libres de progresión en un porcentaje muy elevado (95 y 94%), también los casos clasificados de riesgo intermedio con un porcentaje superior al grupo de Fletcher (72%); sin embargo los tumores clasificados de alto riesgo presentan ILP muy bajos e inferiores a la clasificación de Fletcher (32%).

Parámetros	Nº	Eventos	%IP	%ILP	p
RIESGO					<0,0001
Muy Bajo	20	1	86	95	
Bajo	16	1	92	94	
Medio	18	5	44	72	
Alto	44	30	15	32	

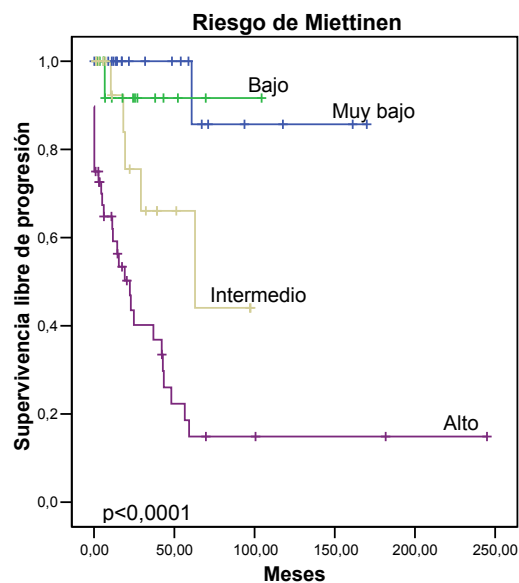


Figura 155: Gráfica de Kaplan-Meier en el que se representan los grupos de riesgo según la clasificación de Miettinen con el ILP.

C) ASOCIACIÓN DEL TIEMPO A LA PROGRESIÓN CON LOS HALLAZGOS INMUNOHISTOQUÍMICOS:

En la tabla 40 se recogen los principales hallazgos en cuanto a expresión de inmunomarcadores y tiempo de progresión.

Tabla 40: Hallazgos obtenidos entre el intervalo libre de progresión y los marcadores IHQ.

Parámetros	Nº	Eventos	%IP	%ILP	p
c-KIT					0,0027
0	8	6	17	25	
+	18	5	60	72	
++	25	6	42	76	
+++	59	25	22	58	
c-KIT					0,0318
0	9	7	17	22	
+	102	36	38	65	
PDGFRα					0,7664
0	20	7	51	65	
+	38	7	42	66	
CD-34					0,2707
0	32	17	30	47	
+	73	23	67	68	
S-100					0,0534
0	65	22	40	66	
+	18	10	0	44	
++	12	3	51	75	
+++	4	2	50	50	
S-100					0,2773
0	65	22	40	66	
+	34	15	33	56	
KI-67					0,0018
0	38	7	62	82	
<5%	34	15	37	56	
>5%	14	8	31	43	

Tabla 40(Cont.): Hallazgos obtenidos entre el intervalo libre de progresión y los marcadores HIQ.

Parámetros	Nº	Eventos	%IP	%ILP	p
KI-67					0,0046
0	38	7	62	82	
+	48	23	33	52	
MDM2					0,5084
0	19	9	37	53	
+	27	12	20	56	
P53					0,1353
0	32	12	39	62	
positivo	30	16	37	47	
AML					0,3940
0	40	14	0	65	
+	59	25	43	58	
DESMINA					0,0744
0	77	32	30	58	
+	18	3	72	83	
VIMENTINA					0,3457
0	3	1	67	67	
+	65	27	30	58	
CROMOGRANINA					0,6275
0	51	22	36	57	
+	13	6	43	54	
SINAPTIFISINA					0,3014
0	49	19	44	61	
+	9	5	0	44	
PGP9,5					0,1915
0	2	1	50	50	
+	19	5	65	72	
CD99					0,0936
0	23	8	52	65	
+	33	16	28	52	

- **c-KIT**

Aquellos casos negativos para el marcador presentan un 75% de progresión tumoral; los tumores intensamente positivos casi la mitad de ellos progresan, sin embargo los casos débilmente positivos o con positividad intermedia tienen más de un 70% de ILP (Fig.156).

Parámetros	Nº	Eventos	%PA	%ILP	p
c-KIT					0,0027
0	8	6	17	25	
+	18	5	60	72	
++	25	6	42	76	
+++	59	25	22	58	
c-KIT					0,0318
0	9	7	17	22	
+	102	36	38	65	

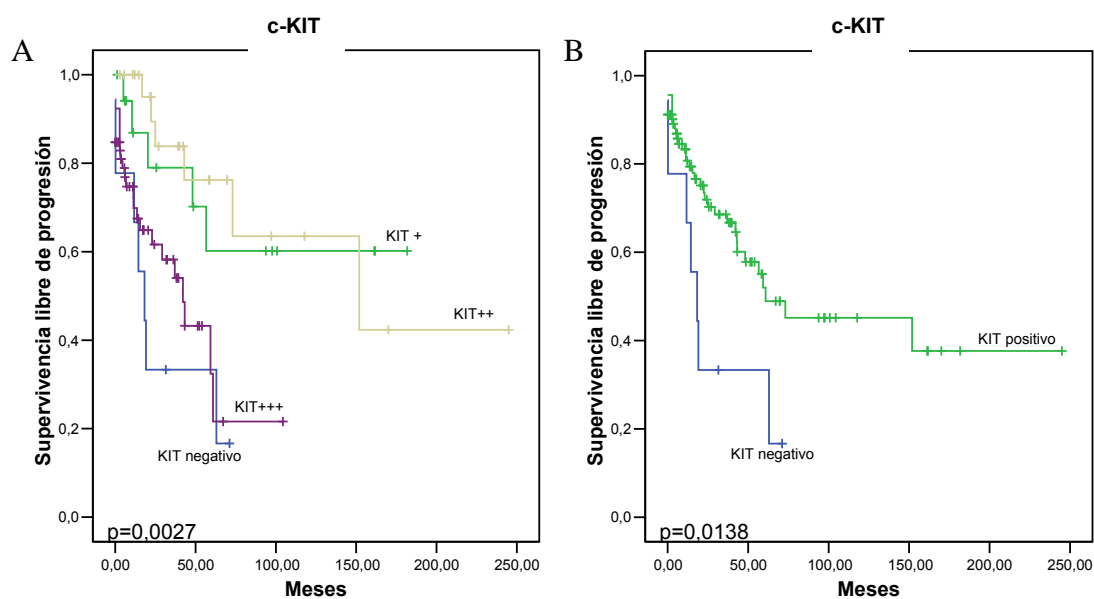


Figura 156: Gráfica de Kaplan-Meier en el que se representa el marcador c-KIT respecto al ILP. En la gráfica (A) se representan cuatro niveles de intensidades y en la (B) los casos clasificados en positivos y negativos; presentando en ambas gráficas la mayor progresión los casos negativos.

- **KI-67**

Cuando se analiza el marcador de proliferación celular Ki-67 se observa cómo los casos negativos para dicho marcador presentan un ILP del 82%, sin embargo el ILP disminuye considerablemente (56%) con una expresión inferior al 5% de las células y a un 43% cuando la expresión es positiva en más del 5% (Fig.157).

Parámetros	Nº	Eventos	%PA	%ILP	p
KI-67					0,0018
0	38	7	62	82	
<5%	34	15	37	56	
>5%	14	8	31	43	

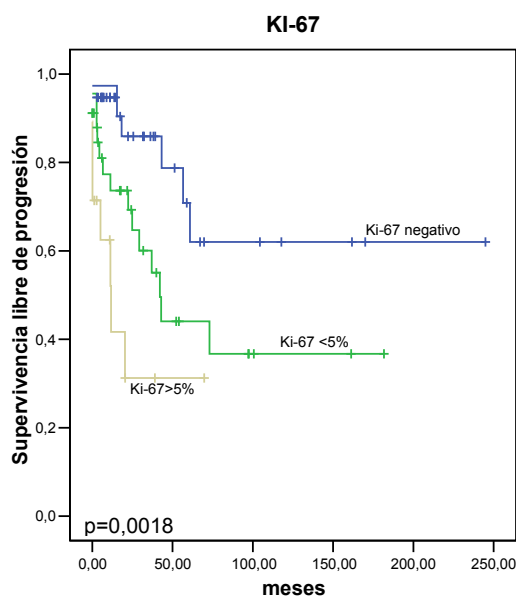


Figura 157: Gráfica de Kaplan-Meier en el que se representa el marcador Ki-67 respecto al ILP.

D) ASOCIACIÓN DEL TIEMPO A LA PROGRESIÓN CON LOS HALLAZGOS DE BIOLOGIA MOLECULAR:

En la tabla 41 se recogen los principales hallazgos en cuanto a las mutaciones de *c-KIT* y *PDGFR α* y el tiempo de progresión.

Tabla 41: Hallazgos obtenidos entre el intervalo libre de progresión y las mutaciones halladas.

Parámetros	Nº	Eventos	%PA	%ILP	p
Mutaciones en <i>c-KIT</i>					0,0007
No mutado	44	8	72	82	
Mutado	70	37	12	46	
<i>c-KIT</i> EXÓN					0,002
No mutado	44	8	74	82	
Exón 11	62	31	15	50	
Exón 9,13,17	7	6	0	14	
<i>c-KIT</i> MUTACION					0,0007
No mutado	44	8	74	82	
Deleción	35	19	0	43	
Duplicación	12	8	0	33	
Mut.puntual	15	4	58	73	
Del+Mut.punt.	8	6	25	25	
Mut.HOMOCIGOSIS					0,4735
No mutado	111	45	45	59	
Homocigosis	4	1	67	75	
Del.557-558					0,1235
No del.557-558	91	32	44	65	
Del.557-558	22	13	14	41	
Del.559					0,0265
No del.559	91	33	34	64	
Del.559	23	13	27	43	
Del.558					0,004
No del.558	82	26	47	68	
Del.558	31	19	11	39	

Tabla 41(Cont.): Hallazgos obtenidos entre el intervalo libre de progresión y las mutaciones halladas.

Parámetros	Nº	Eventos	%PA	%ILP	p
Del.557					0,0621
No del.557	86	29	44	66	
Del.557	28	17	15	39	
Mut.557ó558ó559					0,0240
No mutado	73	23	45	68	
Mutado	41	23	15	44	
Del.+Mut.557-558					0,0127
No del+mut	80	26	45	67	
Mutado	34	20	14	41	
Duplicación 502-503					0,1168
No dupl.502-503	107	40	37	63	
Mutado	7	6	0	14	
PDGFRα GEN					0,3926
No mutado	107	45	23	58	
Mutado	5	1	80	80	
PDGFRα EXON					0,3926
No mutado	107	45	23	58	
Mutado	5	1	80	80	

- **Mutaciones en *c-KIT*.**

Como se observa en la figura 158 aquellos casos que no presentan mutación en el gen *c-KIT* presentan un ILP mayor (82%), que los casos mutados. (46%).

Parámetros	Nº	Eventos	%PA	%ILP	p
Mutaciones en <i>c-KIT</i>					0,0006
No mutado	44	8	72	82	
Mutado	70	38	12	46	

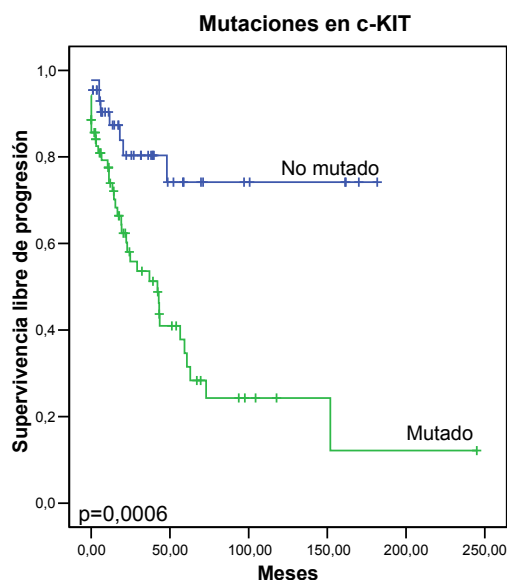


Figura 158: Gráfico de Kaplan-Meier en el que se representa el estatus mutacional de *c-KIT* y el ILP.

- **Exones mutados en el gen *c-KIT*.**

Como se ha comentado anteriormente, los casos que no se encuentran mutados tienen un alto ILP. Por el contrario, los casos mutados en el exón 11 de *c-KIT* presentan un ILP del 50%. Aquellos casos que presentan alguna mutación en los exones 9, 13 ó 17 de *c-KIT* son los que peor ILP presentan (14%) (Fig.159).

Parámetros	Nº	Eventos	%PA	%ILP	p
<i>c-KIT</i> EXÓN					0,002
No mutado	44	8	74	82	
Exón 11	62	31	15	50	
Exón 9,13,17	7	6	0	14	

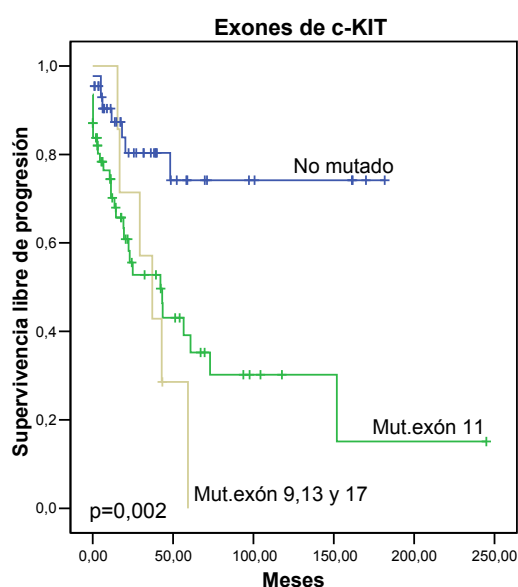


Figura 159: Gráfico de Kaplan-Meier en el que se representa el estatus de mutaciones de *c-KIT* en función de los exones mutados en relación al ILP.

- **Tipo de mutación presente en *c-KIT***

Como se ha observado anteriormente, los casos no mutados son los que presentan un mejor un mayor intervalo libre de progresión (82%); seguido por las mutaciones puntuales (73%); los que peor pronóstico presentan son aquellos casos con deleciones intersticiales en el exón 11 (43%), con duplicaciones (33%) y con deleción intersticial acompañada de una mutación puntual (25%) (Fig.160).

Parámetros	Nº	Eventos	%PA	%ILP	p
c-KIT MUTACION					0,0007
No mutado	44	8	74	82	
Delección	35	19	0	43	
Duplicación	12	8	0	33	
Mut.puntual	15	4	58	73	
Delección+Mut.puntual	8	6	25	25	

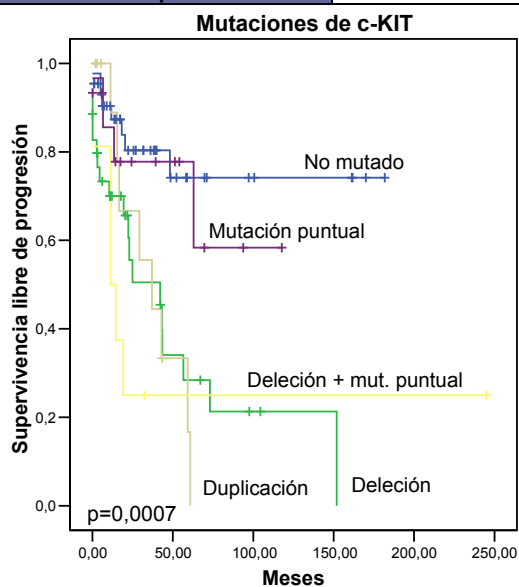


Figura 160: Gráfica de Kaplan-Meier en el que se representan las diferentes mutaciones respecto a su intervalo libre de progresión.

- **Delección 557-558**

La presencia de la delección intersticial 557-558 del exón 11 de *c-KIT* no parece tener un impacto estadísticamente significativo en el ILP. Sin embargo, aquellos casos con esta alteración genética muestran un ILP peor (Fig.161).

Parámetros	Nº	Eventos	%PA	%ILP	p
Del.557-558					0,1235
No del.557-558	91	32	44	65	
Del.557-558	22	13	14	41	

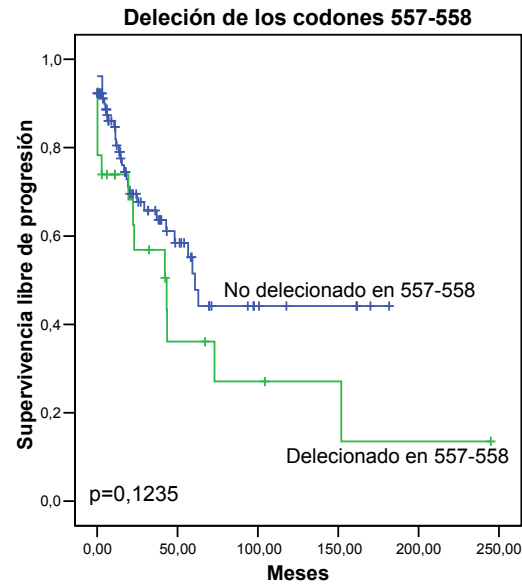


Figura 161: Gráfica de Kaplan-Meier en la que se representan los casos con delección 557-558 respecto a su ILP.

- **Delección 559**

Los casos en los que se ha detectado una delección del codón 559 del gen *c-KIT* presentan un ILP menor (43%) al resto de casos (64%). (Fig.162).

Parámetros	Nº	Eventos	%PA	%ILP	p
Del.559					0,0265
No del.559	91	33	34	64	
Del.559	23	13	27	43	

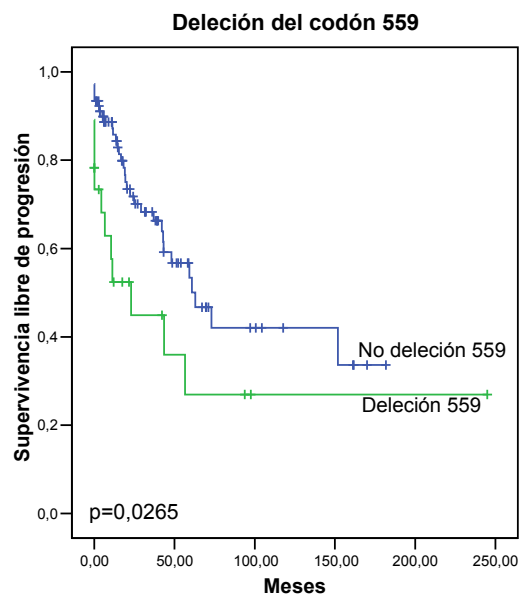


Figura 162: Gráfica de Kaplan-Meier en el se representan los casos portadores de la delección del codón 559 respecto al ILP.

- **Delección 558**

Se observa un comportamiento similar cuando analizamos los casos con deleciones en el codón 558 con ILP al observado con el codón 559. De hecho, de 31 casos portadores de la mutación 19 progresan, en comparación de aquellos casos que no presentan la mutación, 82 casos de los cuales progresan 26 (Fig.163).

Parámetros	Nº	Eventos	%PA	%ILP	p
Del.558					0,004
No del.558	82	26	47	68	
Del.558	31	19	11	39	

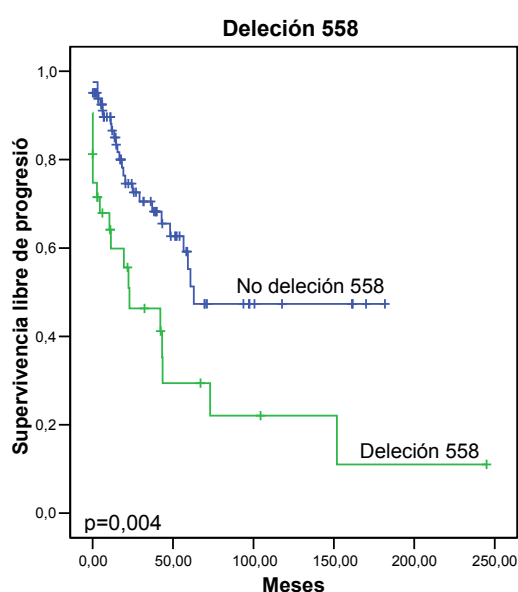


Figura 163: Gráfica de Kaplan-Meier en el que se representan los casos portadores de la delección del codón 558 respecto al ILP.

- **Delección 557**

Se observa asociación estadísticamente casi significativa entre la delección del codón 557 y el ILP. Se puede apreciar una acusada tendencia en el sentido en el que los casos con delección en el codón 557 presentan peor ILP (Fig.164).

Parámetros	Nº	Eventos	%PA	%ILP	p
Del.557					0,0621
No delección	86	29	44	66	
Del.557	28	17	14	39	

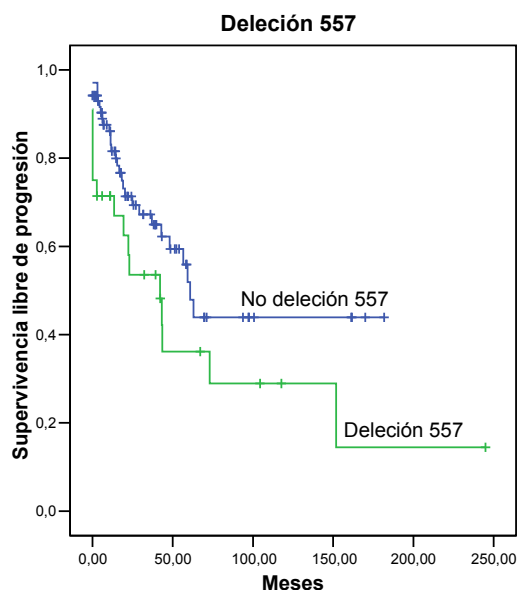


Figura 164: Gráfica de Kaplan-Meier en el que se representan los casos con delección del codón 557 en función del ILP.

- **557 ó 558 ó 559 afectados por mutación.**

Debido a que los codones 557, 558, 559 afectados por mutaciones presentan una evolución muy parecida, se analizó el comportamiento de éstos cuando se encuentran mutados en cualquiera de los tres codones. Como ocurre en los análisis individualizados, se observa que los casos con mutaciones en alguno de estos tres codones presentan un peor ILP respecto al resto de casos (Fig.165).

Parámetros	Nº	Eventos	%PA	%ILP	p
Mut.557ó558ó559					0,0240
No mutado	73	23	45	68	
Mutado	41	23	15	44	

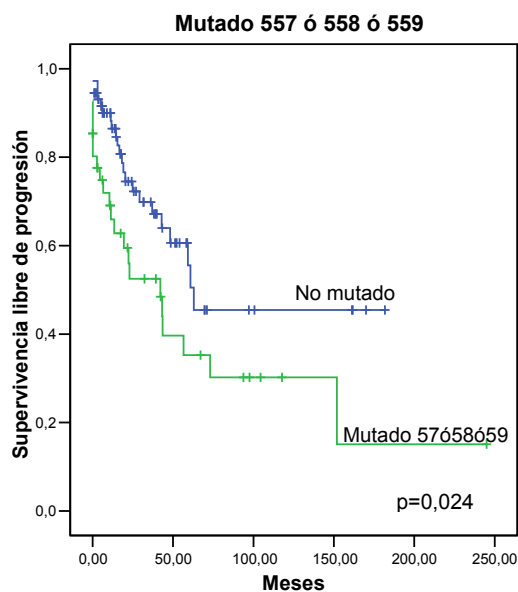


Figura 165: Gráfica de Kaplan-Meier en el que se representan los casos mutados en alguno de los codones 557,558 y 559 en función del ILP.

- **Delección 557 más mutación puntual del 558.**

Debido a que en la serie se presentan muchos casos en los que se encuentran implicados los codones 557-558 con una delección intersticial seguida de una mutación puntual se analizó si existía una significación en la progresión; observando que aquellos casos mutados presentan un ILP de 41% en comparación con los casos no mutados con un 67% (Fig.166).

Parámetros	Nº	Eventos	%PA	%ILP	p
Del.+Mut.557-558					0,0127
No del+mut	80	26	45	67	
Mutado	34	20	14	41	

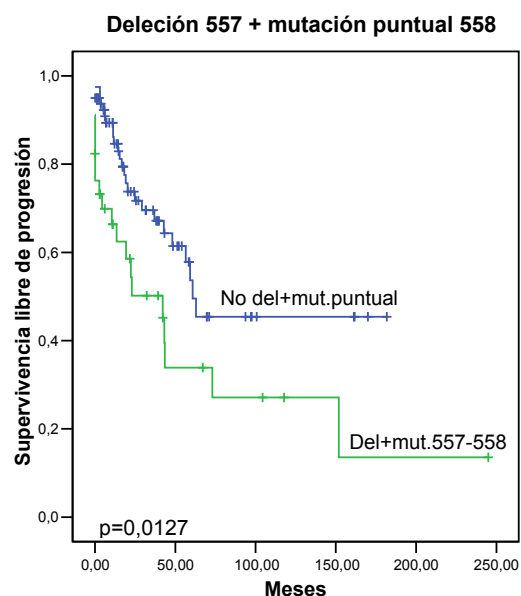


Figura 166: Gráfica de Kaplan-Meier en la que se representan los casos con delección más mutación puntual en los codones 557-558 y el intervalo libre de progresión que presentan respecto a los casos que no son portadores de dicha mutación.

- **Mutación exón 9**

Aquellos casos que presentan la duplicación de los codones 502-503 en el exón 9 excepto un caso todos progresan (86%).

Parámetros	Nº Eventos	%PA	%ILP	p
Duplicación 502-503				0,1168
No duplicación	107	40	67	63
Duplicación 502-503	7	6	1	14

- ***PDGFRα* gen**

Debido a que el número de casos mutados en el gen *PDGFRα* es bajo (5 casos) no se puede tener en cuenta la significación positiva en un 80% de ILP en aquellos casos con mutaciones en dicho gen versus el 58% del resto de casos de la serie.

Parámetros	Nº Eventos	%PA	%ILP	p
<i>PDGFRα</i> GEN				0,3926
No mutado	107	45	23	58
Mutado	5	1	80	80

4.10.2-ANÁLISIS MULTIVARIABLE DE SUPERVIVENCIA A LA PROGRESION EN LA SERIE GLOBAL

Se ha realizado el análisis estadístico multivariable para saber qué parámetros significativos en el análisis univariable se comportan como factores pronósticos independientes en la progresión tumoral de la serie global de los GIST. Por lo tanto el análisis multivariable se realiza con los parámetros reflejados en la tabla 42.

De los 111 casos a los que se les realiza el estudio de progresión; un total de 84 casos presentan todos los valores de los parámetros para poder realizar el análisis multivariable.

Tabla 42: Parámetros significativos en el ILP y utilizados en el análisis multivariable para la supervivencia libre de progresión.

Parámetros	ILP p
Tamaño	0,0181
Tamaño<5/>5	0,0017
Resección completa	0,0014
Mitosis	0,0002
Mitosis<5/>5	<0,0001
Necrosis	0,0002
Pleomorfismo	0,0224
Celularidad	0,0003
Grado Fletcher	<0,0001
Grado Miettinen	<0,0001
c-KIT	0,0027
AML	0,0237
KI-67	<0,0001
c-KIT GEN	0,0007
c-KIT exón	0,0159
c-KIT exones (0,11,9)	0,002
Mutaciones c-KIT	0,0007
Del.558	0,004
Del.559	0,0524
Mut 557-558-559	0,0369
Mut+del557-558	0,0217

Se ha obtenido que los parámetros que de manera individual presentan un valor pronóstico independiente en el tiempo de progresión han sido la clasificación de riesgo según los criterios de Fletcher, la histología fusocelular, Ki-67 y mutación en el gen *c-KIT* (Tabla 43).

Tabla 43: Parámetros significativos en el análisis multivariable para la supervivencia libre de progresión.

Parámetros	HR*	IC 95%	P
Clasificación Fletcher			
Muy bajo-bajo riesgo	1		0,001
Riesgo intermedio	29,41	3,93-250	0,001
Alto riesgo	3,83	1,13-12,98	0,031
Histología			
Epitelial	1		0,010
Fusocelular	23,80	2,19-250	0,006
Mixto	2,48	0,75-4,16	0,034
KI-67			
Negativo	5,78		0,019
<5mitosis	3,46	1,60-20,83	0,007
>5 mitosis	7,75	1,18-10,10	0,023
Mut. gen c-KIT			0,003
No mutado	1		
Mutado	4,97	1,7-14,49	

*Hazard ratio.

4.10.3-FUNCIONES DE SUPERVIVENCIA SEGÚN LA SUPERVIVENCIA GLOBAL

En la tabla 44 se recogen los principales hallazgos de los parámetros clínicos, anatomopatológicos y de biología molecular con la supervivencia global de toda la serie, de los casos tratados con glivec y de los casos no tratados con Glivec.

Tabla 44: Hallazgos obtenidos entre la supervivencia global y los parámetros de la serie.

Parámetros	SG p	SG tto. p	SG no tto. p
CLINICOS			
Sexo	0,2130	0,4090	0,4995
Edad	0,46	0,5264	0,2334
Resección completa	0,0002	0,0685	0,007
Tratamiento Glivec	0,0358	—	—
ANATOMOPATOLÓGICOS			
Tamaño	0,2086	0,7929	0,3163
Tamaño<5/>5	0,0742	0,5139	0,2695
Localización	<0,0001	0,6425	<0,0001
Localización (est,ID, otros)	0,9912	0,4452	0,0403
Localización extragastroint.	0,7190	0,2595	0,9409
Mitosis	0,0002	0,3862	0,0051
Mitosis<5/>5	0,0007	0,1156	0,0036
Necrosis	0,0134	0,2848	0,918
Pleomorfismo	0,0806	0,2719	0,0069
Celularidad	0,1050	0,8871	0,2147
Grado Fletcher	0,0004	0,3160	0,0043
Grado Miettinen	0,0237	0,0482	0,7280
MARCADORES HIQ			
c-KIT	0,1206	0,2217	0,1288
PDGFR α	0,0062	0,1589	0,1597
CD34	0,9851	0,4444	0,7741
AML	0,1339	0,0116	0,2799

Tabla 44 (Cont.): Hallazgos obtenidos entre la supervivencia global y los parámetros.

Parámetros	SG p	SG tto. p	SG no tto. p
KI-67	0,0679	0,7959	0,0465
MDM2	0,2734	0,7020	0,333
P53	0,7529	0,4312	0,7408
P53 agrupada	0,8414	0,3687	0,4812
S-100	0,083	0,2848	0,1155
BIOLOGIA MOLECULAR			
<i>c-KIT</i> GEN	0,6772	0,0163	0,7318
<i>c-KIT</i> exón	0,6409	0,0661	0,8730
<i>c-KIT</i> exones (0,11,9)	0,5146	0,0447	0,8367
Mutaciones <i>c-KIT</i>	0,5719	0,0757	0,8236
Mut.homocigosis	0,8431	–	0,5505
Del.557-558	0,1388	0,0149	0,6439
Del.557	0,2053	0,0506	0,4191
Del.558	0,8364	0,2012	0,8037
Del.559	0,5037	0,6086	0,2172
Mut 557-558-559	0,8552	0,1757	0,7332
Mut+del557-558	0,6488	0,2257	0,6367
Dupl.502-503	0,3064	0,8031	0,6251
<i>PDGFRα</i> gen	0,8213	0,0002	0,3509
<i>PDGFRα</i> exón	0,8213	0,0002	0,3509

A) FUNCIONES DE SUPERVIVENCIA EN LOS HALLAZGOS CLÍNICOS

En la tabla 45 se recogen los principales hallazgos de los parámetros clínicos y anatomopatológicos con la supervivencia global de toda la serie.

Tabla 45: Hallazgos obtenidos entre la supervivencia global y los parámetros clínico-histopatológicos.

Parámetros	Nº	Eventos	%SA	%SG	p
CLINICOS					
SEXO					
Masculino	66	23	34	65	0,2130
Femenino	45	11	53	76	
EDAD					
<35	6	1	50	83	0,46
35-50	21	8	39	62	
51-70	49	13	35	73	
>70	35	12	58	66	
Resección completa					
No	15	11	50	27	0,0002
Sí	95	23	12	76	
Tratamiento con Glivec					
No tratados	79	19	51	76	0,0358
Tratados	31	15	24	52	
ANATOMOPATOLÓGICOS					
TAMAÑO					
<2cm.	10	3	64	70	0,2086
<5cm.	21	3	56	86	
6-10cm.	44	14	26	68	
>10cm.	36	14	40	61	
TAMAÑO					
<5cm.	31	6	58	81	0,0742
>5cm.	80	28	34	65	

Tabla 45 (cont.): Hallazgos obtenidos entre la supervivencia global y los parámetros clínico-histopatológicos.

Parámetros	Nº	Eventos	%SA	%SG	p
LOCALIZACIÓN					<0,0001
Estómago	55	15	51	73	
Int.delgado	27	9	39	67	
Int.grueso	13	3	41	77	
Extragastróint.	15	6	39	60	
Otros	1	1	0	0	
LOCALIZACIÓN					0,9912
Estómago	55	16	36	73	
Int.delgado	27	13	52	67	
Otros	29	10	39	66	
EXTRAGASTROINTESTINAL					0,7190
No	96	28	44	71	
Sí	15	6	39	60	
MITOSIS					0,0002
<5	66	11	67	83	
6-10	20	13	0	35	
>10	22	9	39	59	
MITOSIS					0,0007
<5	66	11	67	83	
>5	42	22	21	48	
NECROSIS					0,0134
No	61	12	61	80	
Sí	47	20	29	57	
PLEOMORFISMO					0,0806
No	60	13	65	78	
Sí	48	19	28	60	
CELULARIDAD					0,1050
Epitelial	13	3	76	77	
Fusocelular	76	21	30	72	
Mixto	19	9	29	53	
RIESGO FLETCHER					0,0004
Muy Bajo-Bajo	33	4	84	88	
Medio	18	1	80	94	
Alto	58	29	21	50	
RIESGO MIETTINEN					0,0237
Muy Bajo	19	3	82	84	
Bajo	16	1	75	94	
Medio	19	3	69	84	
Alto	40	20	24	50	

- **Resección completa**

En aquellos tumores en los que no se puede realizar la resección completa del tumor la supervivencia global disminuye considerablemente (27%), por el contrario los tumores resecables presentan un porcentaje de supervivencia del 76% (Fig.167).

Parámetros	Nº	Eventos	%SA	%SG	p
Res. completa					0,0002
No	15	11	50	27	
Sí	95	23	12	76	

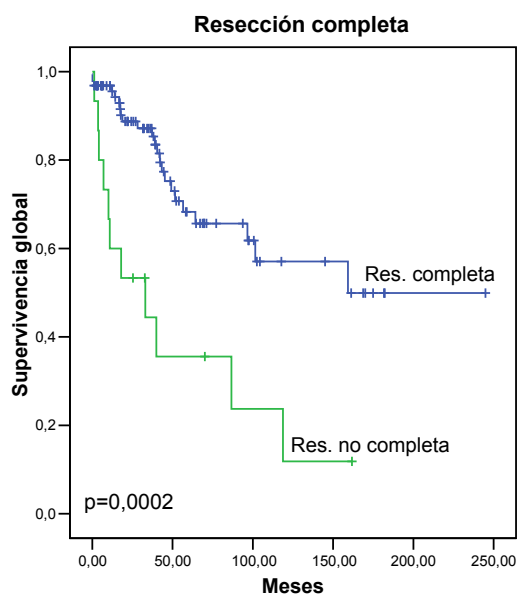


Figura 167: Gráfica de Kaplan-Meier en el que se representa la relación entre la resección completa y la SG.

- **Tratamiento con Glivec**

Anteriormente al analizar el ILP entre los casos tratados y no tratados había una gran diferencia de significación, debido a que el grupo de casos tratados con Glivec está compuesto en su gran mayoría por aquellos que recaen y metastatizan. Sin embargo, la diferencia en cuanto a la supervivencia no es tan acusada entre los tratados y no tratados, siendo menor la supervivencia global en los casos tratados (52%) (Fig.168).

Parámetros	Nº	Eventos	%SA	%SG	p
Tto. con GLIVEC					0,0358
No tratados	79	19	51	76	
Tratados	31	15	24	52	

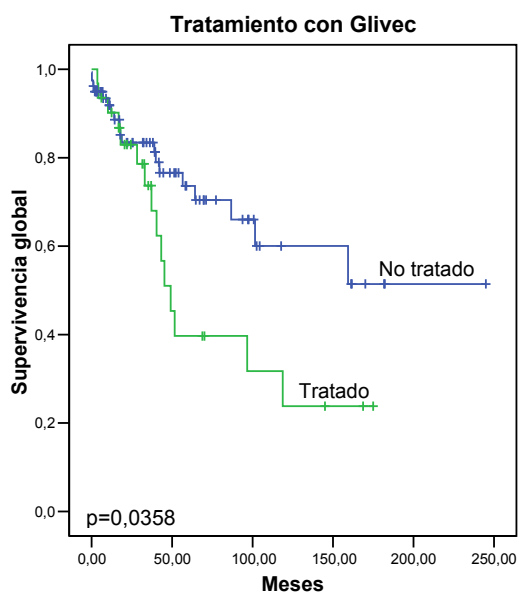


Figura 168: Gráfica de Kaplan-Meier en la que se representan los casos tratados con Glivec y la SG.

B) FUNCIONES DE SUPERVIVENCIA EN LOS HALLAZGOS ANATOMOPATOLÓGICOS

En la tabla 45 quedan reflejadas las significaciones obtenidas entre los parámetros anatomopatológicos y la supervivencia global. Destacando a continuación los hallazgos anatomopatológicos más significativos.

Parámetros macroscópicos

• Tamaño

Se observa una tendencia hacia la significación en los casos agrupados en un tamaño superior o inferior a los 5 cm.; donde aquellos tumores mayores de 5cm tienen un peor pronóstico.

Parámetros	Nº	Eventos	%SA	%SG	p
TAMAÑO					0,0742
<5cm.	31	6	58	81	
>5cm.	80	28	34	65	

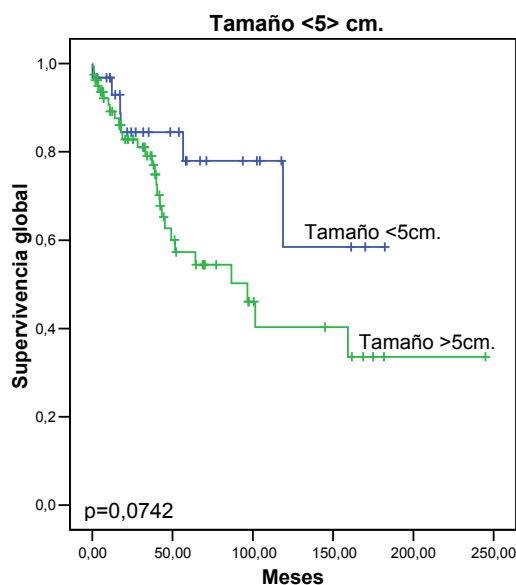


Figura 169: Gráfica de Kaplan-Meier en la que se representa los casos mayores o menores de 5cm respecto a la SG.

Parámetros microscópicos (Mitosis, Necrosis, Pleomorfismo)

• Mitosis

Al analizar la supervivencia global respecto al índice mitótico, destaca que aquellos casos con menos de 5 mitosis en 50 HPF muestran una elevada supervivencia global (83%). Por el contrario, la supervivencia global disminuye al 35% en los tumores con un índice mitótico entre 6-10 mitosis y 59% con una presencia de mitosis mayor a 10 (Fig.170).

Parámetros	Nº	Eventos	%SG	p
MITOSIS				0,0002
<5	66	11	67	83
6-10	20	13	0	35
>10	22	9	39	59
MITOSIS				0,0007
<5	66	11	67	83
>5	42	22	21	48

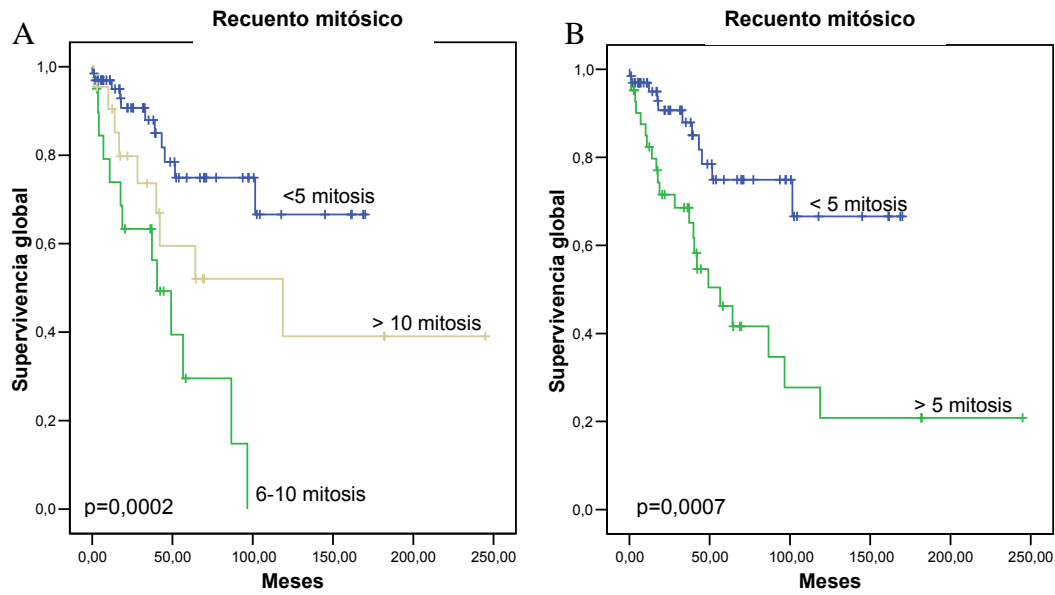


Figura 170: Gráficas de Kaplan-Meier, en las que se representa el número de mitosis respecto la SG. (A) Teniendo en cuenta 3 categorías. (B) Teniendo en cuenta dos. Se puede apreciar que los casos con menos de 5 mitosis tienen buena supervivencia en comparación con el resto.

- **Necrosis**

La supervivencia global es de un 80% en los casos que no presentan necrosis, mientras que aquellos casos con necrosis presentan una supervivencia acumulada del 29%. (Fig.171).

Parámetros	Nº	Eventos	%SA	%SG	p
NECROSIS					0,0134
No	61	12	61	80	
Sí	47	20	29	57	

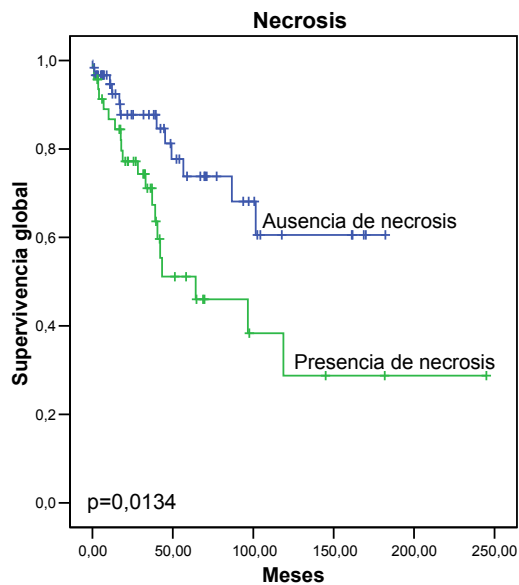


Figura 171: Gráfica de Kaplan-Meier que representan la necrosis en relación con la SG.

- **Pleomorfismo**

Cuando se analiza el pleomorfismo obtenemos un comportamiento parecido al de la necrosis aunque sin alcanzar la significación estadística. Sin embargo, en la figura se puede observar como aquellos casos que no presentan pleomorfismo muestran una supervivencia mayor (Fig.172).

Parámetros	Nº	Eventos	%SA	%SG	p
PLEOMORFISMO					0,0806
No	60	13	65	78	
Sí	48	19	28	60	

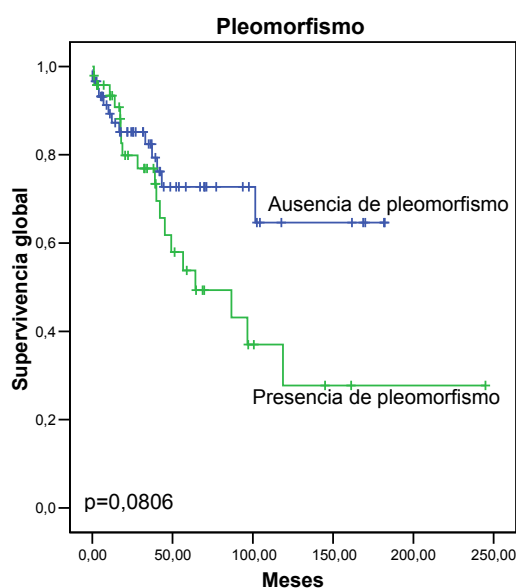


Figura 172: Gráfica de Kaplan-Meier en el que se representa el pleomorfismo en relación con la SG.

- **Riesgo histológico según los criterios de Fletcher**

Al estudiar el riesgo tumoral según la clasificación de Fletcher se puede observar en el figura 173 como manifiestan una mejor supervivencia aquellos tumores clasificados de muy bajo riesgo (75%), riesgo bajo (92%) y riesgo intermedio (94%). Por el contrario, el 52% de los pacientes con tumores clasificados de alto riesgo fallecen.

Parámetros	Nº	Eventos	%SA	%SG	p
RIESGO					0,0023
Muy bajo	8	2	70	75	
Bajo	26	2	89	92	
Medio	19	2	69	89	
Alto	58	28	22	52	

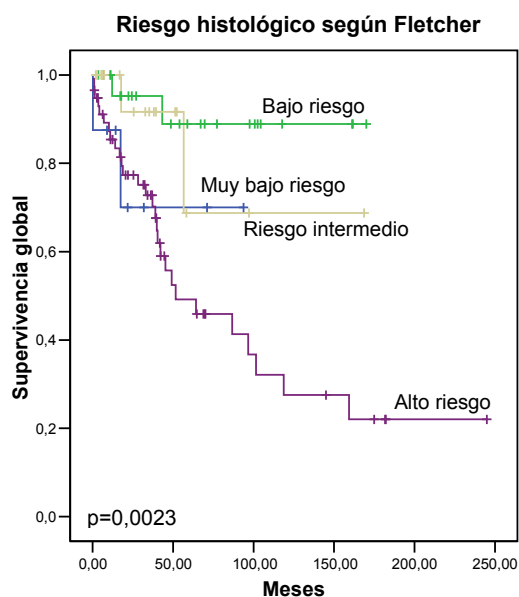


Figura 173: Gráfica de Kaplan-Meier en el que se representa el riesgo de nuestra serie tumoral respecto a la SG según el tratado de Fletcher.

- **Riesgo histológico según los criterios de Miettinen**

La supervivencia global de los casos según los criterios de Miettinen es muy similar a los resultados obtenidos en el riesgo de Fletcher. Menos del 50% de los casos clasificados de alto riesgo sobreviven, a diferencia de los casos de intermedio, bajo y muy bajo riesgo que presentan una supervivencia superior al 84% (Fig.174).

Parámetros	Nº	Eventos	%SA	%SG	p
RIESGO					0,0237
Muy bajo	19	3	82	84	
Bajo	16	1	75	94	
Medio	19	3	69	84	
Alto	40	20	24	50	

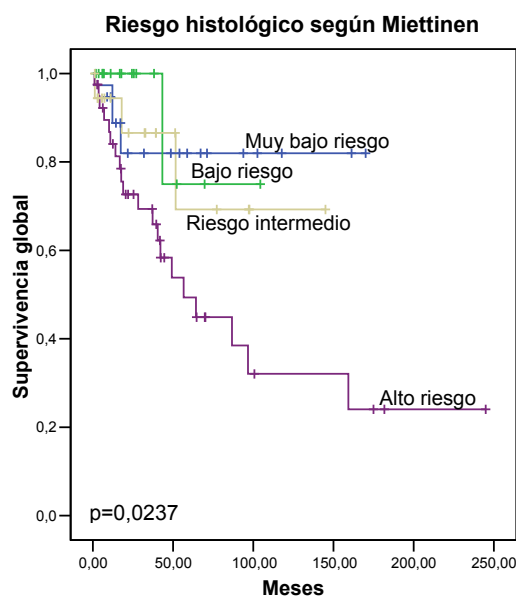


Figura 174: Gráfica de Kaplan-Meier en el que se representa el riesgo según la clasificación de Miettinen respecto a la SG.

C) FUNCIONES DE SUPERVIVENCIA EN LOS HALLAZGOS IHQ.

A continuación destacamos los principales resultados obtenidos entre los diferentes marcadores inmunohistoquímicos y la supervivencia global.

Tabla 46: Hallazgos obtenidos entre la supervivencia global y los marcadores IHQ.

Parámetros	Nº	Eventos	%SA	%SG	p
c-KIT					0,7332
0	7	2	64	71	
+	100	5	39	69	
PDGFRα					0,0062
0	19	4	62	79	
+	13	3	50	77	
++	12	5	0	58	
+++	12	4	44	67	
CD-34					0,8202
0	30	12	35	60	
+	72	19	59	74	
S-100					0,1379
0	62	15	64	76	
+	34	14	19	59	
KI-67					0,033
0	38	6	63	84	
<5%	33	11	42	67	
>5%	13	6	20	54	
KI-67					0,057
0	38	6	63	84	
+	46	17	35	63	
MDM2					0,7224
0	19	6	28	68	
+	25	6	32	76	
P53					0,8414
0	32	11	43	66	
positivo	29	9	39	69	

Tabla 46(cont.): Hallazgos obtenidos entre la supervivencia global y los marcadores IHQ.

Parámetros	Nº	Eventos	%SA	%SG	p
AML					0,2595
0	39	8	53	79	
+	57	21	38	63	
DESMINA					0,2935
0	75	21	42	72	
+	18	8	42	56	
VIMENTINA					0,0024
0	3	2	0	33	
+	64	16	33	75	
CROMOGRANINA					0,1975
0	49	16	43	67	
+	13	7	20	46	
SINAPTOFISINA					0,6491
0	49	15	48	69	
+	9	4	0	56	
PGP9.5					0,3008
0	3	0	0	100	
+	19	9	44	52	
CD99					0,2569
0	22	7	57	68	
+	31	11	27	65	

- **KI-67**

Al estudiar el marcador de proliferación celular respecto a la supervivencia global observamos que los casos negativos presentan mejor supervivencia que los que presentan hasta un 5% o más de un 5% de núcleos teñidos (Fig.175).

Parámetros	Nº	Eventos	%SA	%SG	p
KI-67					0,033
0	38	6	63	84	
<5%	33	11	42	67	
>5%	13	6	20	54	

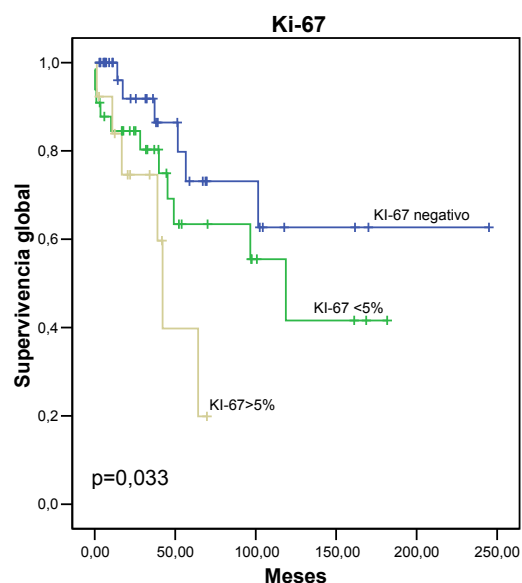


Figura 175: Gráfica de Kaplan-Meier en el que se representa el marcador Ki-67 respecto a la SG.

D) FUNCIONES DE SUPERVIVENCIA EN LOS HALLAZGOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

A continuación destacamos los principales resultados obtenidos entre los diferentes parámetros de biología molecular y la supervivencia global.

Tabla 47: Hallazgos obtenidos entre la supervivencia global y los parámetros de biología molecular.

Parámetros	Nº	Eventos	%SA	%SG	p
c-KIT GEN					0,6772
No mutado	43	13	52	70	
Mutado	66	20	36	70	
c-KIT EXÓN					0,6409
No mutado	43	13	52	70	
Exón 11	57	16	42	72	
Exón 9,	7	4	0	43	
Exón 13	1	0		100	
Exón 17	1	0		100	
c-KIT MUTACION					0,5719
No mutado	43	13	52	70	
Delección	33	11	41	67	
Duplicación	12	5	0	58	
Mut.puntual	14	1	93	93	
Del+Mut.punt.	7	3	42	57	
Mut.HOMOCIGOSIS					0,8431
No mutado	107	32	41	70	
Homocigosis	4	2	38	50	
Del.557-558					0,1388
No del.557-558	88	28	34	68	
Del.557-558	21	5	63	76	
Del.559					0,5037
No del.559	88	25	41	72	
Del.559	21	8	46	62	
Del.558					0,8864
No del.558	79	22	39	72	
Del.558	30	11	45	63	
Del.557					0,2053
No del.557	83	26	34	69	
Del.557	26	7	59	73	
Mut.557ó558ó559					0,8582
No mutado	70	20	38	71	
Mutado	39	13	49	67	
Del.+Mut.557-558					0,6488
No del+mut	77	23	36	70	
Mutado	32	10	53	69	
Duplicación 502-503					0,3064
No dupl.502-503	102	29	48	72	
Mutado	7	4	0	43	
PDGFRα GEN					0,8213
No mutado	103	31	37	70	
Mutado	4	1	75	75	

- **Exones mutados del gen *c-KIT*.**

No existen diferencias en cuanto a la supervivencia global según el exón afectado, aunque el exón nueve presenta el intervalo de supervivencia menor de todo el grupo con un 43%; el resto de exones se encuentran en supervivencias superiores al 70%.

- ***c-KIT* mutación**

Tampoco se observan diferencias de la supervivencia según el tipo de mutación presente en los tumores, cabe destacar el hecho de que prácticamente todos los grupos muestran el mismo porcentaje de supervivencia por debajo del 70%; a diferencia de las mutaciones puntuales que presentan un 93%.

4.10.4-ANÁLISIS MULTIVARIABLE DE SUPERVIVENCIA EN LA SERIE GLOBAL

A continuación se realiza el análisis de la regresión de Cox a aquellos parámetros que han sido significativos en el análisis univariable en la serie global (Tabla 48); para averiguar cual de ellos por si solo es un parámetro de supervivencia. Obteniendo de los 111 casos analizados, el índice mitótico superior a 5 mitosis en 50 HPF y la resección no completa del tumor como factores adversos en el análisis multivariable en la supervivencia global.

Tabla 48: Parámetros significativos en el análisis univariable y empleados en el multivariable.

Parámetros	SG p	SG no tto. p	SG tto. p
Resección completa	0,0002	0,007	0,0685
Tratamiento Glivec	0,0358	—	—
Localización		<0,0001	—
Localización (est,ID, otros)		0,0403	
Mitosis	0,0002	0,0051	
Mitosis<5/>5	0,0007	0,0036	
Necrosis	0,0134		
Pleomorfismo		0,0069	
Grado Fletcher	0,0004	0,0043	
Grado Miettinen	0,0237		0,0482
PDGFR α	0,0062		
AML			0,0116
KI-67	0,0679	0,0465	
<i>c-KIT</i> GEN			0,0163
<i>c-KIT</i> exón			0,0661
<i>c-KIT</i> exones (0,11,9)			0,0447
Mutaciones <i>c-KIT</i>			0,0757
Del.557-558			0,0149
Del.557			0,0506

Tabla 49: Parámetros significativos para el análisis multivariable.

Parámetros	HR*	IC 95%	P
Mitosis			
<5	1		0,001
6-10	2,12	0,91-5,37	0,078
>10	0,44	0,186-1,07	0,072
Resección completa			0,003
Sí	1		
No	3,58	1,46-6,36	

*Hazard ratio.

4.10.5.-SUPERVIVENCIA DE LOS CASOS NO TRATADOS

Debido a que al realizar el análisis multivariable observamos diferencias significativas entre los casos tratados con Glivec versus los no tratados realizamos la supervivencia global de ambos grupos y comentamos los hallazgos más significativos.

A) FUNCIONES DE SUPERVIVENCIA EN LOS HALLAZGOS CLINICOS.

A continuación se destacan los principales hallazgos clínicos con la supervivencia global (Tabla 50).

Tabla 50: Hallazgos obtenidos entre la supervivencia global y los parámetros clínicos y anatomopatológicos en los casos no tratados con Glivec.

Parámetros	Nº	Eventos	%SA	%SG	p
CLINICOS					
SEXO					0,4995
Masculino	45	12	51	73	
Femenino	35	7	53	80	
EDAD					0,2334
<35	3	0	0	100	
35-50	9	3	55	67	
51-70	37	6	33	84	
>70	30	10	61	67	
EDAD					0,0461
<70	49	9	50	82	
>70	30	10	61	67	
Res. no completa					0,0070
No	71	14	56	80	
Sí	7	5	19	27	
ANATOMOPATOLÓGICOS					
TAMAÑO					0,3163
<2cm.	10	3	64	70	
<5cm.	17	2	82	88	
6-10cm.	30	6	30	80	
>10cm.	22	8	36	64	
TAMAÑO					0,2695
<5cm.	27	5	75	82	
>5cm.	52	14	36	73,	

Tabla 50 (Cont.): Hallazgos obtenidos entre la supervivencia global y los parámetros clínicos y anatomopatológicos.

Parámetros	Nº	Eventos	%SA	%SG	p
LOCALIZACIÓN					<0,0001
Estómago	41	7	74	83	
Int.delgado	17	5	33	71	
Int.grueso	12	3	40	75	
Extragastroint.	8	3	44	62	
Otros	1	1	0	0	
LOCALIZACIÓN					0,6403
Estómago	41	7	42	84	
Int.delgado	17	5	74	71	
Otros	21	7	33	67	
EXTRAGASTROINTESTINAL					0,9409
No	71	16	52	77	
Sí	8	3	44	62	
MITOSIS					0,0017
<5	52	6	74	88	
6-10	12	7	0	42	
>10	14	5	54	64	
MITOSIS					0,0036
<5	52	6	74	88	
>5	26	12	34	54	
NECROSIS					0,0918
No	52	9	64	83	
Sí	26	9	51	65	
PLEOMORFISMO					0,0069
No	43	5	78	88	
Sí	35	13	38	63	
CELULARIDAD					0,2147
Epitelial	11	2	82	82	
Fusocelular	58	13	37	78	
Mixto	10	4	55	60	
RIESGO SEGÚN FLETCHER					0,0043
Muy Bajo-Bajo	30	3	88	90	
Medio	14	1	75	93	
Alto	33	15	26	55	
RIESGO SEGÚN MIETTINEN					0,0482
Muy bajo	19	3	82	84	
Bajo	11	0	0	100	
Medio	15	1	93	93	
Alto	24	11	27	54	

- **Edad**

En los casos con edades superiores a los 70 años muestran una supervivencia global del 67% sin embargo aquellos pacientes con una edad inferior a los 70 presentan un 82% (Fig.176).

Parámetros	Nº	Eventos	%SA	%SG	p
EDAD					0,0461
<70	49	9	50	82	
>70	30	10	61	67	

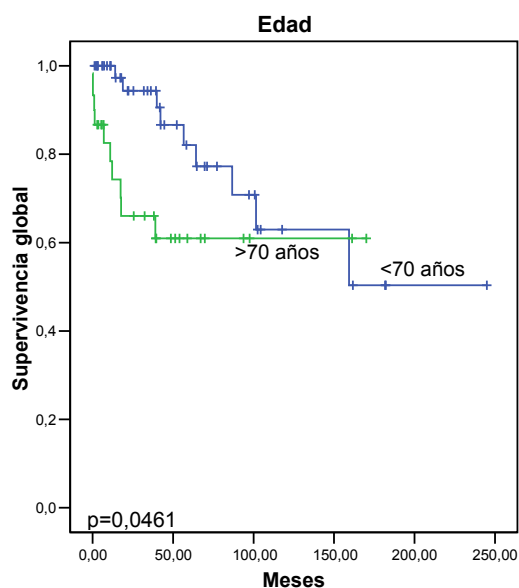


Figura 176: Gráfica de Kaplan-Meier en el que se representan los grupos de edad en función de los 70 años y su relación con la SG.

- **Resección completa**

Hay una diferencia muy significativa en términos de SG entre los casos en los que se ha podido realizar la resección completa del tumor con una SG del 80%, y aquellos casos en los que no se ha podido realizar una resección óptima que tienen una supervivencia del 27% (Fig.177).

Parámetros	Nº	Eventos	%SA	%SG no tto.	p
Res. Completa					0,0070
Sí	71	14	56	80	
No	7	5	19	27	

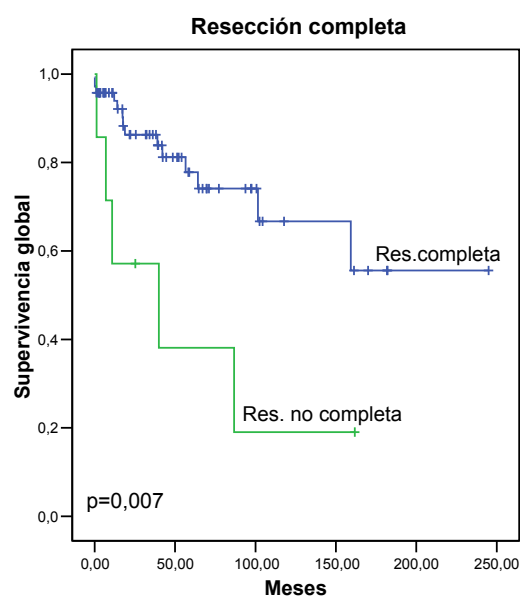


Figura 177: Gráfica de Kaplan-Meier en función del tipo de resección y la SG de los casos no tratados con Glivec.

B) FUNCIONES DE SUPERVIVENCIA EN LOS HALLAZGOS ANATOMOPATOLÓGICOS DE LOS CASOS NO TRATADOS.

A continuación se destacan los principales hallazgos anatomopatológicos con la supervivencia global de los casos no tratados con Glivec; todas las significaciones quedan reflejadas en la tabla 50.

Parámetros microscópicos

- **Mitosis**

El análisis de supervivencia con el número de mitosis muestra que los casos con menos de 5 mitosis presentan una mejor supervivencia en comparación con los casos de más de 5 mitosis por 50 HPF (Fig.178).

Parámetros	N°	Eventos	%SA	%SG no tto.	p
MITOSIS					0,0017
<5	52	6	74	88	
6-10	12	7	0	42	
>10	14	5	54	64	
MITOSIS					0,0036
<5	52	6	74	88	
>5	26	12	34	54	

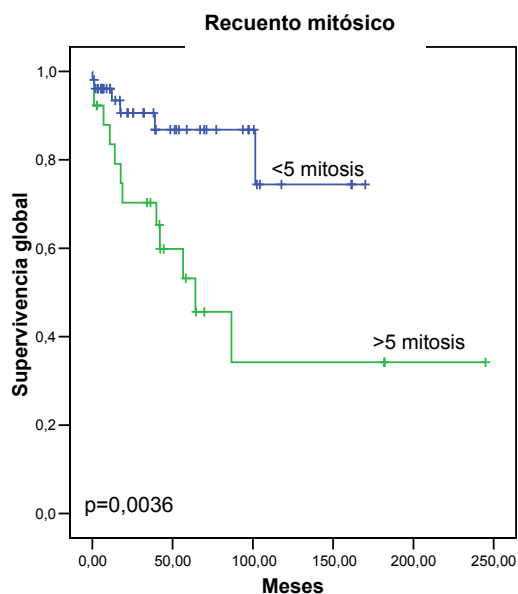


Figura 178: Gráfico de Kaplan-Meier en el que se representa el número de mitosis respecto a la SG.

- **Pleomorfismo**

En cuanto al pleomorfismo, aquellos tumores que presentan este parámetro histológico muestran una peor SG (63% frente al 88% de los casos con pleomorfismo) (Fig.179).

Parámetros	Nº	Eventos	%SA	%SG no tto.	p
PLEOMORFISMO					0,0069
No	43	5	78	88	
Sí	35	13	38	63	

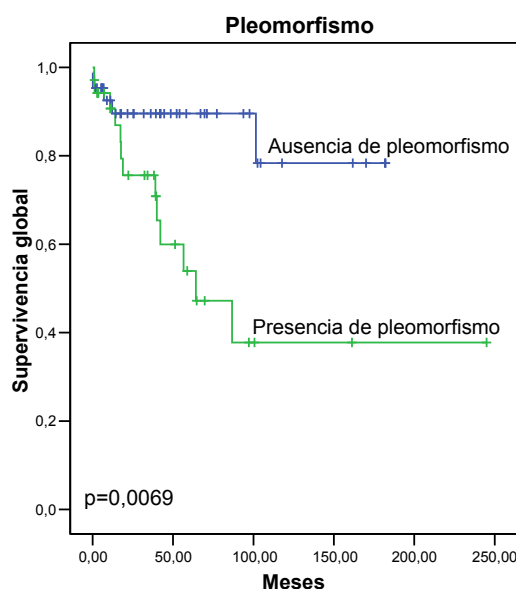


Figura 179: Gráfica de Kaplan-Meier en el que se representa el pleomorfismo de los casos no tratados con Glivec en relación con la SG.

- **Grupos de riesgo según los criterios de Fletcher.**

Cuando se estudia el riesgo tumoral en función de la SG, se observa como los casos de bajo y riesgo intermedio manifiestan un porcentaje de supervivencia mayor del 90%. Sin embargo, aquellos casos clasificados de alto riesgo fallecen el 45% (Fig.180).

Parámetros	Nº	Eventos	%SA	%SG no tto.	p
RIESGO					0,0043
Bajo	30	3	88	90	
Medio	14	1	75	93	
Alto	33	15	26	55	

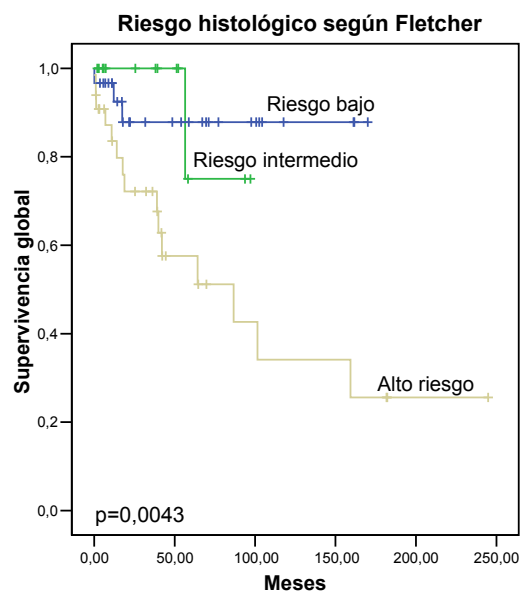


Figura 180: Gráfica de Kaplan-Meier en el que se representan los grupos de riesgo según los criterios de Fletcher con la SG.

- **Grupo de riesgo según los criterios de Miettinen.**

El grupo de riesgo según la clasificación de Miettinen presenta resultados muy similares a los obtenidos en el grupo de riesgo de Fletcher en los pacientes no tratados con glivec. Un 46% de los casos clasificados de alto riesgo fallecen, mientras que más del 80% de los casos clasificados en los otros tres grupos de riesgo sobreviven (Fig.181).

Parámetros	N°	Eventos	%SA	%SG no tto.	p
RIESGO					0,0482
Muy bajo	19	3	82	84	
Bajo	11	0	0	100	
Medio	15	1	93	93	
Alto	24	11	27	54	

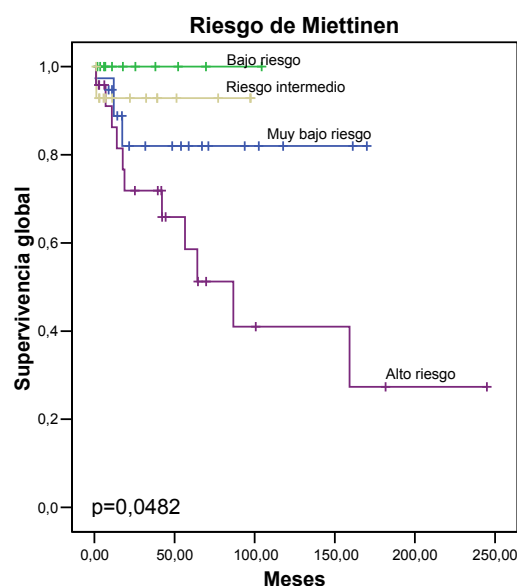


Figura 181: Representación del riesgo de nuestra serie tumoral respecto a la SG según el tratado de Fletcher en los casos no tratados con glivec.

C) FUNCIONES DE SUPERVIVENCIA EN LOS HALLAZGOS IHQ DE LOS CASOS NO TRATADOS CON GLIVEC.

A continuación comentaremos los hallazgos significativos entre los marcadores IHQ y la supervivencia global en los casos no tratados con Glivec. Sin embargo, excepto el marcador Ki-67, no hay más marcadores significativos en la supervivencia global de los casos no tratados con glivec por lo que se resumen en la tabla 51 siguiente.

Tabla 51: Hallazgos obtenidos entre la supervivencia global y los marcadores IHQ.

Parámetros	Nº	Eventos	%SA	%SG no tto.	p
c-KIT					
0	4	0	-	100	0,2505
+	73	18	50	75	
PDGFRα					
0	16	2	78	87	0,0991
+	26	8	33	69	
CD34					
0	21	7	45	67	0,4493
+	53	10	72	81	
S-100					
0	48	9	72	81	0,1440
+	24	8	32	67	
MDM-2					
0	13	2	61	85	0,6362
+	15	1	87	93	

Tabla 51 (Cont.): Hallazgos obtenidos entre la supervivencia global y los marcadores IHQ.

Parámetros	Nº	Eventos	%SA	%SG no tto.	P
KI-67					0,0228
0	33	4	70	88	
<5%	20	4	76	80	
>5%	9	5	20	44	
p53 agrupada					0,4812
0	26	8	48	69	
+	17	3	78	82	
AML					0,4551
0	29	5	68	83	
+	42	12	53	71	

- **KI-67**

Existe una diferencia entre los casos negativos o con muy poca actividad para el marcador Ki-67 y los casos con un índice proliferativo superior al 5% de positividad. Mientras que los dos primeros grupos superan el 80% de supervivencia, el tercer grupo muestra una SG del 44% (Fig.182).

Parámetros	Nº	Eventos	%SA	%SG	p
KI-67					0,0228
0	33	4	70	88	
<5%	20	4	76	80	
>5%	9	5	20	44	

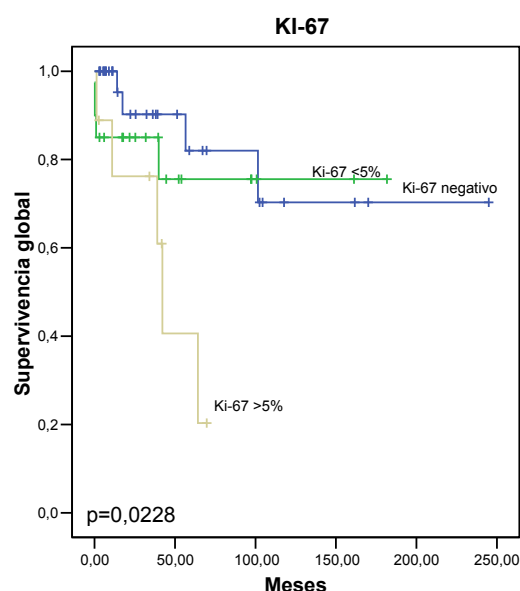


Figura 182: Gráfica de Kaplan-Meier en el que se representa el marcador Ki-67 respecto a la SG.

D) FUNCIONES DE SUPERVIVENCIA EN LOS HALLAZGOS DE BIOLOGIA MOLECULAR EN LOS CASOS NO TRATADOS CON GLIVEC.

Al analizar la significación de la supervivencia global respecto a los parámetros de biología molecular; observamos que no existen diferencias de supervivencia entre los casos mutados y los no mutados, como tampoco existen diferencias en el resto de parámetros estudiados como son el exón implicado, el tipo de mutación, los casos homocigotos o el tipo de mutación estudiada. Seguidamente se resumen en la tabla 52:

Tabla 52: Significación obtenida entre la supervivencia global y los parámetros de biología molecular.

Parámetros	Nº	Eventos	%SA	%SG	p
c-KIT GEN					0,7318
No mutado	37	9	59	76	
Mutado	40	9	42	77,50	
c-KIT EXÓN					0,8730
No mutado	37	9	59	76	
Exón 11	38	8	60	79	
Exón 9	1	1	0	0	
+ de 1ªmut	1	0	-	100	
c-KIT MUTACION					0,8236
No mutado	37	9	59	76	
Delección	21	6	43	71	
Duplicación	5	1	0	80	
Mut.puntual	10	1	90	90	
Del+Mut.punt.	4	1	67	75	
Mut.HOMOCIGOSIS					0,5505
No mutado	75	17	51	77	
Homocigosis	4	2	38	50	
Del.557-558					0,6439
No mutado	64	15	51	77	
Del.557-558	13	3	62	77	
Del.559					0,2172
No mutado	64	15	54	80	
Del.559	13	3	46	62	
Del.558					0,8037
No mutado	59	13	53	78	
Del.558	18	5	52	72	
Del.557					0,4191
No mutado	62	15	49	76	
Del.557	15	3	68	80	
Mut.55765586559					0,7332
No mutado	53	11	53	79	
Mut.57658659	24	7	53	71	
Del.+mut.557-558					0,6367
No mutado	58	14	50	76	
Del+mut.57-58	19	4	66	79	
Duplicación 502-503					0,6251
No mutado	76	17	60	78	
Mutado	1	1	0	0	
PDGFRα GEN					0,3509
No mutado	73	12	43	77	
Mutado	2	0	-	100	

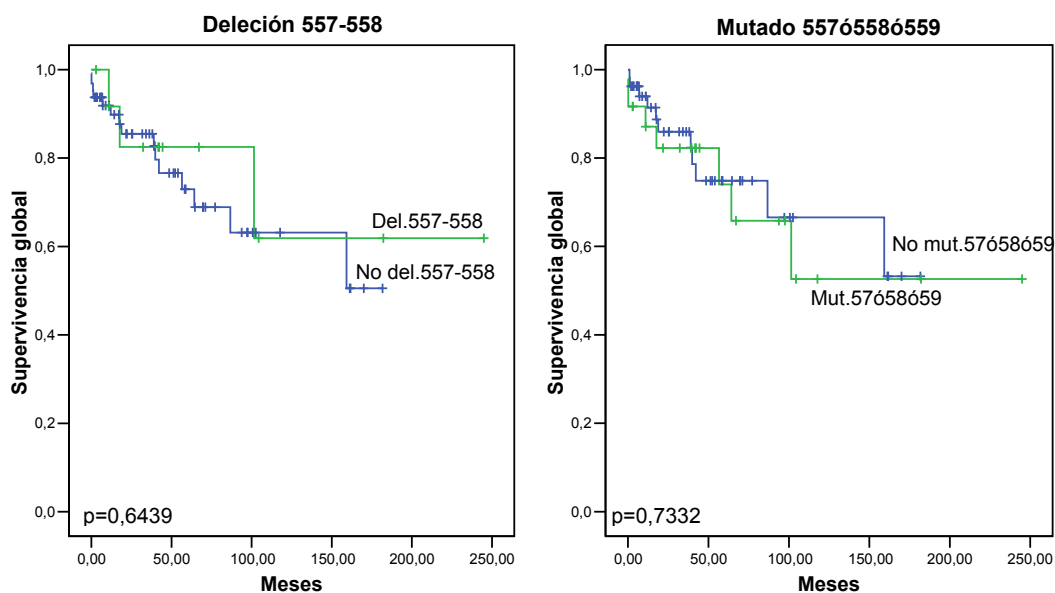


Figura 183: Gráficos de Kaplan-Meier en el que se representan la presencia de alteraciones genéticas en los codones 557-558 de *c-KIT* (A) y la presencia de mutaciones en alguno de los codones 557, 558 ó 559 con la SG.

4.10.6-ANÁLISIS MULTIVARIABLE EN LOS CASOS NO TRATADOS CON GLIVEC.

Al realizar el análisis multivariable a los casos no tratados con Glivec observamos como los dos parámetros que por si solos presentan un factor adverso son las resecciones no completas del tumor y la presencia de más de 5 mitosis (Tabla 53 y 54).

Tabla 53: Parámetros significativos en el análisis univariable y empleados en el multivariable en el grupo de pacientes no tratados con Glivec.

Parámetros	SG no tto p
Resección completa	0,007
Localización	<0,0001
Localización (est,ID, otros)	0,0403
Mitosis	0,0051
Mitosis<5/>5	0,0036
Pleomorfismo	0,0069
Grado Fletcher	0,0043
KI-67	0,0465

Tabla 54: Parámetros significativos en el análisis multivariable en el grupo de pacientes no tratados con Glivec.

Parámetros	HR*	IC 95%	P
Mitosis			0,014
<5	1		
>5	4,1	1,33-12,5	
Resección completa			0,063
Sí	1		
No	3,48	0,93-12,98	

4.10.7-SUPERVIVENCIA DE LOS CASOS TRATADOS CON GLIVEC

Como se ha comentado anteriormente realizamos el análisis de supervivencia global en los casos no tratados y tratados con Glivec por separado. Por lo que a continuación se destacaran los principales hallazgos de los casos tratados con Glivec con la SG

A) FUNCIONES DE SUPERVIVENCIA EN LOS HALLAZGOS CLÍNICOS

A continuación se destacan los principales hallazgos clínicos con la supervivencia global (Tabla 55).

Tabla 55 Significaciones entre la supervivencia global y los parámetros clínicos y anatomopatológicos de los casos tratados con Glivec.

Parámetros	Nº	Eventos	%SA	%SG	p
CLÍNICOS					
SEXO					0,4090
Masculino	21	11	12	48	
Femenino	10	4	45	60	
EDAD					0,5264
<35	3	1	50	67	
35-50	11	5	20	55	
51-70	12	7	27	42	
>70	5	2	0	60	
Res. no completa					0,0685
No	23	9	30	61	
Sí	8	6	0	25	
ANATOMOPATOLÓGICOS					
TAMAÑO					0,7924
<2cm.	0	0	-	0	
<5cm.	3	1	0	67	
6-10cm.	14	8	16	43	
>10cm.	14	6	42	57	
TAMAÑO					0,5139
<5cm.	3	1	0	67	
>5cm.	28	14	27	50	

Tabla 55(Cont.): Significaciones entre la supervivencia global y los parámetros clínicos y anatomopatológicos de los casos tratados con glivec.

Parámetros	Nº	Eventos	%SA	%SG	p
LOCALIZACIÓN					0,6425
Estómago	14	8	12	43	
Int.delgado	9	4	43	56	
Int.grueso	1	0	-	100	
Extragastroint.	7	3	31	57	
Otros	0	0	0	0	
LOCALIZACIÓN					0,4452
Estómago	14	8	12	43	
Int.delgado	9	4	43	56	
Otros	8	3	31	62	
EXTRABDOMINAL					0,2595
No	24	12	21	50	
Sí	7	3	31	57	
MITOSIS					0,22
<5	14	5	40	64	
6-10	8	6	0	25	
>10	8	4	0	50	
MITOSIS					0,1156
<5	14	5	40	64	
>5	16	10	0	38	
NECROSIS					0,2848
No	9	3	43	67	
Sí	20	11	12	45	
PLEOMORFISMO					0,2719
No	16	8	26	50	
Sí	13	6	17	54	
CELULARIDAD					0,8871
Epitelial	2	1	50	50	
Fusocelular	18	8	18	56	
Mixto	9	5	0	44	
RIESGO DE FLETCHER					0,3160
Muy Bajo-Bajo	2	1	0	50	
Medio	4	0	-	100	
Alto	25	14	19	44	
RIESGO DE MIETTINEN					0,7280
Muy Bajo	-	-	-	-	
Bajo	4	1	0	75	
Medio	4	0	37	50	
Alto	16	14	16	44	

- **Edad**

No hemos encontrado diferencias significativas en cuanto a la SG según los grupos de edad. Sin embargo, el menor rango de supervivencia se encuentra entre los casos de 51-70 (41,67%).

- **Resección completa**

Los casos tratados con glivec con una resección completa del tumor presentan una supervivencia global de un 61%; sin embargo, aquellos casos tratados con Glivec pero con una resección incompleta del tumor presentan una supervivencia del 25% (Fig.184).

Parámetros	Nº	Eventos	%SA	%SGtto.	p
Res. completa					0,0685
Sí	23	9	30	61	
No	8	6	0	25	

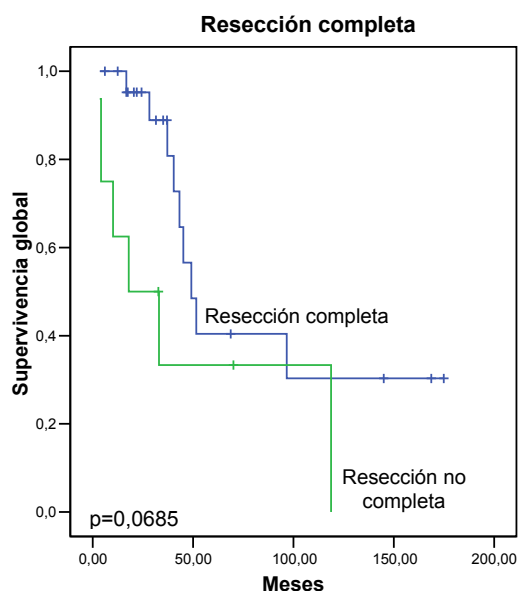


Figura 184: Gráfica de Kaplan-Meier en el que se representan la resección completa y la SG de los casos tratados.

B) FUNCIONES DE SUPERVIVENCIA EN LOS HALLAZGOS ANATOMOPATOLÓGICOS DE LOS CASOS TRATADOS CON GLIVEC.

A continuación se destacan los principales hallazgos anatomopatológicos con la supervivencia global. Las significaciones de todos los parámetros quedan reflejadas en la tabla 54.

Parámetros microscópicos

- **Mitosis**

Al analizar las mitosis en los cuatro grupos se destaca como los casos con más de 5 mitosis tienen un 25% de supervivencia; pero se observa una mayor tendencia aunque no sea significativa cuando se diferencia el grupo de mitosis en menor de 5 mitosis y superior de 5 mitosis.

Parámetros	Nº	Eventos	%SG tto.	p
MITOSIS				0,22
<5	14	5	40	64
6-10	8	6	0	25
>10	8	4	0	50
MITOSIS				0,1156
<5	14	5	40	64
>5	16	10	0	38

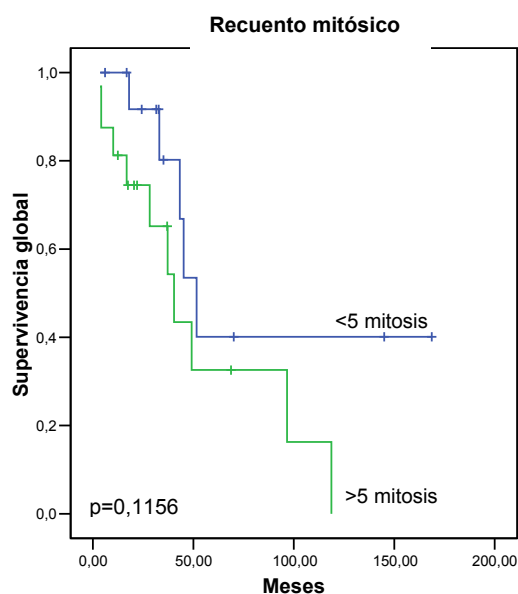


Figura 185: Gráfico de Kaplan-Meier en el que se representan el número de mitosis respecto a la SG.

C) FUNCIONES DE SUPERVIVENCIA EN LOS HALLAZGOS INMUNOHISTOQUÍMICOS DE LOS CASOS TRATADOS CON GLIVEC.

A continuación destacamos las significaciones de la supervivencia global en los casos tratados con Glivec respecto a los marcadores inmunohistoquímicos (Tabla 56). No obteniendo ningún marcador significativo para los casos tratados, excepto la actina de músculo liso.

Tabla 56: Significaciones entre la supervivencia global y los marcadores inmunohistoquímicos de los casos tratados con Glivec.

Parámetros	Nº	Eventos	%SA	SG tto.	p
c-KIT					0,6334
0	3	2	0	33	
+	26	13	12	50	
PDGFRα					0,8251
0	3	2	0	33	
+	11	4	27	64	
CD34					0,2271
0	9	5	19	44	
+	19	9	22	53	

Tabla 56 (Cont.): Significaciones entre la supervivencia global y los marcadores IHQ de los casos tratados con Glivec.

Parámetros	Nº	Eventos	%SA	SG tto.	p
S-100					0,3095
0	14	6	19	57	
+	10	6	0	40	
MDM-2					0,7627
0	6	4	0	33	
+	10	5	0	50	
p53 agrupada					0,3687
0	6	3	25	50	
+	12	6	0	50	
Ki-67					0,7959
0	5	2	33	60	
+	13	7	17	46	
++	4	1	67	75	
AML					0,016
0	10	3	0	70	
+	6	3	28	50	
++	8	5	0	37	
+++	1	1	0	0	

- **AML**

En la actina del músculo liso se observa como ha medida que aumenta la expresión del marcador disminuye considerablemente la supervivencia de los casos.

Parámetros	Nº	Eventos	%SG	p
AML				0,016
0	10	3	70	
+	6	3	50	
++	8	5	37	
+++	1	1	0	

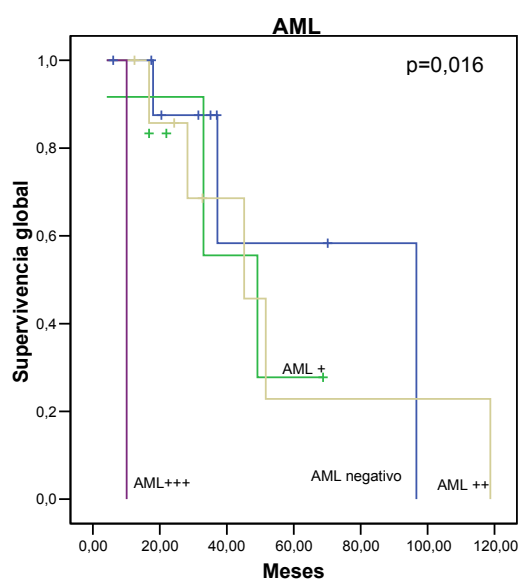


Figura 186: Gráfica de Kaplan-Meier que representa el marcador AML respecto a la SG en los casos tratados con Glivec.

D) FUNCIONES DE SUPERVIVENCIA EN LOS HALLAZGOS BIOLOGIA MOLECULAR EN LOS CASOS TRATADOS CON GLIVEC.

A continuación destacamos las significaciones de la supervivencia global en los casos tratados con Glivec respecto a los hallazgos de biología molecular (Tabla 57).

Tabla 57: Significaciones entre la supervivencia global y los hallazgos moleculares los casos tratados con glivec.

Parámetros	Nº	Eventos	%SA	%SG	tto. p
c-KIT GEN					0,0163
No mutado	5	4	0	20	
Mutado	26	11	28	58	
c-KIT EXÓN					0,0661
No mutado	5	4	0	20	
Exón 11	19	8	25	58	
Exón 9	6	3	27	50	
Exón 17	0	0	-	0	
+ de 1ªmut.	1	0	0	100	
c-KIT EXÓN					0,0447
No mutado	5	4	0	20	
Exón 11	20	8	32	60	
Exón 9,13,17	6	3	27	50	
c-KIT MUTACION					0,0757
No mutado	5	4	0	20	
Delección	12	5	42	58	
Duplicación	7	4	21	43	
Mut.puntual	4	0	-	100	
Del+Mut.punt.	3	2	0	33	
Del.557-558					0,0149
No mutado	23	13	0	44	
Del.557-558	8	2	64	75	
Del.559					0,6086
No mutado	23	12	19	48	
Del.559	8	3	42	62	
Del.558					0,2912
No mutado	19	9	0	53	
Del.558	12	6	38	50	
Del.557					0,0506
No mutado	20	11	0	45	
Del.557	11	4	49	64	
Mut.557ó558ó559					0,1757
No mutado	16	9	0	44	
Mut.57ó58ó59	15	6	40	60	
Del.+mut.557-558					0,2257
No mutado	18	9	0	50	
Del+mut.57-58	13	6	40	54	
Duplicación 502-503					0,8031
No mutado	25	12	26	52	
Mutado	6	3	27	50	
PDGFRα GEN					0,0002
No mutado	30	14	25	53	
Mutado	1	1	0	0	

- **Presencia de mutaciones en *c-KIT*.**

Aquellos casos que no se encuentran mutados en *c-KIT* muestran una menor supervivencia (20%). Por el contrario, aquellos casos mutados presentan una mayor supervivencia (58%) (Fig.187).

Parámetros	Nº	Eventos	%SA	%SG tto.	p
<i>c-KIT</i> GEN					0,0163
No mutado	5	4	0	20	
Mutado	26	11	28	58	

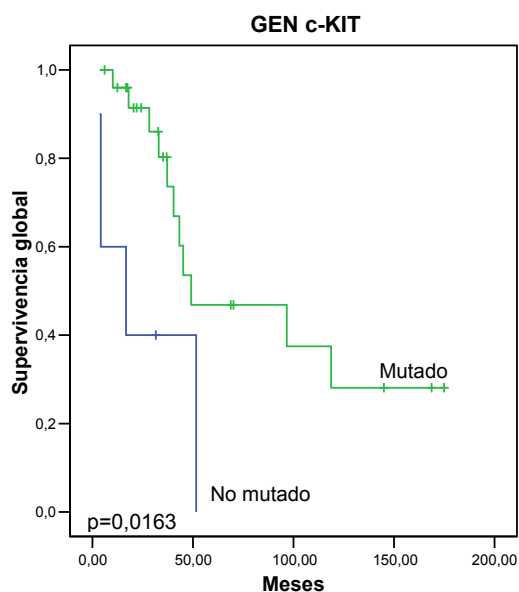


Figura 187: Gráfica de Kaplan-Meier que representa los casos tratados y su supervivencia según la presencia o ausencia de mutaciones.

- **Exones agrupados**

Cuando se analizan todos los exones del gen *c-KIT* por separado (No mutado, exón 11, 9, 13 y 17) se observa una tendencia hacia la significación estadística ($p=0,0661$), pero debido a que únicamente hay un caso mutado con doble mutación y ninguno en el exón 17; se procede a agrupar los exones en tres grupos. Se puede observar como los casos no mutados presentan muy baja supervivencia, seguido de los casos con mutaciones en los exones 9, 13 ó 17 con un 50% de supervivencia; y aquellos casos con menor número de fallecidos son los que presentan mutación en el exón 11 (Fig.188).

Parámetros	Nº	Eventos	%SA	%SG	p
c-KIT EXÓN					0,0447
No mutado	5	4	0	20	
Exón 11	20	8	32	60	
Exón 9,13,17	6	3	27	50	

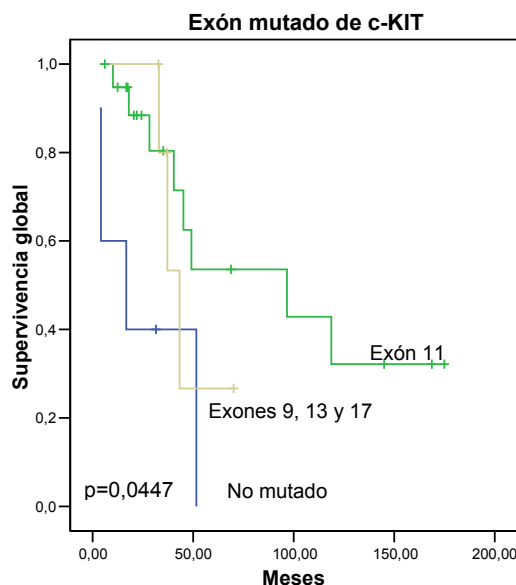


Figura 188: Gráfico de Kaplan-Meier respecto a los casos no mutados, exón 11 y los agrupados con la SG.

- **c-KIT mutación**

Debido a que el número de casos es bajo no se observa ninguna significación estadística en cuanto a SG. No obstante cabe destacar que la mayor supervivencia la tienen los casos que presentan mutaciones puntuales (100%), seguidas de los casos con deleciones (58%), ya en menor número siguen las duplicaciones (43%) y aquellos casos tratados con glivec con menor supervivencia son las deleciones más mutaciones puntuales (33%) (Fig.189).

Parámetros	Nº	Eventos	%SA	%SGtto.	p
c-KIT MUTACION					0,0757
No mutado	5	4	0	20	
Deleción	12	5	42	58	
Duplicación	7	4	21	43	
Mut.puntual	4	0	-	100	
Del+Mut.punt.	3	2	0	33	

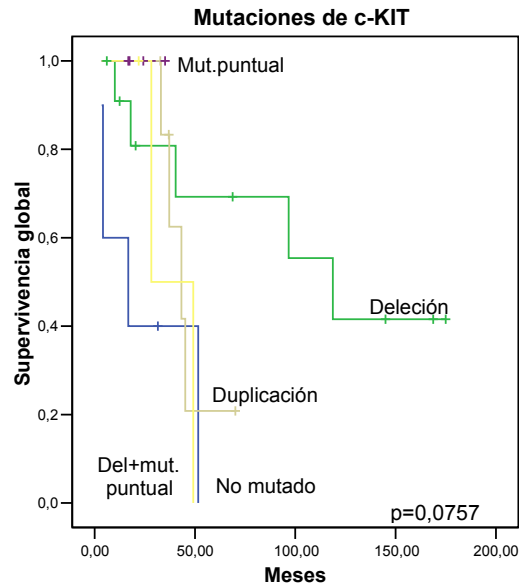


Fig.189: Gráfico de Kaplan-Meier que representa las diferentes mutaciones respecto a su supervivencia en los casos tratados.

- **Delección 557-558**

Los casos portadores de la delección de los codones 557-558 en el exón 11 de *c-KIT* muestran una mayor supervivencia respecto al resto de casos que no la presentan (Fig.190).

Parámetros	N°	Eventos	%SA	%SGtto.	p
Del.557-558					0,0149
No del.557-558	23	13	0	44	
Del.557-558	8	2	64	75	

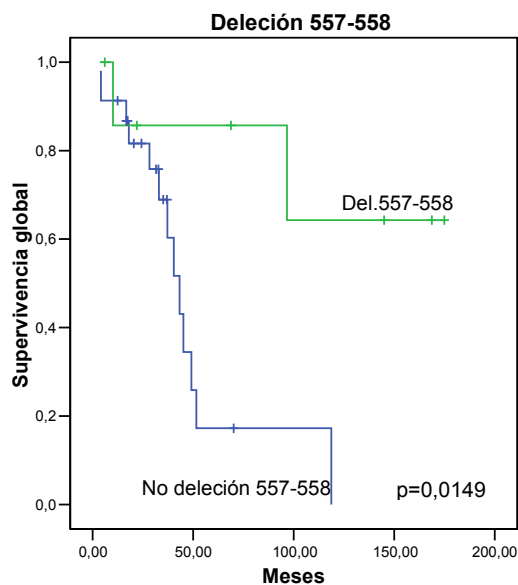


Figura 190: Gráfica de Kaplan-Meier que representa los casos con delección 557-558 y el resto respecto a su SG.

- **Delección 557**

Se observa el mismo comportamiento que los casos anteriores; casos tratados con glivec portadores de la delección del codón 557 tienen una mayor supervivencia respecto al resto de casos tratados (Fig.191).

Parámetros	Nº	Eventos	%SG tto.	p
Del.557				0,0506
No mutado	20	11	0	45
Del.557	11	4	49	64

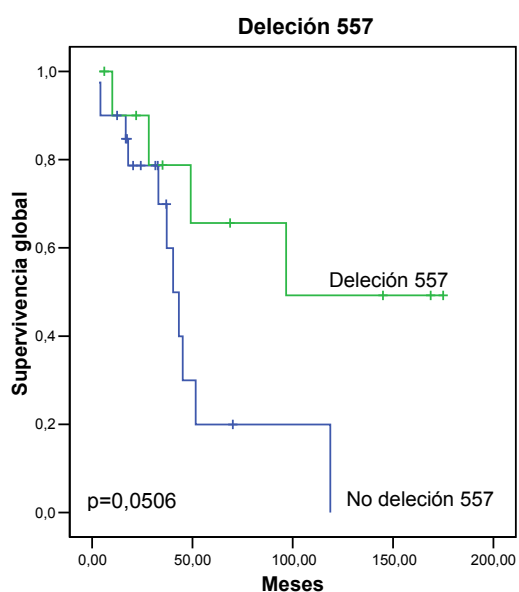


Figura 191: Gráfica de Kaplan-Meier que representa los casos portadores de la delección del codón 557 respecto a la SG.

- **PDGFR α gen**

Debido a que únicamente se presenta un caso con tratamiento y mutado, aunque salga significativo no se puede tener en cuenta. El único caso mutado y que no sobrevive es una mutación puntual en el codón 842.

4.10.8-ANÁLISIS MULTIVARIABLE EN LOS CASOS TRATADOS CON GLIVEC.

En 31 casos tratados con Glivec el parámetro obtenido en el análisis multivariable es la presencia de delección de los codones 557-558.

Tabla 58: Parámetros significativos en el análisis univariable y empleados en el multivariable en el grupo de pacientes tratados con Glivec.

Parámetros	SG tto p
Resección completa	0,0685
Grado Miettinen	0,0482
AML	0,0116
c-KIT GEN	0,0163
c-KIT exón	0,0661
c-KIT exones (0,11,9)	0,0447
Mutaciones c-KIT	0,0757
Del.557-558	0,0149
Del.557	0,0506

Tabla 59: Parámetros significativos en el análisis multivariable en el grupo de pacientes tratados con Glivec.

Parámetros	HR*	IC 95%	P
Del. 557-558			0,026
No delecionado	1		
Delecionado	0,168	0,035-0,80	

*Hazard ratio.

V.DISCUSIÓN

5.1 EN RELACIÓN A LOS HALLAZGOS CLÍNICOS.

Los **tumores del estroma gastrointestinal** (GIST) son las neoplasias mesenquimales más comunes del tracto gastrointestinal. Durante décadas por desconocimiento de su etiología fueron clasificados erróneamente como sarcomas musculares o de origen nervioso. En este sentido, resultaron determinantes los estudios realizados en el campo de la patobiología donde se recogen las observaciones morfológicas e inmunohistoquímicas de similitud de estas neoplasias con las células intersticiales de Cajal, y en concreto en lo referente a la detección del receptor tirosina quinasa c-KIT tanto en las células CIC como en las tumorales GIST^{9, 192}; y la activación constitutiva del receptor como consecuencia de las mutaciones en el gen *c-KIT*, que juega un papel temprano e importante en el desarrollo de estos tumores^{144, 147, 153, 187}. Estos hallazgos condujeron al desarrollo de nuevas terapias dirigidas como el Glivec²² (mesilato de imatinib), que inhibe la actividad del receptor tirosina quinasa c-KIT entre otros y que ha resultado ser muy eficaz en pacientes con GISTs avanzados^{24, 112, 113, 192-194}. Con todo ello hemos planteado un estudio retrospectivo de las posibles asociaciones entre la presencia o ausencia y el tipo de mutación con los parámetros clínicos e histopatológicos en una serie de GIST que incluye. El objetivo de nuestro estudio ha sido establecer las posibles asociaciones entre la presencia o ausencia y el tipo de mutación con los parámetros histopatológicos y la evolución clínica en una serie retrospectiva de GIST que incluye un gran número de casos recogidos del Hospital Clínico Universitario de Valencia, de la Fundación del Instituto Valenciano de Oncología y casos consulta remitidos desde otros centros. Se registraron un total de 175 casos diagnosticados como posibles GISTs, siendo diagnosticados definitivamente como tal después de los estudios anatomopatológicos y moleculares **145**.

En la literatura se recogen existen series más largas, especialmente los trabajos llevados a cabo por el grupo de Miettinen y Lasota que han analizado por ejemplo series de 1765 casos localizados en el estómago o 906 casos en el intestino delgado; siendo posiblemente el grupo que cuenta con las series más largas de GISTs en diferentes localizaciones^{39-42, 47, 54, 108, 195}. Otros como Nilsson y cols. realizaron un estudio de 1460 casos diagnosticados entre 1983

y 2000 basada en la población de Suecia,, de los cuales sólo 288 fueron finalmente verdaderos GISTs ²⁸. Otros estudios destacados fueron los de De Matteo y cols. que realizaron un estudio de 200 casos para analizar los parámetros pronóstico y la progresión tumoral ⁴³. También algunos estudios poblacionales de GIST que se han realizado en Italia (124 casos)²⁹, Noruega (434)²⁷, Méjico (275)³⁰, España (162)¹⁹⁶ en los que se analiza la incidencia y principales hallazgos clínico-histopatológicos.

La mayoría de los tumores mesenquimales del tracto gastrointestinal (exceptuando el esófago) son GIST; pero, hasta hace poco tiempo, estas neoplasias eran diagnosticadas fundamentalmente como tumores del músculo liso: leiomiomas, leiomiosarcomas o leiomioblastomas. Para establecer su diferenciación fue primordial el descubrimiento por parte de Hirota y cols. ¹⁹ de la hiperexpresión del receptor de membrana c-KIT (CD117) que se detecta inmunohistoquímicamente en un 95% de los GIST y que en un 85% de los casos es consecuencia de las mutaciones activantes en los exones de *c-KIT* que codifican para la región yuxtamembrana y dominios tirosina quinasa del receptor. Dentro de nuestra serie se han incluido un total de 40 tumores mesenquimales de tracto gastrointestinal, todos ellos diagnosticados como leiomiosarcomas, leiomioblastomas o schwannomas con anterioridad a 1998, con el objetivo de reclasificarlos en la función de los conocimientos actuales. Finalmente, fueron nuevamente diagnosticadas como GIST 31 casos (77%), con la ayuda tanto del marcador c-KIT tanto a nivel inmunohistoquímico como molecular ^{42, 46, 197, 28, 78, 198}. A diferencia de otras, hemos obtenido un porcentaje de GISTs rediagnosticados en una serie retrospectiva mucho mayor al de otros grupos, posiblemente debido a que se realizó un primer cribado de aquellos posibles GISTs según la histología y la localización del tumor, reduciendo el grupo significativamente.

La verdadera **incidencia** y **prevalencia** de los GIST está siendo revisada en la actualidad, ya que hasta hace unas pocas décadas más del 60% de los GIST habían sido diagnosticados como tumores benignos o tumores con un potencial incierto de malignidad, por lo que no eran incluidos en los registros de cáncer

nacionales. En los últimos años se han realizado estudios de largas series y se ha intentado unificar criterios para determinar la incidencia, la cual se estima que se encuentra entre 10-20 casos por millón de habitantes^{28, 32, 199}, de los que el 20-30% son malignos, lo que representa el 1% de todos los tumores gastrointestinales. Estimaciones no oficiales han detectado que la incidencia anual en Estados Unidos ha aumentado de 300-500 casos a 5000-6000 por año desde que se han establecido los criterios de diagnóstico de los GISTs³⁸. Por otra parte, un estudio basado en la población de Suecia sugiere una incidencia de 14,5 casos por millón de personas por año²⁸. Mientras que en Islandia un estudio retrospectivo estima una incidencia de 11/10⁶²⁰⁰ y en España es de 7-15 casos por millón de habitantes al año^{31,201}.

Por lo que respecta a la edad de diagnóstico, en nuestra serie hemos observado una mayor frecuencia de GIST en individuos entre la quinta y la séptima década de vida, con una mediana de **edad** que en nuestro caso ha sido de 63 años y en otras series entre 55-65, observándose un rango entre 24-86 años siendo infrecuente hallar un GIST por debajo de los 40 años y ninguno en niños; datos todos ellos en consonancia con lo recientemente publicado^{27, 28, 30}.

Los GIST infantiles han sido descritos como casos aislados o series de pequeño número²⁰²⁻²⁰⁵ o asociados al Síndrome de Carney o al Síndrome GIST paraganglioma^{106, 206}; a excepción de un trabajo de Miettinen y cols.¹⁰⁸ en el que se recoge una serie de 44 casos infantiles destacando que la mayoría de ellos se localizan en el estómago, con predominancia de la morfología epitelioide, ausencia de mutaciones en *c-KIT* o *PDGFR α* y con un curso evolutivo incierto^{40, 41, 43, 86, 207}. En nuestra serie no ha habido ningún paciente menor de 24 años y sólo 11 casos en el momento del diagnóstico presentaban una edad inferior a los 40.

Hemos observado además una asociación entre los casos con edad más avanzada y parámetros de buen pronóstico como son el tamaño inferior a 5 cm. ($p=0,043$), <5 mitosis en 50HPF ($p=0,001$), ausencia de metástasis ($p=0,055$) y una clasificación en el grupo histológico de bajo riesgo ($p=0,004$). De hecho, en el grupo de pacientes con una edad superior a los 70 años se ha observado un

menor número de recaídas (8,1%) ($p=0,007$) y progresiones (18,4%) ($p=0,002$); siendo el grupo de edades comprendidas entre los 36-50 años el que presenta mayor número de recaídas (42,9%) y progresión (60,9%), que está en consonancia con lo recogido por otros autores ^{108, 200, 208}.

Hemos apreciado una mayor prevalencia de GIST en el **sexo** masculino (1,43), no obstante, en la literatura se recogen series tanto con resultado similar al nuestro como con una distribución equivalente por sexos ^{43, 209-213}.

Los GIST son tumores esporádicos y únicos, excepcionalmente, se han descrito múltiples GIST asociados a la Neurofibromatosis tipo I (enfermedad de von Recklinghausen) ^{37, 214}, al Síndrome de Carney ^{106, 215} y a los GIST múltiples en forma de síndrome familiar hereditario descrito en familias portadoras ³³⁻³⁵. De los 145 GIST estudiados únicamente uno se ha correspondido con un GIST asociado a una neurofibromatosis tipo I con hiperplasia en las CIC sin mutación en los genes *c-KIT* y *PDGFR α* , ya que esta enfermedad se caracteriza por la mutación en el gen *NF1* que codifica para la neurofibromina. Son múltiples los estudios que confirman que las neurofibromatosis con múltiples GIST de pequeño tamaño en el intestino delgado no presentan mutaciones ni en *c-KIT* ni en *PDGFR α* , demostrando una patogénesis diferente a los GIST esporádicos ^{36, 37}. Se cree que para el desarrollo de un GIST es necesaria la mutación en *c-KIT* o *PDGFR α* ²¹⁶; sin embargo, en la *NF1* no son estos genes los que se encuentran mutados sino *NF1* ^{217, 218}. Parece ser que las alteraciones tanto en *c-KIT*, *PDGFR α* o *NF1*, afectan a la cascada de señalización intracelular de ras-MAP quinasas lo que explicaría una posible vía de desarrollo común ^{104, 219}. Sin embargo son necesarios más estudios para clarificar todo lo relacionado con el desarrollo de los GIST esporádicos y asociados a *NF1* ^{217, 218}.

Según un estudio basado en la población de Suecia ²⁸ aproximadamente un 70% de los GISTs debutan con **sintomatología clínica**, un 20% sin ella y un 10% se detectan en la autopsia. Todos nuestros casos han presentado clínica, excepto un pequeño número que son hallazgos incidentales durante revisiones ginecológicas o intervenciones quirúrgicas por otros procesos. La presentación

más frecuente de los GIST esporádicos es el sangrado por la ulceración de la mucosa, dolor, obstrucción o fiebre; siendo los dos primeros síntomas los más comunes en nuestra serie^{92, 100, 220}.

La primera opción de tratamiento con intención curativa es la **resección quirúrgica**, la cual ha de ser completa, con bordes amplios y libres²²¹. No se suelen tomar biopsias debido al riesgo de rotura, sangrado o extravasación del tumor, ni tampoco se suelen asociar linfadenectomía ya que las metástasis en los ganglios linfáticos son muy infrecuentes. Unos márgenes claramente afectados se asocian a supervivencias globales de 9 y 12 meses y una rotura del tumor durante la cirugía se ha considerado un factor de pronóstico adverso por el riesgo de diseminación que supone²²¹. En nuestra serie, no se pudo realizar la resección completa en 19 casos, debido fundamentalmente al gran tamaño de los tumores. De hecho, solo tres presentaban un tamaño entre 6-10 cm, 7 de más de 10 cm. y nueve medían más de 20 cm (dos con más de 40 cm.).

Como hemos comentado, los **tumores irresecables** tienden a recaer y metastatizar más rápidamente que aquellos con resección completa, sin hemorragias, ni rupturas (en los casos que sucede la ruptura uno de cada cuatro pacientes muere por la enfermedad)^{43,221}. En comparación con los tumores que se han resecado por completo, los tumores irresecables presentaron un mayor número de casos con recaídas ($p=0,002$), progresión ($p=0,054$) y muerte ($p<0,0001$) confirmando los hallazgos anteriores. Hemos observado una asociación entre la resección incompleta del tumor y el tamaño tumoral mayor de 10cm ($p=0,00026$) y la localización extragastrointestinal ($p=0,026$). Como era de esperar, más del 80% de los tumores irresecables se clasificaron en el grupo de alto riesgo de Fletcher ($p=0,005$) y el 66,7% en el grupo de alto riesgo de Miettinen ($p=0,05$), valores todos ellos similares a los obtenidos en otros estudios^{43, 222, 223}.

Los GIST tienden a **metastatizar** en la cavidad peritoneal en forma de múltiples nódulos, también en hígado y con menor frecuencia en hueso²²⁴. En nuestro estudio, 30 de los 145 casos han recaído y han desarrollado metástasis 32, localizándose todas en el hígado a excepción de una en hueso (zona sacra) y

otra en pulmón. Los GIST de alto riesgo pueden desarrollar metástasis entre uno o dos años después de la resección completa; sin embargo, la literatura recoge que algunos GISTs desarrollan metástasis pasados cinco o hasta quince años desde la primera intervención^{17, 102, 211}. De los 32 casos que han presentado metástasis, exceptuando los nueve casos que en el momento del diagnóstico ya se consideraron enfermedad diseminada y han sido excluidos, la mediana de aparición fue de 23 meses, muy similar a la observada en otras series (donde la mediana es de 20 meses)²⁸. Por el contrario, sólo dos casos han desarrollado metástasis pasados los diez años.

El **Glivec** (STI571, imatinib mesilato, Farmacéuticas Novartis, Basel, Suiza) es un fármaco inicialmente diseñado para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica^{225, 226}. Una vez descubiertas las mutaciones en los genes *c-KIT* y *PDGFR α* se pensó que este fármaco, que actúa en las uniones de ATP de los dominios catalíticos con actividad tirosina quinasa, podría ser utilizado en los GIST ya que los intentos de tratamiento con quimioterapia o radioterapia eran y son poco eficaces en estos tumores^{100, 193}. Así en febrero del 2000 fue testado en un paciente con metástasis en Finlandia²¹ y en junio del 2000 se trataba al primer paciente con GIST metastásico en Estados Unidos. En febrero del 2002 el Glivec fue aprobado por la FDA para tratar tumores irresecables en GIST²²⁷. En nuestra serie, los casos tratados con este fármaco son aquellos que no son operables o que progresan rápidamente con metástasis²²⁸⁻²³⁰. En total 32 casos, de los cuales 10 se trataban de tumores irresecables, siendo administrado preoperatoriamente en 5 casos por la localización y el tamaño tumoral.

En las diferentes series analizadas, encontramos que la **localización** más frecuente es el estómago (60-70%), seguido por el intestino delgado (20-30%), intestino grueso (5%) y esófago (5%)^{29, 38-43}. En raras ocasiones, los GISTs se desarrollan fuera del tracto gastrointestinal (EGIST) como en el mesenterio, omento o retroperitoneo^{47, 48}. En estos casos, se hace necesario valorar que los EGISTs no sean en realidad una localización primaria sino la metástasis de un GIST gástrico o intestinal⁸⁶. De manera excepcional se pueden presentar GIST en el apéndice, páncreas, útero, vagina o vesícula biliar^{195, 231, 232}. En

nuestra serie 71 tumores (49,57%) se han localizado en el estómago, seguidos por 36 en el intestino delgado (25,2%); y en menor número 15 casos en el intestino grueso (10,5%), 3 en el esófago (2,1%) y 18 extragastrointestinales (12,5%) en el peritoneo, retroperitoneo y mesenterio, además de tres casos localizados en la pared del útero (12,5%). Cabe destacar que la gran mayoría de los EGISTs fueron casos consulta para confirmación diagnóstica.

Los GISTs localizados en el esófago no superan más del 2% del total de GISTs, siendo más común en esta localización el diagnóstico de leiomioma⁴². En nuestra serie cuatro neoplasias se han localizado en el esófago siendo una un leiomiosarcoma y las otras tres GISTs. Debido al pequeño número de casos no hemos podido asociar ningún parámetro de pronóstico pero cabe comentar resumidamente que los tres GISTs esofágicos han sido diagnosticados entre los 68 y 71 años, presentando diferentes tamaños desde 1 a 6 cm, dos con histología fusocelular y uno mixto presentando ambos menos de dos mitosis por 50 HPF. Se encuentran mutados dos de ellos en el exón 11 de *c-KIT* con delección de los codones 557-558 y 558-559 respectivamente. Los hallazgos obtenidos son similares a los casos aislados que se presentan en la literatura o a series con pocos casos por lo infrecuente de esta localización^{42, 233-235}.

Los GISTs gástricos son los más frecuentes de todo el tracto gastrointestinal por lo que han sido bien estudiados en amplias series basadas en las diferentes localizaciones^{28, 41, 200, 236}. Confirmando los resultados recogidos en la literatura, nuestra mediana de edad en los GISTs gástricos ha sido de 67 años (rango:36-86), con una ligera predominancia por el sexo masculino (63% de los casos), siendo estimada una frecuencia de malignidad inferior al 25%^{41, 53, 236}. El tamaño tumoral, según se indica en la literatura, puede variar de nódulos de pequeños milímetros a más de 40 cm, siendo la mediana de tamaño en largas series de 6 cm^{28, 41, 200, 236}; presentando un índice mitótico en la mayoría de los casos inferior a 5 mitosis por 50HPF; datos que confirman nuestros resultados ya que las medianas son de 8 cm. de tamaño tumoral y 4 de mitosis (65% de nuestros casos presentan menos de 5 mitosis)²³⁷. La histología más frecuente en los GISTs gástricos en el estudio de Miettinen⁴¹ de 1765 casos es la fusocelular con un porcentaje del 61% y la epitelioides (39%);

en nuestros resultados los porcentajes varían siendo de 68% para la histología fusocelular, mixta (18%) y epitelioides (14%).

Los resultados obtenidos en la localización intestinal se asemejan a los obtenidos en el estudio de más de 906 casos localizados en el intestino de Miettinen y cols.⁴⁰. En esta serie existe una leve predominancia del sexo masculino (55%) y la mediana de edad de presentación del tumor es de 59 años (rango: 24-82); mientras que en nuestro caso se observa una predominancia masculina (58%) y una mediana de edad de 55 años. Los tamaños varían desde 0,3 a más de 40 cm con una mediana de 7cm, nuestra mediana de tamaño ha sido la misma y el rango de tamaño también. El índice mitótico también ha sido similar a la serie de Miettinen donde un 45% de los casos han presentado más de 5 mitosis a 50 HPF. La histología mayoritaria en el estudio de Miettinen de localización intestinal, es la fusocelular con el 86%, seguida en menor número por el patrón mixto en el 9% y epitelioides en el 5%; observándose en nuestra serie una distribución similar (81% fusocelular, 13% patrón mixto y 6% epitelioides).

Los estudios con más casos localizados en el intestino grueso, que no presentan una incidencia mayor al 6%, son dos series del grupo de Miettinen³⁹, una que consta de 144 casos de localización rectoanal y una segunda de 44 casos en el colón. Nuestra casuística ha mostrado resultados muy similares a los recogidos en estas series con una predominancia masculina del 69% y una mediana de edad de 65 años (rango: 34-82). El tamaño puede variar igual que en el resto de localizaciones desde minúsculos pedúnculos a grandes tumores, en nuestra serie la mediana ha sido de 8 cm con un rango de 1 a 34 cm. El índice mitótico en nuestros casos no coincide con el señalado en el artículo mencionado anteriormente, en su serie hay un elevado número de casos con más de 5 mitosis, sin embargo en la nuestra la mediana de mitosis ha sido de 3 (rango de 0 a 20) con un 60% de los casos con menos de 5 mitosis en 50HPF. La histología mayoritaria es la fusocelular que supone el 67%, seguida de un 20% mixta y un 13% epitelioides.

Por último, la localización extragastrointestinal la hemos considerado de manera detenida debido a la mala evolución que han presentado estos casos. Hay tres series de 26⁴⁷, 39²³⁸ y 48 casos⁴⁸ que han analizado la localización extragastrointestinal y los resultados obtenidos en estos estudios y el nuestro han sido muy similares. Al contrario que en el resto de localizaciones ha habido una clara predominancia del sexo femenino, siendo en nuestra serie del 61%, con una mediana de 55 años en nuestra serie y de 58 en las otras tres recogidas en la literatura. El rango del tamaño ha sido amplio de 2 a 40 cm con una mediana de 8 cm. En la serie de Reith y cols. la mediana es de 13 mitosis en 50 HPF (rango de 1 a 113)⁴⁸; nuestros resultados han sido inferiores con una mediana de 5 mitosis y un rango de 1 a 50 mitosis.

No hemos hallado **asociaciones** que impliquen a la **localización** y a los parámetros clínico-histopatológicos, a excepción, obviamente, de la clasificación de riesgo de Miettinen ($p=0,0002$). En dicha clasificación destaca el riesgo de malignidad de los casos localizados en el intestino y los extragastrointestinales. Estas asociaciones han sido confirmadas en varios estudios donde se analizan las diferentes localizaciones y su pronóstico de progresión, destacando que a igual tamaño la localización del intestino delgado presenta peor pronóstico que la del estómago, siendo consideradas las localizaciones del intestino delgado, colón y extragastrointestinales las de peor pronóstico y las esofágicas y gástricas las de mejor pronóstico^{40-42, 52, 239}. En nuestra serie las localizaciones que han presentado mayor número de recaídas ($p=0,054$) han sido el intestino grueso y los casos extragastrointestinales, sin embargo el intestino delgado y el estómago han recaído en poco más del 20% y ninguno localizado en el esófago lo ha hecho. Estos resultados se asemejan más a los artículos publicados^{222, 102} cuando se observa la progresión de la serie ($p=0,032$), donde han progresado más del 60% de los casos localizados en el intestino grueso y extragastrointestinales, el 44,8% del intestino delgado y ya en menor número el estómago (27,6%) y ninguno en el esófago.

Debido a la mala evolución que presentan los casos EGISTs se quiso analizar su potencial de malignidad de manera más detenida en función de lo publicado previamente^{48, 72, 102, 240}, así como su posible implicación como un factor de mal

pronóstico. Como en el artículo de Reith y cols⁴⁸ hemos analizado las posibles asociaciones entre los 18 EGISTs y todos los parámetros clínicos e histopatológicos de los que disponíamos, observando que se asocian a un mayor tamaño tumoral respecto al resto de casos ($p=0,054$) con un 30% de los casos irresecables, y una asociación con la progresión de la enfermedad ($p=0,05$) y desarrollo de metástasis ($p=0,049$).

5.2- EN RELACIÓN CON LOS HALLAZGOS ANATOMOPATOLÓGICOS

Los GISTs presentan un amplio rango de **tamaño** desde unos pocos milímetros a más de 40 cm⁵¹, con una mediana de 5 cm a 7 cm^{241, 242}; siendo nuestra mediana de tamaño de 7,5 cm con un rango comprendido entre los 0,3 a los 42 cm. Hemos obtenido valores similares al resto de grandes series cuando clasificamos el tamaño tumoral según los criterios de Fletcher siendo los tamaños más frecuentes aquellos comprendidos entre 6-10 cm y más de 10 cm. En nuestro estudio el tamaño comprendido entre 6-10 cm ha sido el más frecuente con 48 casos (34%); seguido de 47 tumores que han medido más de 10 cm (33,3%); 32 casos (22,7%) han presentado un tamaño tumoral menor de 5 cm y 14 casos (9,9%) han sido menores de 2 cm. Los casos con un tamaño pequeño presentan una clínica más favorable debido a que generalmente se practica una resección completa como confirma Bucher y cols.¹⁰¹. Entre nuestros casos ha habido muy pocos tumores menores de dos centímetros.

El tamaño tumoral junto con la actividad mitótica son los principales parámetros relacionados con el pronóstico por lo que son los seleccionados, dada su adversidad, para la clasificación de riesgo de Fletcher¹⁷. El tamaño tumoral es el factor pronóstico mejor definido, de forma que la supervivencia a 5 años para tumores que no superen los 5cm oscila en torno al 60%. Esta cifra desciende al 20% si el tamaño tumoral es mayor de 10 cm.^{40, 41}. En nuestro estudio ha sido uno de los parámetros con mayor número de correlaciones clínico-histopatológicas. Así se ha asociado a: necrosis ($p<0,0001$), pleomorfismo ($p=0,008$), localización extragastrointestinal ($p=0,054$), actividad mitótica ($p<0,0001$) y resección incompleta ($p=0,00026$). Aquellos casos con

un tamaño superior a los 5 cm han presentado en más del 46% de los pacientes progresión y los tumores mayores de 10 cm. en más del 50% ($p=0,006$), confirmando los resultados de otros autores^{29 243}. En nuestra serie, cuatro casos menores de 5 cm. han recaído y cuatro más han metastatizado, lo que indica que además del tamaño hay otros factores que favorecen la malignidad de los GIST.

El **índice mitótico** es muy variable y oscila entre ausencia de mitosis y más de 150 mitosis cada 50 campos de gran aumento; con una mediana en nuestra serie de 4 mitosis en 50 HPF con un rango de 0-80 mitosis. La distribución de nuestra serie según los criterios de Fletcher¹⁷ ha sido similar a otros estudios previos²⁹: la presencia de menos de 5 mitosis ocurre en la mayoría de nuestros casos (61%), seguida de la de más de 10 mitosis (22,8%) y de entre 6-10 mitosis (16,2%). Como en la mayoría de los estudios realizados, hemos obtenido una asociación entre el índice mitótico, la aparición de progresión ($p<0,0001$) y de fallecimientos ($p<0,0001$).

La **histología** predominante en los GIST es la fusocelular con porcentajes superiores al 70%^{29, 30, 40, 41, 46, 244}. En nuestra serie la presentación fusocelular ha constituido el 71%, en menor número se encuentra la morfología epitelioides y mixta; que dependiendo de los artículos es mayor un tipo u otro^{29, 30, 40, 41, 46, 244}. En nuestra cohorte encontramos mayor número de casos mixtos (18%) que epitelioides (11%), pero en definitiva muy pocos estudios encuentran asociaciones entre el tipo histológico y el pronóstico²³⁷.

En la serie también se han evaluado los parámetros de **necrosis** y **pleomorfismo**. Hemos observado que un 40,7% de GIST han presentado necrosis; al igual que otras series que también tienen en cuenta este parámetro^{40, 41, 200, 237,222}. Además, hemos visto una asociación directa entre la necrosis y el tamaño tumoral y el número de mitosis ($p<0,0001$). A mayor tamaño y mayor número de mitosis más presencia de necrosis en el tumor; como consecuencia de estas dos asociaciones se encuentra una asociación directa con la clasificación de riesgo de Fletcher y de Miettinen ($p<0,0001$) resaltando que no ha habido ningún caso clasificado de muy bajo riesgo que haya presentado

necrosis y prácticamente el 60% de los casos de alto riesgo en las dos clasificaciones la han presentado. Este parámetro en nuestra serie también se ha asociado al desarrollo de metástasis ($p < 0,0001$) y al exitus ($p = 0,025$), el 46% de los pacientes con necrosis han desarrollado metástasis y el 42,6% con presencia de necrosis tumoral fallecen por cáncer. Hay que destacar que no se ha encontrado una asociación de las recaídas con la necrosis.

Por su parte, el pleomorfismo se describió en el 45,9% de los casos. Muchos artículos destacan que el pleomorfismo puede presentarse de forma focal o difusa y suele ser muy raro o poco marcado, tratándose de una característica más común en los tumores del músculo liso (leiomioma) que en los GIST^{38, 245}. No hemos tenido en cuenta el diferenciar la presencia de pleomorfismo focal o difuso, simplemente la presencia o ausencia de este parámetro; de todos modos el porcentaje tan elevado de pleomorfismo recogido en nuestra serie en comparación con otras puede deberse a que muchos de nuestros casos se encuentran en estadios tumorales muy avanzados en el momento del diagnóstico. Al analizar las asociaciones clínico-histopatológicas con el pleomorfismo, hemos obtenido resultados muy similares a los hallados con la necrosis pero con una menor significación; encontrando una asociación a mayor tamaño tumoral ($p = 0,008$) y a mayor índice mitótico ($p = 0,016$), así como con las clasificaciones del grupo de riesgo de Fletcher y Miettinen ($p < 0,0001$). Por consiguiente, este parámetro también se encuentra asociado a la presencia de metástasis ($p = 0,018$) y al exitus ($p = 0,048$).

Los GIST representan un amplio espectro de tumores en función de su grado de malignidad. Sólo el 30% de los GIST son considerados malignos según los criterios clásicos; sin embargo, la tendencia actual es considerarlos todos como potencialmente malignos y clasificarlos de acuerdo al riesgo de comportamiento agresivo. El potencial maligno de los GIST depende principalmente de factores como el tamaño tumoral, la actividad mitótica y la localización^{102, 198}. Los **criterios de riesgo** establecidos en la última reunión de consenso en el NIH se basan en el tamaño tumoral y el número de mitosis, clasificándose en cuatro grupos de riesgo³⁸. Sin embargo, recientemente el grupo de Miettinen ha establecido una nueva clasificación de riesgo añadiendo

al tamaño y mitosis la localización tumoral. Se sabía, aunque no se incluía dentro de los criterios de Fletcher (NIH), que la localización intestinal confiere mayor potencial agresivo respecto a localizaciones gástricas¹⁸³, por lo que Miettinen y cols.¹⁰² rehacen la clasificación a partir del tamaño y las mitosis pero teniendo en cuenta la localización son clasificados en un grupo de riesgo u otro.

Los casos incluidos en este estudio han sido **clasificados** siguiendo los **criterios de Fletcher**, 11 han sido clasificados de muy bajo riesgo (8%), 32 casos clasificados de riesgo bajo (22%), 22 de riesgo intermedio (15%) y 79 de alto riesgo (55%). Teniendo en cuenta la segunda **clasificación de riesgo** según **Miettinen** los casos se reagruparían de la siguiente forma: 24 casos de muy bajo riesgo (17%), 24 de bajo riesgo (17%), 30 de riesgo intermedio (21%) y 65 de alto riesgo (45%). De este modo se discriminan mejor poblaciones de riesgo que con el índice de Fletcher, especialmente entre el riesgo intermedio y el de bajo riesgo, si bien, ambas clasificaciones se asocian a eventos de progresión y muerte ($p < 0,0001$).

5.3- EN RELACIÓN CON LOS HALLAZGOS DE LOS MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS.

Para el correcto diagnóstico de un GIST, además de su morfología, es imprescindible realizar una batería de **marcadores inmunohistoquímicos** que están establecidos según las características específicas de estos tumores y su diagnóstico diferencial con otras neoplasias.

El marcador por excelencia que consiguió diferenciar a los GISTs del “cajón de sastre” de neoplasias huérfanas en el que se encontraba incluido hasta 1998 fue **c-KIT**¹⁸⁷. La utilidad de este marcador ha ayudado a solidificar y unificar criterios diagnósticos y comparativos de estos tumores, sin embargo, ningún marcador inmunohistoquímico es perfecto, y la dependencia tan acusada de los GISTs sobre la inmunotinción de c-KIT ha generado algunos problemas. El más relevante es que comercialmente existen muchos anticuerpos frente a c-KIT, y

éstos se han aplicado utilizando diferentes protocolos en diferentes laboratorios, generando como resultado una discrepancia en cuanto a la especificidad de este marcador en GIST, fundamentalmente en lo relativo a otros tumores mesenquimales en el abdomen, incluyendo fibromatosis (tumor desmoide), sarcoma sinovial, y leiomiomasarcoma ¹¹⁶. Se puede señalar que no existe un protocolo unificado y consensuado en la determinación de c-KIT, y que en la actualidad, sobretodo después de ver el papel que juega c-KIT en la patogénesis de los GIST y posiblemente en otras neoplasias, se debería hacer un esfuerzo por consensuar y validar los procedimientos de análisis. En nuestro estudio se ha realizado la inmunotinción con el c-KIT (CD 117) de DAKO Cytomation, el cual fue el que mejores resultados aportó en una evaluación de los anticuerpos de c-KIT de unos laboratorios privados (NordiQC) llevada a cabo en 56 centros, en el que ha proporcionado una tinción más específica. Ésta debe de ser por lo general intensa, citoplasmática y membranosa, sin embargo también se pueden presentar tinciones débiles y difusas con acúmulos perigolgianos ¹⁷. De cualquier modo, entre el 90 y el 100% de los GISTs son positivos para este marcador, siendo la positividad en nuestra serie del 91% pero con diferentes intensidades: el 54% de los casos (79) han presentado una tinción muy intensa, seguida en un número menor por una intensidad moderada (22%) y una intensidad débil en el 15%. Estas dos últimas categorías que pueden ser muy débiles o sólo membranosas y con una distribución irregular de la positividad de las células; deben de ser evaluadas de un modo muy riguroso y con el procedimiento de tinción sin modificaciones (mismo anticuerpo, misma dilución y mismo método) para la correcta evaluación del anticuerpo, además de considerar los controles externos e internos (fibroblastos y estroma peritumoral y los mastocitos intratumorales). Además, en la histología epitelioide en GISTs la tinción de c-KIT suele ser menos intensa que en la fusocelular, en nuestra serie el 55,8% de los casos fusocelulares han sido intensamente positivos para el marcador y sólo el 27,8% de los epitelioides se han marcado; sin embargo aquellos casos con una histología mixta presentan una intensa positividad en el 65,2%. Hay autores como Medeiros ⁶³ que ya admitían que podía existir un pequeño grupo de tumores negativos, no siendo un requisito imprescindible la positividad para c-KIT para diagnosticar un GIST. Más que las tinciones débiles, el mayor

problema con este marcador y el diagnóstico de los GISTs son ese pequeño grupo de casos negativos para dicho marcador, los cuales necesitan de otros marcadores como el CD34 y del estudio mutacional de *c-KIT* y *PDGFRα* para confirmar su diagnóstico. Además, hay que tener una consideración con estos casos debido a que las tinciones se realizan en tumores incluidos en parafina y la negatividad se puede deber a otras circunstancias externas que alteran el resultado dando un falso negativo. Los problemas más frecuentes pueden ser debidos a: una mala fijación del tumor en el formol, biopsias endoscópicas donde el tejido es limitado y se produce una difusión de la inmunotinción, o una real negatividad debida a una mutación que bloquea la expresión de la proteína o por una mutación en otro receptor tirosina quinasa como el *PDGFRα*. En nuestra serie de 145 casos trece han sido negativos para c-KIT confirmándose el diagnóstico de GIST por otros marcadores inmunohistoquímicos y el análisis mutacional.

En el diagnóstico diferencial de los GISTs se deben de incluir: los tumores del músculo liso (los cuales son positivos para actina de músculo liso y desmina) y los schwannomas (positivos para la proteína S-100), ambos negativos para c-KIT, así como otros como son el dermatofibrosarcoma protuberans, hemangiopericitoma, el liposarcoma esclerosante bien diferenciado, el angiosarcoma y el sarcoma de Kaposi que pueden ser positivos focalmente para c-KIT. Otros tumores positivos para c-KIT son los melanomas y sarcomas de células claras, el carcinoma pulmonar de células pequeñas, el sarcoma de Ewing, el linfoma anaplásico de célula grande, seminoma, leucemia mieloide aguda, gliomas y carcinoma endometrial ^{11, 246}.

Además de la expresión de c-KIT, se observa positividad característica para otros marcadores, si bien cabe señalar que ninguno de ellos es específico para los GISTs ¹⁷. En el diagnóstico de los GISTs se considera básico además del examen histológico, el análisis inmunohistoquímico de los marcadores c-KIT, CD34, S-100, desmina y actina ²⁴⁷.

El segundo anticuerpo en importancia para el diagnóstico de los GISTs es el marcador **CD34** ¹⁴; no es específico para GISTs ya que es positivo en un

amplio rango de tumores, en especial en los tumores de músculo liso²⁴⁸; sin embargo, conjuntamente con c-KIT y S-100 puede ser útil para diferenciar un GIST de otros tumores mesenquimales del tracto gastrointestinal^{9, 14}. CD34 es positivo en el 60-70% de los GISTs con una tinción muy similar a la de c-KIT, mayormente en casos esofágicos y rectales (casi 90% de ellos)¹⁷. Los GIST intestinales ya sean benignos o malignos muestran la más baja positividad al CD34 (50%)^{40, 41}. En nuestra serie la positividad frente a este marcador ha sido del 67,7% de los casos; los localizados en el estómago han sido los que han presentado mayor número de casos con máxima intensidad para el marcador CD34 (49,2%) ($p=0,009$), seguido por los casos con localización en el intestino grueso donde 6 casos de 15 presentan máxima tinción, sin embargo 8 casos en dicha localización han sido negativos para el marcador. Además, debido a que sólo hay tres casos en nuestra serie localizados en el esófago no se han obtenido resultados representativos y por tanto no deben ser valorados.

La **actina del músculo liso** según recoge la literatura se expresa entre el 20 al 40% de los GISTs^{17, 27}. En nuestra serie la tinción ha mostrado un porcentaje superior que en el resto de series siendo del 58,3%, y además, no destaca como en otras series una mayor intensidad en el intestino delgado frente al estómago¹⁹⁷. Estas discordancias puede deberse a que nuestra serie no es homogénea, ya que en ella se incluyen los casos del estudio retrospectivo, que habían sido en un primer momento diagnosticados como leiomiomas, leiomiomas o leioblastomas y que han sido positivos para la actina del músculo liso. En este sentido, en nuestra serie, de los 30 casos antiguos rediagnosticados, excepto 3 casos, todos han sido positivos para este marcador. Por el contrario, el resto de GIST han sido en más del 48% negativos para la actina del músculo liso.

Al comparar nuestra positividad para el marcador **desmina** con otras series hemos observado un comportamiento muy similar al de la actina de músculo liso. La positividad de dicho marcador es del 1 al 2%¹⁹⁷ y en nuestra serie asciende al 20%. Siendo la diferencia entre los casos retrospectivos y los actuales aún más acusada porque el 88,5% de los GIST no antiguos han sido negativos para el marcador y por el contrario, el 44,8% de los casos de la serie

retrospectiva han sido positivos para la desmina. Otro hecho por el que se podría justificar en nuestra serie tantos casos positivos para desmina es el tratamiento con este fármaco, ya que se ha observado que el tratamiento con Glivec puede inducir a posteriori la positividad en GIST para este marcador⁶⁷; sin embargo, no hay un mayor número de casos tratados con Glivec positivos para la desmina.

Como es de esperar más del 95% de los GISTs de nuestra serie son positivos a **Vimentina** dado el origen mesenquimal de los GISTs.

El marcador neuroendocrino **S-100** es positivo en un 5 a 10% de los GIST³⁸; en nuestra serie la positividad observada también ha sido mayor al resto de grupos con un 36,5% de casos positivos para S-100, siendo la tinción en la gran mayoría muy débil o moderada. De los 44 casos positivos para el marcador S-100 únicamente 4 han sido diagnosticados como GANTs (9%). Como ya ha sido descrito en otras series⁴⁰, hemos encontrado una asociación entre la expresión del marcador S-100 y la localización del tumor, siendo mayoritaria su positividad en la localización del intestino delgado (67,9%) frente al estómago (29,5%) ($p < 0,0001$).

En 2003 Heinrich y cols.²² hallaron que además de las mutaciones en el gen *c-KIT*, había un porcentaje de GIST con mutación en el gen ***PDGFR α*** ; por consiguiente, se empezó a realizar la inmunohistoquímica de la proteína. Si en *c-KIT* ha habido problemas en cuanto al marcador empleado y su especificidad, no han sido menores los problemas con el marcador **PDGFR α** , ya que todavía no existe consenso ni por lo que respecta a la casa comercial ni en las concentraciones o métodos empleados para su determinación inmunohistoquímica. En nuestro caso se llevaron a cabo diversas pruebas para evaluar distintos anticuerpos, siendo finalmente aceptado para nuestros análisis el anticuerpo policlonal de Santa Cruz (sc-338). A pesar de ello, muchos estudios cuestionan la utilidad de **PDGFR α** como un marcador diagnóstico para GISTs²²⁷. En nuestra serie un 61,9% de los casos han sido positivos para **PDGFR α** . Rossi afirma que los GIST negativos para *c-KIT* son siempre positivos para **PDGFR α** , excluyéndose mutuamente los dos

marcadores a nivel inmunohistoquímico igual que en biología molecular⁷⁰. Sin embargo, nuestros resultados no confirman estos hallazgos ya que en nuestra serie de siete casos negativos para c-KIT, cinco son positivos (71,4%) y dos negativos para PDGFR α . Del mismo modo, de los 31 casos negativos para PDGFR α 29 son positivos (93,5%) para c-KIT y sólo dos casos son negativos, no pudiéndose, por tanto, excluir la positividad de PDGFR α en aquellos casos negativos para c-KIT ni a la inversa.

En los estudios previos que analizan la expresión inmunohistoquímica de PDGFR α ^{24, 227} se observa que la positividad se asocia a la histología epitelial, a la localización del tumor en el estómago y a las mutaciones en el gen *PDGFR α* . En nuestra serie, los casos positivos para PDGFR α han presentado como histología más frecuente la epitelial, seguida por la mixta y posteriormente la fusocelular, pero no ha habido diferencias significativas entre el tipo histológico y la positividad del marcador. Tampoco hemos obtenido una asociación directa entre la positividad del marcador inmunohistoquímico PDGFR α y la localización del tumor; siendo la localización mayoritaria con positividad la extragastrointestinal, seguida del estómago.

Un buen marcador inmunohistoquímico de la proliferación celular es **Ki-67**²²⁸. En nuestra serie el 15% de los tumores han presentado positividad para él en más del 5% de las células y un 39% en menos del 5%, siendo el 46% positivos en un porcentaje inferior al 1% de células. Nuestra serie incluye esencialmente GISTs en un estadio muy avanzado de enfermedad por lo que los porcentajes son superiores a otras series.

Varios estudios han analizado el papel pronóstico del marcador de proliferación Ki-67^{35, 229}. Aunque es un excelente marcador nuclear de las células en ciclo proliferativo, los estudios comparativos frente al índice mitótico evaluado en tinción con Hematoxilina-Eosina, no ofrecen resultados ventajosos, superponiéndose ambos entre sí por lo que puede ser un medio de confirmación en aquellos casos en que el recuento del índice mitótico presente dificultades. Sin embargo, en estudios como el de Nilsson y cols.¹⁷³ el marcador Ki67 sí tiene un valor pronóstico independiente y también existen estudios donde este marcador tiene más fuerza diagnóstica que el índice

mitótico^{230 231} y en otros todo lo contrario^{57, 232}. En nuestra serie hemos observado una asociación directa entre la expresión de Ki-67 y el índice mitótico ($p < 0,0001$). Es decir, aquellos casos con una positividad inferior al 1% para el marcador presentan menos de 5 mitosis en 50 HPF en el 84% de los casos, los tumores positivos al marcador en menos del 5% de las células han presentado en el 63% menos de 5 mitosis y los GIST positivos para Ki-67 en más del 5% han presentado más de 5 mitosis a 50 HPF en el 85,7% de los casos; por lo que según nuestros resultados el marcador Ki-67 podría aportar información en aquellos casos en los que no se pudiera realizar un correcto conteo o fuera necesario con el índice proliferativo del índice mitótico. Además hemos observado que a mayor tamaño tumoral mayor ha sido la expresión de Ki-67 ($p = 0,035$) y por consiguiente aquellos casos clasificados de alto riesgo expresan en más del 75% el marcador KI-67 en un 5% de las células tumorales ($p = 0,001$). Un estudio realizado por Gumurdulu y cols.²⁴⁹ obtienen asociaciones muy similares a las nuestras. En un estudio realizado sobre 288 GIST obtuvieron como factores pronóstico independientes el tamaño tumoral y el Ki-67; proponiendo los autores la suma de estos dos parámetros para un índice de pronóstico¹⁷³.

Otro marcador inmunohistoquímico empleado en la evaluación de los diferentes tumores es **p53**²⁵⁰. En nuestra serie el 42,3% de los casos han sido positivos para dicho marcador. Hemos hallado una asociación directa entre el marcador inmunohistoquímico p53 y el recuento mitótico, aquellos casos que expresan p53 presentan mayor número de mitosis ($p < 0,0001$). También hemos encontrado una asociación directa con Ki-67, el 83% de los casos que son positivos para p53 expresan Ki-67 en más del 5% de las células, reflejando la proliferación descontrolada de las células tumorales ($p = 0,005$). Además hemos observado una asociación directa entre el riesgo histológico de Fletcher ($p = 0,02$) y Miettinen ($p = 0,023$) con la expresión de p53, un 72% en la clasificación de Fletcher y un 58% en la de Miettinen de los casos que han expresado p53 han sido clasificados de alto riesgo. Parte de nuestros resultados son confirmados por Gumurdulu y cols.²⁴⁹; los cuales encuentran asociación entre p53 con el recuento mitótico y con el riesgo histológico, pero no con el marcador Ki-67. Además, en los estudios realizados por Meara y cols.⁸¹ y Al-Bozom⁶⁸, p53 se considera un marcador pronóstico debido a que hay

una diferencia de expresión muy significativa entre los casos agresivos y no agresivos, resultados que son confirmados con otros estudios²⁵¹. Sin embargo otros autores no han podido demostrar la asociación de p53 con la supervivencia del paciente^{65, 252}.

Dentro del panel inmunohistoquímico también se realizó el estudio de **MDM2**. Este marcador en GIST no ha sido muy testado²³³ y en nuestro caso ha supuesto alguna dificultad en cuanto a la especificidad del anticuerpo. No obstante, un 43,1% de los 59 casos valorados en nuestra serie han sido positivos para dicho marcador y hemos encontrado una asociación significativa directa entre el marcador MDM2 y p53 ($p=0,012$). MDM2 inhibe la expresión de p53 por lo tanto cuando hay sobreexpresión de p53, MDM2 se expresa y la inhibe. En un estudio realizado por Haller y cols.²³³ han demostrado mediante el análisis de expresión génica que la elevada expresión de MDM2 junto con otros genes reguladores del ciclo celular, especialmente los responsables de la transición de las fases G1 a S del ciclo celular, como son p53, p16, p14, CDK4 y RB1 revela una clínica muy adversa. Nosotros no hemos podido comprobar estos hallazgos en nuestra serie.

A nivel de **correlaciones con los marcadores inmunohistoquímicos** y los **eventos de progresión**, en nuestro estudio no hemos hallado prácticamente significaciones, puede deberse a la poca homogeneidad de nuestros casos ya sea por el incluir casos muy antiguos y muy recientes o por aquellos casos de consulta generalmente de mala evolución y patrón histopatológico anómalo). En diferentes estudios se han identificado marcadores inmunohistoquímicos adversos y con mal pronóstico; como puede ser el caso del marcador S-100, en el cual se considera que a mayor positividad más adversidad excluyendo el intestino delgado¹⁰². También se ha publicado que una positividad elevada para Ki-67 ó p53 supone peor pronóstico^{68, 99, 249}. Incluso se ha confirmado con resultados estadísticamente significativos que la positividad para SMA es un factor pronóstico adverso tanto en GIST gástricos como en intestinales⁴⁰.

En nuestra serie las correlaciones directas con los eventos de progresión las hemos observado con los marcadores c-KIT, CD34 y KI-67.

A nivel del marcador inmunohistoquímico c-KIT, los casos negativos han presentado un elevado porcentaje de recaídas ($p=0,026$) y progresión

($p=0,045$). Este hecho puede deberse a que aquellos casos negativos para c-KIT no entraban dentro del protocolo de tratamiento con Glivec. También hemos encontrado una asociación inversa ($p=0,054$) entre la negatividad del marcador inmunohistoquímico CD34 y los casos no tratados con Glivec que presentan recaídas, reafirmando los hallazgos de la negatividad de c-KIT y el no tratamiento de Glivec. Sin embargo, al analizar las metástasis destaca que los casos con metástasis en un 71,4% expresan intensamente c-KIT ($p=0,07$); que nos indica la sobreexpresión de la proteína en las células tumorales y por consiguiente la progresión del tumor.

Como en muchos otros artículos^{68, 249, 253}, la expresión del marcador Ki-67 se ha asociado con una mayor presencia de metástasis ($p=0,010$) y de progresión tumoral ($p=0,008$). No obstante en nuestra serie no ha habido una correlación entre la expresión de dicho marcador y la presencia de recaídas.

5.4- EN RELACIÓN A LOS HALLAZGOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

El descubrimiento por parte de Hirota y cols.¹⁸⁷ de la presencia de **mutaciones** en el exón 11 del **gen c-KIT** en GIST fue determinante en las investigaciones de este tumor. Desde entonces, son muchos los trabajos que se han dedicado a estudiar las mutaciones de *c-KIT* en los GIST y actualmente dependiendo de los procedimientos empleados, la incidencia de mutaciones es de entre 21 y un 92%^{20, 95, 142, 145, 146}. Esta discrepancia se debía, fundamentalmente a que muchos estudios sólo analizaban el exón 11 de *c-KIT*; hasta que Rubin y cols.¹⁴² demostraron, analizando los 21 exones de *c-KIT*, que se encontraban mutaciones también en los exones 9, 13 y 17. Asimismo, Heinrich y cols.²² postularon, que en aquellos GIST con *c-KIT* nativo y con expresión débil o ausente del marcador inmunohistoquímico, debía de haber otros receptores tirosina quinasa implicados en la patogénesis de estos tumores, encontrando la expresión primero y posteriormente las mutaciones en los exones 12 y 18 del gen ***PDGFR α*** .

En nuestra serie hemos hallado un total de 96 mutaciones entre los 145 casos (66%), las cuales se distribuyen 87 en *c-KIT* (91%) y 9 (9%) en *PDGFR α* . Las

diferencias de porcentajes con respecto a otros estudios, depende, además del estudio de unos exones u otros, de las series analizadas y de los procedimientos empleados. Aquellas series, como la nuestra, que analizan el estado mutacional a partir de tejido incluido en parafina obtienen porcentajes mutacionales inferiores a las series que analizan tejido en fresco^{20, 95, 142, 145, 146}; ya que puede ocurrir la fragmentación y degradación de ADN en los tumores incluidos en parafina. En nuestra serie destaca que hemos hallado un caso mutado en la recaída pero no en el tumor primario, sin embargo no se ha descrito ningún caso que no presente mutación y posteriormente la adquiera⁹⁵, por lo que debemos pensar que este hecho se debe a la escasez de material tumoral o a la mala fijación del tumor primario. Además, la antigüedad de los bloques también puede influir en los resultados como en el caso de Andersson y cols.²⁵⁴ en los que el porcentaje de mutaciones es inferior en los casos más antiguos (32%) en comparación con los más recientes (67%) a pesar de que en nuestra serie no obtenemos una gran diferencia entre el grupo antiguo (48%) y el de casos recientes (66%). Otro motivo puede ser el método empleado para la detección de las mutaciones, para nuestro estudio, en un principio se empezó haciendo un cribado de mutaciones mediante polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP); sin embargo, se cambió a la secuenciación directa de todos los exones a estudiar debido a que un porcentaje de mutaciones no eran detectadas por los SSCP, como confirma el estudio de Kinoshita y cols.¹⁵⁰. Un método que puede aumentar el porcentaje de mutaciones es la microdissección del tejido tumoral, ya que se estudia exclusivamente el tejido tumoral y no hay falsos negativos¹⁵¹. Además, la no homogeneidad de la serie puede hacer variar los porcentajes de mutaciones. Se sabe que las mutaciones en *c-KIT* son un evento temprano en la patogénesis de los GIST¹⁴⁷; sin embargo, las series como la nuestra basadas en casos de varios centros, en diferentes estadios de progresión y tratados con Glivec conlleva más mutaciones en *c-KIT* unidas a GIST más malignos y menos mutaciones en *PDGFR α* típico de GIST epitelioides gástricos esencialmente benignos^{172, 173, 176}.

Como en otras series no hemos obtenido ningún caso que sea portador de una mutación en *c-KIT* y *PDGFR α* a la vez, por consiguiente las mutaciones activantes en *c-KIT* o de *PDGFR α* son acontecimientos mutuamente

excluyentes, pero con consecuencias biológicas similares en la patogénesis de los GIST²². Además, al realizar el estudio retrospectivo de los casos diagnosticados antes de 1998, confirmamos los resultados de otros autores no observando ninguna mutación ni en los leiomiomas ni en los leiomiomas
39, 151

Las mutaciones de *c-KIT* se localizan fundamentalmente en los exones 9, 11, 13 y 17; siendo los exones 11 y 9, que codifican para las regiones yuxtamembrana, donde se observan con mayor frecuencia^{23, 127, 255}. En nuestra serie las mutaciones se han localizado mayoritariamente en el exón 11 con un total de 76 mutaciones (80% del total de mutaciones), seguidas de las 8 encontradas en el exón 9 de *c-KIT* (8% del total de mutaciones), dos en el 17(2%) y una en el exón 13(1% del total de mutaciones). Las frecuencias de mutaciones en el gen *PDGFR α* en los diferentes estudios se encuentran entre un 7-10%^{22, 116, 256}, localizándose fundamentalmente en los exones 12 y 18, equivalentes a los exones 11 y 17 de *c-KIT*. En nuestra serie únicamente hemos encontrado nueve mutaciones en el exón 18 (9%).

Como en la mayoría de estudios, el **exón 11** ha sido el más mutado de *c-KIT* con un total de 76 mutaciones (88% del total de mutaciones en *c-KIT*), en otras series los porcentajes se sitúan aproximadamente en un 75-80% del total de casos mutados en *c-KIT*^{28, 211, 257}. Las mutaciones en el exón 11 originan una activación constitutiva del receptor; siendo las alteraciones más frecuentes descritas en el exón 11 deleciones intersticiales, mutaciones puntuales, duplicaciones en tándem; además de estos tres tipos de mutaciones, de manera excepcional se han llegado a describir inserciones o inversiones de codones^{95, 142, 258, 259}. En nuestro estudio en el total de 145 casos mutados hemos observado los tres tipos de mutaciones más frecuentes en el exón 11: 45 casos han presentado deleciones intersticiales (59%), diecisiete mutaciones puntuales (22%), nueve deleciones más mutaciones puntuales (12%) y cinco duplicaciones (7%).

Las **deleciones intersticiales** son la mutación más común en GIST, localizándose fundamentalmente en la región 5' del exón 11 de *c-KIT*, (entre los

codones 550 y 561) especialmente los codones 557 y 559, siendo la delección más frecuente la que comprende los codones 557 y 558 (Trp557_Lys558del). En la región 3' el codón más afectado por delecciones intersticiales es el 579. Las delecciones intersticiales pueden abarcar desde un único codón a más de 30, eliminando parte del dominio yuxtamembrana que inhibe la activación de la quinasa en ausencia del ligando²⁶⁰. Nuestra serie ha confirmado los resultados de otras series^{151, 196, 256}, donde se han visto afectados desde los codones 550 al 572, siendo los codones más frecuentemente afectados el 557, el 558 y el 559 con una gran diferencia respecto al resto. Eventualmente también hemos hallado delecciones en los codones 573-577 y 579; presentando delecciones intersticiales que pueden afectar un único codón o hasta 20 codones, siendo el número de codones deleccionados más frecuente el de dos.

Las **mutaciones puntuales** son la segunda mutación más frecuente en GISTs, afectando gran parte de ellas al exón 11. Los codones que se encuentran más afectados son el 557, 559, 560 y 576; no obstante se han identificado mutaciones en otras localizaciones²¹⁶. Las mutaciones puntuales más frecuentes son Val559Asp, Val560Asp, Trp557Arg, Val559Ala, Val559Gly y Leu576Pro^{20, 95, 261}. Algunas de estas mutaciones han mostrado una fosforilación constitutiva de *c-KIT*²⁶². Las mutaciones puntuales que hemos observado en nuestra serie han sido similares al resto de series, concentrándose en los codones más frecuentes (557, 559, 560 y 576), siendo el codón más afectado por las mutaciones puntuales el codón 559. Además hemos observado una mutación poco frecuente Asn567His y una mutación que ha dado lugar a un codón STOP (Trp557STOP). Las mutaciones puntuales dando lugar a un codón STOP han sido reportadas ocasionalmente en GISTs primarios y metastáticos, y pueden reflejar cambios secundarios relacionados con la progresión del tumor^{180, 196, 263, 264}; en nuestro caso el GIST con la mutación STOP no presenta recaídas ni metástasis.

En este estudio hemos querido diferenciar aquellos casos que presentan una **delección** seguida o precedida de una **mutación puntual**. En otras series este grupo se une a las delecciones^{40, 41}; pero queríamos ver si presentaban diferencias con respecto al resto de mutaciones y en concreto con las

deleciones. Hemos detectado deleciones en todo el exón, siendo más frecuentes en la región comprendida entre los codones 550-572 y las mutaciones puntuales se concentran en los codones 553, 557, 559, 565, y 575. De todos estos codones los que se encuentran más afectados son los codones 557 y 559.

La tercera mutación más frecuente en los GISTs son las **duplicaciones** en tándem las cuales abarcan de uno a 18 codones en la región 3' del exón^{66, 151, 256}. Las duplicaciones halladas en nuestros estudios, al igual que otros estudios, se concentran en los codones 573-591, implicando cualquier codón de esta región. De las cinco duplicaciones, una se encuentra unida a una mutación puntual Thr574Pro, pero por tratarse de un único caso se agrupa dentro de las duplicaciones.

Observando los resultados obtenidos en el exón 11 en nuestra serie y en otros estudios previos podemos distinguir dos regiones, una primera que abarcaría desde el codón 550 al 572 y una segunda región entre los codones 573 y 591; concentrándose, en la primera región las deleciones y mutaciones puntuales, y en la segunda todas las duplicaciones más alguna deleción o mutación puntual. Esta diferencia de mutaciones en una región u otra condiciona un comportamiento distinto de los GISTs según el tipo de mutación, por lo tanto los mecanismos implicados han de ser también diferentes aunque aún no se conozcan del todo.

Cabe destacar que, como en otras series^{20, 95, 151, 196, 256, 261}, los codones que con más frecuencia se ven afectados por mutaciones son el 557, 558 y 559; destacando que en la nuestra tanto en el codón 557 como en el 559 se han descrito mutaciones puntuales y deleciones pero en el codón 558 sólo ha habido deleciones; en otros estudios como el de Martín y cols.¹⁹⁶ el codón 558, aunque no es frecuente, también presenta mutaciones puntuales.

La gran mayoría de las mutaciones en *c-KIT* se presentan en heterocigosis; sin embargo, existe un pequeño porcentaje (aproximadamente un 4%^{26, 265}) de casos que se detectan en homocigosis en la secuenciación directa de los

productos amplificados. Hay varias explicaciones para este resultado en la secuenciación, una de ellas es que podría darse el caso de que ambos alelos presentaran la mutación (verdadera mutación en homocigosis). También se podría dar por la presencia del alelo mutado pero con la pérdida del alelo no mutado (mutación en hemicigosis) o una amplificación selectiva del locus mutado en *c-KIT*²⁶⁵ o más probablemente la homocigosis se deba a una pérdida del alelo no mutado y posteriormente una duplicación de la región mutada en la evolución de la progresión tumoral²⁶⁵. En nuestra serie se han descrito cinco mutaciones en **homocigosis** y todas ellas corresponden a la primera región del exón 11 de *c-KIT*. Hay otras series como la de Lasota y cols.²⁶⁵ con un gran número de casos en homocigosis descritos, donde se encuentran descritas la gran mayoría de las mutaciones que hemos hallado en nuestro estudio. De las cinco mutaciones halladas, dos han correspondido a la delección de los codones 557-558, otra además de ser portadora homocigota de esa delección ha presentado una mutación puntual del codón 559 Val (GTT)>Phe (TTT); otro de los casos ha presentado una delección desde el codón 554 al 559 y la quinta mutación en homocigosis encontrada ha sido una mutación puntual sin cambio de aminoácido (mutación sinónima) del 558 más delección de los codones 559 al 573. Cabe destacar que no se ha hallado ningún caso en homocigosis con mutación puntual ni duplicación ni en otro exón que no sea el 11 de *c-KIT*; contrariamente en la serie de Lasota y cols. sí que observan mutaciones puntuales e incluso duplicaciones en la segunda región del exón 11 pero no encuentran ninguna mutación en homocigosis localizada fuera del exón 11. La inmensa mayoría de las mutaciones en GISTs ocurren en heterocigosis pero existen verdaderos homocigotos o hemicigotos por pérdida del segundo alelo, que se pueden dar hasta en un 15%²⁶⁵. Se ha visto que este cambio de heterocigosis a hemicigosis podría producirse en la progresión de las lesiones durante el tratamiento con Glivec²⁶⁶; por nuestra parte no podemos confirmar estos hallazgos debido a que los casos que hemos analizado son, en su mayoría, de tumores previos al tratamiento con Glivec.

Las mutaciones en el dominio extracelular se producen en el **exón 9**, la frecuencia de dichas mutaciones se encuentra entre el 9-20% dependiendo de los estudios^{154, 261, 267}, siendo en nuestra serie del 9%. De forma mayoritaria se

encuentra una inserción de seis nucleótidos siendo esta mutación la descrita en nuestros casos, produciendo la duplicación de los aminoácidos Ala502 y Tyr503; sin embargo, duplicaciones en Phe506 al Phe508 han sido descritas en tres casos hasta la fecha ^{180, 216}.

Las mutaciones en el **exón 13** (dominio TK1) y **exón 17** (lazo de activación) se presentan en una baja frecuencia de 0,8-4,1% para el exón 13 y no llega al 1% para el exón 17 en diferentes series ^{176, 180, 261, 267}. En nuestro estudio, sólo hemos encontrado una mutación en el exón 13 (1%) y dos en el exón 17 (2%). La mutación encontrada en el exón 13 corresponde a una mutación puntual dando a nivel proteico el cambio de aminoácido de Lys642Glu, siendo esta mutación la más representativa del exón 13 ²⁶⁸. Recientemente se han reportado seis mutaciones nuevas en el exón 13: Glu635Lys, Leu641Pro, Val643Ala, Leu647Pro, Met651Val y Asn655Lys ^{161, 162, 269, 270}; incluso se ha llegado a describir una doble mutación en dicho exón Lys642Glu y Val643Ile ²⁶⁸.

En el exón 17 las mutaciones más frecuentes son Asn822Lys y Asn822His; sin embargo, hay otras descritas aunque en muy pocos casos como Asp816Phe, Asp816Tyr, Asp820Tyr (descrito en GIST familiares), Asp820Val, Asn822His, Tyr823Asp ^{142, 268}. En nuestra serie hemos encontrado dos mutaciones puntuales en el Asp816Val y la otra Tyr823Asp (la cual corresponde a una mutación secundaria a una deleción en el exón 11). Cabe destacar que el exón 17 de *c-KIT* se encuentra mutado en otras neoplasias, sobretodo el codón 816, como la mastocitosis, el seminoma, disgerminoma, leucemia mieloide aguda y linfoma T ^{155, 156}. Este hecho demuestra que se requieren diferentes condiciones de transformación en las diferentes neoplasias aunque presenten mutaciones en el mismo exón o el mismo gen.

Además de las mutaciones en *c-KIT*, un 7-10% de GISTs se encuentran mutados en el gen ***PDGFR α*** ; estas mutaciones se concentran sobretodo en el exón 12 y el 18. En nuestra serie no hemos detectado ninguna mutación en el exón 12 pero sí en el 18. De las nueve mutaciones que se han encontrado en ***PDGFR α*** (9%), la que más se ha repetido en nuestra serie (6 casos) ha sido la mutación en el exón 18 Asp842Val ^{22, 169, 271, 272}. Además de esta mutación

hemos encontrado una delección de los codones comprendida entre el 842 y el 845, otra entre los codones 844-846 y por último una delección entre los codones 844 al 846 más una mutación puntual en el codón Ser847Pro. La mayoría de delecciones en *PDGFR α* ocurren en la región que abarcan los codones 840 al 848^{22, 169, 271, 272}, estando todas nuestras delecciones dentro del rango; por el contrario la mutación en el codón 847 unida a una delección no la hemos encontrado previamente descrita por ningún otro autor; sí que se han descrito mutaciones puntuales en el codón 842 con cambios de aminoácidos diferentes a la valina (tirosina e isoleucina), además de los codones Asp846Tyr y Tyr849Cys^{248,273}.

En nuestra serie no hemos encontrado ninguna mutación en el exón 12 pero suelen ser habituales las delecciones entre los codones 559-572, mutaciones puntuales en el codón 561 e incluso duplicaciones^{22, 169, 271, 272, 274}. Se han descrito también mutaciones puntuales en el exón 14, pero su frecuencia es mínima, por lo que no ha sido estudiado en nuestra serie^{169, 171, 271}.

Hay controversia sobre el **valor pronóstico** de las **mutaciones del gen *c-KIT***. Estudios como los de Ernst y cols.¹⁴⁵, Lasota y cols.²⁰, Taniguchi y cols.⁹⁵, Nihisida y cols.²⁷⁵ y Kim y cols.¹⁵⁹ han indicado que los GIST portadores de mutaciones en el exón 11 de *c-KIT* presentan peor evolución que los no mutados; sin embargo, estudios como los de Andersson y cols.³², Sakurai y cols.²⁷⁶ y Wardelmann y cols.¹⁵¹ no encuentran dicha asociación. Adicionalmente, Corless y cols.¹⁴⁷ han reportado una alta frecuencia de mutaciones de *c-KIT* en aquellos GIST de pequeño tamaño hallados accidentalmente; sugiriendo que las mutaciones en *c-KIT* son un evento temprano en el desarrollo de los GIST.

En nuestra serie hemos confirmado la asociación de un determinado tipo de mutaciones a parámetros anatomopatológicos, encontrando una asociación entre el tipo de mutación presente y el índice mitótico ($p=0,0001$). Así, las delecciones más mutaciones puntuales se asocian en un 86% de casos con más de 5 mitosis por 50HPF (siendo más de 10 mitosis en un 71,4%), le siguen las delecciones en un 50% y por el contrario, el 94% de casos con mutaciones puntuales se asocian a menos de 5 mitosis en 50HPF, seguidas por las duplicaciones y casos no mutados en un 66% ($p=0,001$). Hay series como la de

Andersson y cols.²⁵⁴ y Steigen y cols.²⁶ que encuentran resultados muy similares a los nuestros.

Además de encontrar una asociación directa entre el tipo de mutación y el índice mitótico, también hemos encontrado asociación con el tipo de codón implicado en la mutación. Estudios como el de Wardelmann y cols.¹⁵² o Martín y cols.¹⁹⁶ observan un mayor índice mitótico en los casos portadores de la deleción de los condones 557-558. Hemos confirmado estos resultados, ya que un 59% de los casos portadores de la deleción 557-558, en nuestra serie, han presentado más de 5 mitosis en 50 HPF ($p=0,012$) (siendo un 39% más de 10 mitosis, $p=0,024$). También encontramos un mayor índice mitótico en casos portadores de la deleción del codón 559 (57%, $p=0,05$), un 55% de casos con deleción en el 557 ($p=0,027$); y un 61% cuando se encuentra implicado el codón 558 ($p=0,01$). Los resultados obtenidos anteriormente, al analizar el número global de mitosis observamos los mismos resultados. Hay mayor índice mitótico en los casos que presentan deleción versus los no mutados ($p=0,047$), los tipos de mutaciones con más número de mitosis han sido las deleciones y las deleciones más mutaciones puntuales. Por el contrario, los casos que menos mitosis han presentado han sido los portadores de las mutaciones puntuales seguidas de las duplicaciones y los no mutados ($p=0,002$). También cabe destacar que los casos con presencia de la deleción 557-558 o deleción 557 más mutación puntual 558 o mutaciones en los codones 557y 558 han presentado un mayor número de mitosis.

Contrariamente al estudio de Andersson²⁵⁴, no hemos obtenido una significación estadística entre la presencia de mutaciones en c-KIT y el tamaño tumoral, este hecho puede deberse a que muchos de los GIST analizados en la serie se encuentran en un estadio tumoral muy avanzado y son de gran tamaño. Andersson y cols.²⁵⁴ encuentran una asociación directa entre la presencia de mutaciones en *c-KIT* y un mayor tamaño en los tumores; sin embargo, no encuentran prácticamente mutaciones en los tumores de pequeño tamaño; estos resultados quizás se pueden deber a que la proporción de células tumorales es inferior a las normales y no llega a amplificarse la mutación. Estos resultados son discordantes con los nuestros, ya que en

nuestra serie ha habido tres casos de bajo riesgo (tamaño inferior a 5cm) de los que dos de ellos han presentado recaídas e incluso el tercero ha fallecido por la enfermedad; encontrándose los tres casos mutados, 2 en *c-KIT* y uno en *PDGFR α* . Por lo que al igual que en las series de Corless y cols.¹⁴⁷, Ernst y cols.¹⁴⁵ y Wardelmann y cols.¹⁵¹ no hemos encontrado una asociación entre el tamaño tumoral y la presencia de mutaciones.

Pero en nuestro estudio sí existe una correlación entre el tipo de mutación y la clasificación de riesgo según Fletcher, donde todos los casos con una delección más mutación puntual y el 61% de los casos portadores de delección han sido clasificados en el grupo de alto riesgo. Por el contrario, el 78% (14 de 18 casos) con mutación puntual han sido clasificados en los grupos de muy bajo, bajo y riesgo intermedio obteniendo resultados muy similares a otras series^{95, 254}. Sin embargo, al analizar las duplicaciones y los casos no mutados observamos porcentajes inferiores en los grupos de muy bajo, bajo y riesgo intermedio en comparación con otras series⁶⁶; obteniendo un 49,2% (29 de 59 casos) en los casos no mutados y un 38% (5 de 13) en las duplicaciones (resultado similar al grupo de Andersson²⁵⁴). Este bajo porcentaje de incluidos en los grupos de menor riesgo puede deberse a que en nuestra serie muchos de los casos estudiados pertenecen de entrada al grupo de alto riesgo por tratarse de estadios avanzados; aunque no obstante hemos podido confirmar que los casos con mutación puntual presentan factores de pronóstico favorables y las delecciones más mutación puntual desfavorables ($p=0,033$). Además, hemos hallado una asociación directa con los codones más mutados en nuestra serie; aquellos casos que han presentado delección en el codón 558 han sido clasificados en el grupo de alto riesgo en un 79% ($p=0,005$); igual ha ocurrido en aquellos casos con delección más mutación en los codones 557-558 en un 70% ($p=0,017$). No hemos obtenido una asociación estadísticamente significativa como en otros artículos^{152, 196}, pero el 68% de los casos portadores de delección de los codones 557-558 han sido incluidos en el grupo de alto riesgo.

Tampoco hemos obtenido asociación entre el grupo de riesgo de Miettinen y las mutaciones. Ello puede ser debido a que un parámetro empleado para esta

clasificación es la localización tumoral, que tampoco ha sido significativa en nuestra serie, aunque sí que hemos visto una asociación en aumento entre aquellos casos portadores de la deleción 558 y el grupo de alto riesgo de Miettinen ($p=0,040$). Sin embargo, hay varios estudios previos que sí han obtenido una asociación entre la localización del tumor y el tipo de mutación. Aquellos GISTs con duplicación en el exón 11 de *c-KIT* tienden a localizarse en el estómago^{41, 66, 261} al igual que aquellos que se encuentran mutados en el gen *PDGFR α* ^{22, 273, 277}; por el contrario, los casos mutados en el exón 9 de *c-KIT* tienden a localizarse en el intestino delgado^{261, 278}. Estas asociaciones podrían explicar la distinta respuesta a la terapia y la variación clínica. En aquellos casos mutados en el exón 9 de *c-KIT* sí que hemos encontrado una asociación con la localización en el intestino delgado (5 casos de 8 se localizan en el intestino, $p=0,042$). A pesar de que no hemos obtenido significación en nuestra serie por lo que a la localización tumoral y la mutación presente se refiere, sí que hemos visto que de las cinco duplicaciones presentes en el exón 11 de *c-KIT* tres se localizaron en el estómago y de las 9 mutaciones encontradas en el gen *PDGFR α* siete se localizaron en el estómago, resultados que están en consonancia con lo descrito anteriormente. En nuestra serie hemos encontrado además una correlación entre la presencia de deleción del codón 558 y la localización del tumor ($p=0,043$), siendo el estómago (60%) la más frecuente entre los casos portadores de la mutación, además de ser la localización más frecuente en general de las deleciones en el exón 11 de *c-KIT*.

En el estudio realizado por Lasota y cols.²⁰ no encuentran una correlación entre las mutaciones en c-KIT exón 11 y el marcador inmunohistoquímico; debido a que la mutación no provoca la expresión de c-KIT pero sí que modifica su función²⁷⁹, a pesar de lo cual en nuestra serie sí que se ha observado una asociación directa entre la presencia de mutaciones y la máxima expresión de c-KIT ($p=0,003$). Del mismo modo, hemos visto una asociación, esta vez inversa, entre la presencia de mutaciones en *PDGFR α* y la expresión de c-KIT, que ya había sido confirmada en otros trabajos²⁵. También, se ha estudiado el marcador Ki-67 en varias series, encontrando una alta significación entre la expresión del marcador y la presencia de mutaciones en *c-KIT* en GIST^{151, 254}; sugiriendo que la presencia de la activación constitutiva del receptor c-KIT

puede producir un aumento en la actividad proliferativa en las células de GISTs^{151, 254}. En nuestra serie no hemos encontrado esta asociación, pero un 60% de los casos mutados en *c-KIT* han sido positivos para el Ki-67.

Como se ha mencionado anteriormente, del total de mutaciones cinco casos se encuentran en homocigosis; siendo estas mutaciones un 60% deleciones y un 40% deleciones más mutación puntual, sin que se haya observado ninguna mutación puntual ni duplicación en homocigosis en nuestra serie; a pesar de lo observado en otras series^{116,265,26}. Además de estos cinco casos, en cuatro están implicados los codones 557-558 delecionados; todos los casos en homocigosis tienen implicado el codón 558 y tres de ellos el codón 559. Esto significa que todos los casos en homocigosis han presentado implicados los tres codones que se encuentran mutados con mayor frecuencia en nuestro estudio CD557-558-559 y también cabe destacar que no se ha hallado ningún caso en homocigosis en otro exón que no sea el 11 de *c-KIT*. Además se ha observado una asociación significativa entre las mutaciones y los parámetros de mayor riesgo; los 5 casos presentan un tamaño superior a 5cm ($p=0,04$) y tienden a ser de mayor tamaño comparado con el resto de casos, con un número de mitosis de más de cinco mitosis en 50 HPF ($p=0,004$), y además, a nivel histológico cuatro casos han sido fusocelulares y el otro epitelial. La literatura recoge artículos que ya confirman esta asociación a parámetros de mayor riesgo^{116,26, 265}.

Además de los criterios clásicos que diferencian los tumores benignos de los malignos (tamaño, mitosis y localización), se ha intentado encontrar nuevos marcadores pronóstico y comportamiento biológico como factores predictivos de respuesta al tratamiento, especialmente en tumores pequeños con escaso número de mitosis y poder metastatizante. Muchos de estos estudios se concentran en el análisis de las alteraciones genéticas de los genes *c-KIT* y *PDGFR α* y en otras alteraciones cromosómicas. Las mutaciones pueden afectar a diferentes exones (11, 9, 13 y 17 de *c-KIT* y 12 y 18 de *PDGFR α*) y varios autores han descrito una relación entre la presencia de mutaciones en el gen *c-KIT* y un peor pronóstico^{20, 95, 145, 159, 280}, relación cuestionada por otros¹⁴⁷. Las mutaciones en el exón 11¹⁸⁷ se asociarían con una mejor respuesta al

tratamiento y en el exón 9 con una mayor agresividad; aunque sigue habiendo resultados discordantes^{20, 145, 153, 267}.

En varios estudios se ha analizado la influencia y la localización de las mutaciones en *c-KIT* con respecto de la supervivencia libre de recurrencias^{62, 152, 196}; aquellos tumores GIST que se encuentran mutados suelen ser de mayor grado y se caracterizan por una recurrencia más frecuente y un ratio de mortalidad más elevado que en GIST con un *c-KIT* normal. Las mutaciones activantes de *c-KIT* en la región “hot spot” del exón 11 no parece que estén asociadas con un fenotipo clínico-patológico específico, pero la presencia de deleciones, antes que las sustituciones, predice una conducta mucho más agresiva^{159, 183, 196}, en especial las deleciones que afectan a los codones 557-558 indican un peor pronóstico^{152, 196}. El potencial biológico de las mutaciones puntuales en el exón 11 de *c-KIT* es desconocido, asociándose por lo general a un mejor pronóstico. Entre los GIST gástricos, aquellos tumores con deleciones suelen ser más agresivos que los que tienen mutaciones puntuales; sin embargo este hecho no se da en GIST intestinales.

En nuestro estudio se han confirmado los resultados obtenidos en otras series^{20, 95, 145}: en primer lugar hemos observado asociación directa entre la presencia de mutaciones y los eventos de recaída ($p < 0,0001$), metástasis ($p = 0,0002$) y progresión ($p < 0,0001$); presentándose dichos eventos en más del 80% de los casos portadores de mutaciones en el gen *c-KIT*. Al analizar la posible implicación de los exones de *c-KIT* en la progresión, hemos observado resultados similares al resto de series^{261, 273, 278}, donde los GIST portadores de mutaciones en el exón 9 han progresado en un 86%, seguido por el exón 11 con casi la mitad de casos (49%) y en un porcentaje mínimo los casos no mutados. Aunque no es significativo debido al escaso número de casos mutados en el gen *PDGFR α* , en éstos sólo ha metastatizado un caso y no ha recaído ninguno.

Al analizar el tipo de mutación más implicado en la progresión hemos obtenido diferencias con respecto al resto de series descritas^{40, 62}. En nuestra serie los casos portadores de deleción más mutación puntual han sido los que han presentado una mayor frecuencia de progresión (75%), seguidos de las duplicaciones (67%). Si analizamos únicamente el exón 11 de *c-KIT*

(eliminando las duplicaciones del exón 9) de un 67% de progresión pasamos al 40% con valores similares a otras series^{66, 261}. El siguiente tipo de mutación con mayor progresión en nuestra serie han sido las deleciones y los casos con mutación puntual han presentado un 27% de progresión ($p < 0,0001$). No hemos podido confirmar los resultados de otros autores donde asocian mayor agresividad a las deleciones vs. las mutaciones puntuales en el estómago pero no en el intestino delgado^{26, 66, 254}. Al igual que el grupo de Miettinen^{40, 41} que al analizar por separado la localización en el estómago e intestino delgado tampoco muestran diferencias significativas por lo que respecta a las mutaciones y la localización.

También hemos querido analizar la asociación entre la presencia de la delección 557-558 en el exón 11 de *c-KIT* y una peor progresión como reflejan Wardelmann y Martín en sus respectivos artículos^{152, 196}. Así hemos encontrado que un 46% de los casos con delección 557-558 han progresado ($p = 0,022$), además, de manera aislada, también se ha observado una significación directa entre la progresión y la presencia de dichos codones ($p = 0,010$ y $p = 0,002$); y los casos que han presentado delección en el codón 557 más la mutación puntual en el codón 558 tienden a una mayor progresión ($p = 0,05$). En base a estos hallazgos podríamos defender que más que la presencia de delección 557-558, lo que se asocia a una mayor progresión tumoral, sería la alteración en alguno de estos dos codones. Incluso al analizar la progresión de los casos con cualquiera de los tres codones más afectados (557, 558 y 559) se encuentra un 50% de progresión ($p = 0,009$).

No obstante en estos últimos años la EORTC^{161, 281-283}, entre otros²⁵⁷, está realizando ensayos con diferentes grupos de GIST; ya que hasta ahora el **Glivec** se da en estadios muy avanzados de la enfermedad con metástasis o recaídas no operables y quizás no resulta tan efectivo como si se utilizará como un fármaco adyuvante que pudiera incluso llegar a evitar posibles recaídas o metástasis antes de que se produjeran. Hay además que tener en cuenta que el tratamiento con Glivec es relativamente frecuente y aún no se conocen muy bien las consecuencias de su uso a largo plazo, está clara la toxicidad, pero al ser un fármaco de última generación no se sabe que ocurrirá con pacientes que

lleven mucho tiempo en tratamiento; lo que sí se sabe con seguridad en los pacientes que tienen que abandonar el Glivec los tumores progresan muy rápidamente. Un tratamiento alternativo al Glivec es un nuevo fármaco llamado **Sunitinib**, que ya se está utilizando en pacientes que no toleran el Glivec o que presentan mutaciones resistentes a Glivec. En nuestra serie cuatro pacientes debieron abandonar el Glivec por intolerancia al fármaco; dos de los cuales fueron tratados con Sunitinib, sin embargo los cuatro pacientes fallecieron a causa de la enfermedad.

Se ha analizado tanto en estudios in vitro como en series clínicas la eficacia del Glivec según el gen mutado, el exón y el tipo de mutación^{21, 284, 285}. Observándose, en general, una mejor respuesta en los casos mutados en *c-KIT* en el exón 11 vs. el exón 9 y los no mutados^{161, 180}; incluso se ha documentado que pacientes con una duplicación en el exón 9 de *c-KIT* podrían necesitar una mayor dosis de Glivec (800mgr/día)¹⁶¹. En nuestra serie no hemos podido diferenciar una mejor respuesta en el exón 11 vs. el 9 o casos no mutados, debido a que la serie se compone de casos tratados en fases muy avanzadas del tumor por lo que no podemos apreciar diferencias significativas de respuesta. No obstante, comparativamente, aquellos casos con duplicación en el exón nueve han presentado peor evolución y peor respuesta al Glivec que los casos mutados en el exón 11. También hemos observado muy poca respuesta al Glivec en los casos no mutados, de un total de cinco casos no mutados tratados con Glivec cuatro han fallecido. Recientemente, un estudio in vitro muestra que mutaciones extrañas como Val559Ile inducen, en contraste con la mutación común Val559Asp, activación constitutiva de *c-KIT* resistente a Glivec²⁸⁶. Un caso nuestro ha presentado una mutación poco frecuente Val559Gly, este caso había sido clasificado de bajo riesgo pero falleció al poco tiempo, por lo que aunque no podemos confirmar la no respuesta al Glivec del estudio in vitro ya que este paciente no recibió tratamiento, pero sí podemos constatar un comportamiento clínico adverso de un GIST de muy bajo riesgo, con la mutación Val559Gly.

Se ha descrito que los casos portadores de la mutación Asp842Val en el gen *PDGFR α* son resistentes al tratamiento con Glivec^{161, 176, 180}. En nuestros

casos un único portador de dicha mutación ha sido tratado con Glivec, confirmando los hallazgos de otros autores, ya que en menos de un año falleció sin responder al tratamiento. La mutación Asp842Val es equivalente en *c-KIT* a la Asp816Val, la cual también es resistente al Glivec y ha sido descrita, además de en los GISTs, en la mastocitosis^{112, 287}. Ambas mutaciones conservan el mismo residuo de ácido aspártico en el loop de activación de la quinasa, sugiriendo una base común en la resistencia al Glivec en *c-KIT* y *PDGFRα*²⁸⁷. Las mutaciones en los exones 13 de *c-KIT* y 12 de *PDGFRα* son sensibles a Glivec in vitro y se ha demostrado una respuesta clínica¹⁸⁰; no contando en nuestro estudio con ningún caso mutado en estos exones y tratado.

Además de las mutaciones primarias con resistencia adquirida a Glivec, la principal causa de la ineficacia del Glivec es la adquisición de **mutaciones secundarias** en el transcurso del tratamiento con dicho fármaco. La gran mayoría de estas mutaciones se localizan en *c-KIT* sobretodo en los dominios TK^{172-174, 288, 289} codificados por los exones 13 y 17; pero también se han descrito mutaciones secundarias en el gen *PDGFRα*, sobretodo la mutación puntual Asp842Val¹⁷⁶. En nuestro estudio ha habido dos casos que han adquirido una mutación secundaria durante el tratamiento con Glivec. Uno con una mutación en el exón 11 de *c-KIT* (delección de los codones 554 al 559) que adquirió la segunda mutación en el exón 17 (mutación puntual en el codón 823D con cambio de aminoácido de valina a ácido aspártico), siendo una de las mutaciones secundarias más descritas en la literatura^{172, 173, 288, 289}. Sin embargo, el segundo caso se encontraba mutado en el exón 9 de *c-KIT* (duplicación del codón 502-503) y posteriormente, adquirió una mutación en el exón 11 de *c-KIT* (delección de los codones 551 al 556 más mutación puntual del codón 557 con cambio de aminoácido de triptófano a arginina), no siendo nada habitual en la literatura esta mutación secundaria. Estudios estructurales han demostrado que tanto las mutaciones primarias como las secundarias en *c-KIT* se encuentran en el mismo alelo^{33, 176}. En nuestra serie no podemos confirmar estos hechos debido a que para la detección realizamos una PCR y posteriormente secuenciamos bidireccionalmente sin saber cuál es el alelo portador de la mutación. En nuestro estudio ha habido un posible tercer caso de doble mutación, que presentó en el exón 11 de *c-KIT* una delección que

abarca desde los codones 553 al 555 y una posterior delección en el codón 561. Este caso podría presentar cada mutación en un alelo diferente y por eso se observan las dos mutaciones o incluso podría haber adquirido una segunda mutación en la evolución del paciente ya que recayó y metastatizó en poco tiempo, siendo tratado con Glivec y respondiendo parcialmente.

De toda la serie global de 175 casos, 28 no han expresado c-KIT a nivel inmunohistoquímico, no siendo GIST finalmente 15 de ellos. Entre estos casos que han sido descartados de GISTs, se encuentra un **pólipo fibroide inflamatorio** (PFI) al cual se le realizó el estudio de mutaciones en *PDGFR α* y *c-KIT*, detectando una delección de los codones 567-571 más una mutación puntual en el codón 566 con cambio de aminoácido (serina-arginina) en el exón 12 de *PDGFR α* , después de un exhaustivo estudio tanto a nivel inmunohistoquímico como de biología molecular se concluyó que era un pólipo fibroide inflamatorio con una mutación en el exón 12 de *PDGFR α* ²⁹⁰. Este resultado se confirma con una serie de 23 PFIs, donde incluso se encuentra descrita la misma mutación ²⁹¹ y un caso aislado de otro autor ²⁹². Además, en la literatura encontramos entidades diferentes a los GIST portadoras de mutaciones tanto en *PDGFR α* como en *c-KIT*, como por ejemplo sarcomas sinoviales ²⁹³, disgerminomas ²⁹⁴, sarcomas de Ewing ²⁹⁵, melanomas ²¹⁰ y seminomas ²⁹⁶ entre otros. Estos hallazgos nos demuestran que dado las diferencias de progresión y malignidad entre las neoplasias mutadas en *PDGFR α* y *c-KIT* debe haber otras alteraciones genéticas implicadas en las vías de progresión tumoral ^{46, 257, 291}.

El marcador más sensible que diferencia a los GISTs de otras neoplasias gastrointestinales mesenquimales es c-KIT (CD117)^{17, 46}. Sin embargo, un pequeño grupo de GISTs no expresan inmunohistoquímicamente c-KIT (4-6%) ^{63, 297, 298}. En nuestra serie ha habido trece GISTs negativos para c-KIT (9%), siendo el porcentaje superior a otras series a causa de los casos consulta, y en los que ha sido posible un diagnóstico diferencial con otras neoplasias gracias a la histología y el empleo de los marcadores complementarios (CD 34, SMA, S-100, desmina) ^{22, 63}. Recientemente, se están utilizando nuevos marcadores como el PKC θ ^{80, 299, 300} y DOG1 ^{82-84, 301}, los cuales son más específicos y sensibles que c-KIT, pudiendo incluso llegar a sustituirlo según algunos

autores. En nuestro estudio no han sido empleados pero puede ser muy interesante su utilidad en los GISTs c-KIT negativos de dudoso diagnóstico. Pero además, el análisis mutacional ha sido determinante en algunos casos para el correcto diagnóstico de GIST como ya había ocurrido en otros estudios^{20, 22, 187}. En nuestra serie de los 13 casos c-KIT negativos 7 eran pacientes masculinos y seis femeninos, mientras que en series como la de Medeiros hay una predominancia masculina^{63, 298}. Obtenemos una mediana de edad de 56 años (rango de 36-74), como el resto de series^{63, 297, 298, 302}. Al comparar las edades entre los casos negativos y positivos para c-KIT se observa como los casos c-KIT negativos se presentan en edades comprendidas entre los 36-70, no presentándose ningún caso en edades inferiores a 36 y muy pocos casos en edades superiores a 71 ($p=0,018$), hallazgos que no hemos podido confirmar con otros estudios. La localización mayoritaria ha sido el estómago como en otras series^{63, 298} y aunque Medeiros además observa que un porcentaje elevado de casos negativos presentan una localización extragastrointestinal⁶³, no es así ni en nuestra serie ni en otras previas^{297, 298, 302}. La mediana de tamaño en nuestra serie ha sido de 9 cm (Rango: 1-18) coincidiendo con la serie de Medeiros⁶³ y una mediana de índice mitótico de 4 (Rango de 0-53) similar a los resultados obtenidos por el grupo de Kontogianni-Katsarou²⁹⁸. Presentando, tanto en nuestro estudio como en otros, histología indistinguible de los GISTs positivos^{17, 63}. No obstante y contrariamente al resto de series donde la gran mayoría de casos presentan histología epitelioide^{63, 297, 298, 302}; la histología predominante en nuestro estudio ha sido la fusocelular con 8 casos, seguida del patrón mixto con tres y dos epitelioides y al igual que la serie de Medeiros⁶³, la gran mayoría de casos (9 de 13) han sido clasificados de alto riesgo. Del total de los 13 casos negativos, cuatro han presentado recaídas, tres metástasis y dos han fallecido. Además, en nuestra serie cuando hemos comparado los casos c-KIT negativos con los casos positivos, hemos observado como los casos c-KIT negativos han progresado en un 78% en comparación con los positivos (37%) ($p=0,016$), hecho que puede deberse a que los casos c-KIT negativos no eran tratados con Glivec por la ausencia de expresión proteica¹⁷, otro de los motivos que justifica el análisis mutacional. Estos resultados son totalmente contradictorios a los observados por Kontogianni-Katsarou y cols.²⁹⁸ donde observan factores de buen pronóstico,

menor progresión y una mayor supervivencia en los casos c-KIT negativos. Hemos observado como los casos c-KIT negativos han expresado en menor proporción, en comparación con los casos c-KIT positivos, el marcador CD34 (42% vs. 70,3%) ($p=0,043$); por lo que es fundamental además de un estudio exhaustivo con marcadores inmunohistoquímicos, el análisis mutacional de *c-KIT* y *PDGFR α* e incluso si es necesario el inmunoblotting, FISH o cariotipo. En nuestros casos negativos para c-KIT se han descrito 6 mutaciones, cuatro en *c-KIT* y dos en *PDGFR α* ; a diferencia de los resultados obtenidos en las series de Medeiros⁶³ y Debiec-Rychter²⁹⁷ donde la inmensa mayoría de mutaciones se localizan en el gen *PDGFR α* . En la serie hay dos mutaciones puntuales en el codón 842 en estos casos, la no expresión de c-KIT podría deberse a la sustitución oncogénica de *PDGFR α* por *c-KIT*, produciendo una regulación negativa hacia la expresión de c-KIT. Lo que no está claro es la ausencia de expresión de los casos mutados en *c-KIT*, cómo puede ser que las células de los GISTs seleccionen la mutación genómica de *c-KIT* en ausencia del producto de la proteína funcional del gen. Cabría la posibilidad de que la delección del C-terminal, que contiene el epítipo de unión del anticuerpo de c-KIT de DAKO, produzca un falso negativo; en nuestra serie las tres delecciones descritas en el exón 11 de *c-KIT* implican muchos codones por lo que podrían estar en consonancia con esta hipótesis si no fuera porque en otras series se ha demostrado la negatividad también en el inmunoblotting. En nuestra serie ha habido siete casos negativos para c-KIT que han sido GISTs sugiriendo que tiene que haber otros mecanismos oncológicos alternativos. No se sabe a qué puede deberse esta negatividad por lo que son necesarios más estudios y análisis exhaustivos de más genes para saber que mecanismos alternativos usan los GIST en ausencia de la expresión de c-KIT; recientemente se ha demostrado la implicación de IGF1R en los GISTs “wild type”^{107, 303, 304}.

5.5- EN RELACIÓN CON LOS HALLAZGOS DEL ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA.

Hemos realizado el **análisis de supervivencia** en aquellos casos en los que disponíamos de toda la evolución del tumor, siendo finalmente un total de 111 enfermos. Hemos obtenido una supervivencia a los 5 años del 45% de casos y con una mediana de seguimiento de 52 meses y un rango de 1 mes a 244,9 meses. De los 111 GIST de la serie han recidivado 30 (27%), han metastatizado 32 (29%) y han fallecido a causa del tumor 36 (32%).

En los estudios poblacionales de un gran número de casos, los valores de supervivencia y seguimiento varían mucho según la serie seleccionada. Por ejemplo la serie de 200 casos de De Matteo presenta una supervivencia a los 5 años inferior a la nuestra (35%) y un tiempo de seguimiento de 14 meses ⁴³; no siendo ningún caso tratado con Glivec. Un estudio islandés realizado por Tryggvason y cols. presenta una mediana de seguimiento (51 meses) y una supervivencia a los 5 años (53,9%) muy parecidas a las nuestras ²⁰⁰. Sin embargo, el estudio poblacional de Italia realizado por Mucciarini y cols. presentan un mayor número de meses de seguimiento (63 meses) y una mayor supervivencia a los 5 años (65,8%) ²⁹.

En la mayoría de los estudios se analiza la supervivencia pero no el intervalo libre de recaídas, metástasis o progresión. En nuestro estudio queríamos realizar un análisis detallado de todos los parámetros de los que disponíamos y su posible implicación en la evolución tumoral. Anteriormente han quedado reflejados los resultados más significativos obtenidos para el intervalo libre de progresión (ILP), pero también se ha realizado el análisis del intervalo libre de recaídas (ILR) y metástasis (ILM). Prácticamente los parámetros significativos en ILR también lo han sido para ILM y por consiguiente son englobados dentro del ILP (el cual tiene en cuenta el primer evento que se produce en la evolución del tumor). Sin embargo, cabe destacar que la edad de diagnóstico ($p=0,0297$) y la resección completa del tumor ($p=0,0014$) han sido parámetros significativos en ILP pero no en ILM. Y por el contrario, parámetros como la necrosis ($p<0,0001$), el pleomorfismo ($p=0,0179$) y el marcador Ki-67 ($p=0,0004$) han sido significativos para el ILM pero no para el ILR. A nivel de biología molecular

la presencia de delección de los codones 558 ($p=0,0124$) y 559 ($p=0,0306$), además de la presencia de mutaciones en los codones 557,558 y 559 ($p=0,0408$) y la mutación puntual del codón 557 más delección del codón 558 ($p=0,0349$) han sido significativos en el ILM pero no en el ILR.

En la mayoría de series no se observa una influencia del sexo, raza o edad con respecto al intervalo libre de progresión (ILP); a excepción de algún artículo aislado como el de Steigen y cols.³⁰⁵, o Tryggvason y cols.²⁰⁰ y nuestra serie. Observando en nuestros resultados un mayor porcentaje de **ILP** en aquellos casos con **edades** superiores a los 70 años ($p=0,0103$); siendo el rango comprendido entre 35 a 50 años el que mayor número de progresiones ha presentado.

Uno de los parámetros más importantes para la no progresión del tumor es la **exéresis quirúrgica completa del tumor**; pudiendo realizarse en casos con enfermedad localizada; pero no en aquellos que presentan metástasis de inicio. No obstante entre el 10 al 50% de los pacientes con una resección completa progresan, dependiendo mucho de la cohorte de estudio^{43, 212, 306}. En nuestro trabajo el intervalo libre de progresión en los casos en los que se sabe ciertamente que no se ha realizado la resección completa ha sido del 38% en comparación con el 68% de ILP en los casos con resección completa del tumor ($p=0,038$). Además cabe destacar que hemos obtenido una gran significación entre los casos tratados con Glivec y los que no respecto al ILP ($p<0,0001$), ya que los casos que progresan son tratados con Glivec desde la introducción de éste como inhibidor de la actividad tirosina quinasa^{21, 247, 307, 308}; y en nuestro estudio hemos incluido casos anteriores a la era del Glivec por lo que el porcentaje de progresión en el grupo de no tratados puede ser superior a lo esperable.

El parámetro pronóstico por excelencia consensuado por la “National Institute of Health” (NIH) es el tamaño tumoral conjuntamente con las mitosis¹⁷. Constituyéndose estos dos parámetros los más fáciles en cuanto a criterios patológicos para predecir el riesgo de recurrencia al combinarlos. Hay un gran número de estudios que observan un mayor porcentaje de progresión en

aquellos casos que presentan un gran tamaño; ya sea en tumores mayores de 5 cm.^{159, 309-311} ó de 10 cm.^{43, 196, 200, 312, 313}. Además el tamaño tumoral es un factor de pronóstico en la supervivencia en el análisis multivariable y los pacientes con tumores mayores a los 10 cm. tienen un riesgo de 2,5 mayor (95% confidence interval 1,2-5,5) y sólo una supervivencia del 20% en 5 años. En otras series como las del M.D Anderson Cancer Centre con seguimientos mucho más largos los hallazgos son similares³¹⁴. En nuestro estudio analizamos el **tamaño** en una distribución de cuatro grupos (<2cm./5cm./ 6-10cm. />10cm.)(p=0,0163) y de dos (<5cm. / >5cm.)(p=0,0014); observando que el punto de corte más significativo sería el de mayor vs. menor de 5cm. ya que por debajo de 5 cm. el ILP es superior al 80% y disminuye al 53% en los casos con un tamaño comprendido entre los 6-10cm y a un 49% en casos superiores a los 10cm.

Debido a que hay tumores menores de 5cm que pueden llegar a metastatizar, se debe de tener en cuenta el segundo parámetro consensuado por el NIH: es decir el número de mitosis presentes en el tumor. Hay un gran número de estudios que han analizado las posibles implicaciones del número de mitosis en la progresión tumoral, presentando diferentes puntos de corte según el estudio. Trabajos como los de Kim y cols.¹⁵⁹, Steigen y cols.³⁰⁵, Mucciarini y cols.²⁹ y DeMatteo y cols.⁴³ observan como un índice mitótico superior a las 5 mitosis en 50 HPF es un parámetro asociado a la progresión tumoral. Sin embargo, en series como las de Ryu y cols.³¹¹, Martín y cols.¹⁹⁶ y Langer y cols.³⁰⁹ detectan que el punto de corte en la progresión tumoral se encuentra en índices mitóticos superiores a las 10 mitosis por 50 HPF e incluso Singer y cols.⁶² observan que aquellos casos que presentan menos de 25 mitosis en 50 HPF recurren en menor porcentaje. En nuestra serie siguiendo tanto la clasificación de mitosis utilizada por Fletcher¹⁷ como por Miettinen⁴¹ (p<0,0001) han presentado un intervalo libre de progresión del 76% cuando en la muestra tumoral había un índice mitótico inferior a 5 por 50 HPF, y éste disminuye a poco más de la mitad al presentar más de 5 mitosis en 50 HPF. Por lo que se puede considerar que un elevado índice mitótico predice una mayor malignidad en el tumor y un bajo índice mitótico no siempre garantiza un curso benigno

Con los dos parámetros anteriores, tamaño y mitosis se consensuó una clasificación de riesgo¹⁷ que la inmensa mayoría de estudios se analiza en relación con la progresión tumoral. Hay seis series de diferentes países de más de 100 casos que han encontrado una asociación entre la clasificación de Fletcher y el pronóstico tumoral^{28, 29, 60, 316-318}. No se obtienen grandes diferencias entre los grupos de muy bajo, bajo y riesgo intermedio pero sí con el grupo de alto riesgo en series como la de Tryggvason y cols.²⁰⁰, Martín y cols.¹⁹⁶ y Steigen y cols.³⁰⁵. Discrepando con los anteriores estudios, hemos obtenido unos intervalos libres de progresión prácticamente del 100% de los casos en el grupo de muy bajo y bajo riesgo; sin embargo, disminuye al 68% en el grupo intermedio y se observan grandes diferencias con respecto al grupo de alto riesgo donde es del 37%, lo que denota que al considerar la progresión la hemos de tener en cuenta en la clasificación de muy bajo/ bajo riesgo, intermedio y alto riesgo.

Recientemente en la clasificación de Miettinen se han unificado tres parámetros con un gran peso en la progresión tumoral: índice mitótico, tamaño y localización tumoral^{40, 41} para poder afinar en el pronóstico de los GISTs. En nuestra serie tanto el grupo de muy bajo como el de bajo riesgo han presentado un ILP cercano al 95%, el intermedio un 72% y el alto riesgo un 32%; sin que se hayan observado diferencias tan significativas entre los grupos de muy bajo y bajo riesgo y el intermedio, posiblemente porque los casos intestinales que en la clasificación de Fletcher han sido incluidos como de riesgo intermedio en la clasificación de Miettinen pasan al grupo de alto riesgo. No obstante no se han observado grandes diferencias entre estas dos clasificaciones, sin poder decantarnos por ninguna de las dos.

Los GISTs son en buena medida impredecibles por lo que se les ha denominado de “potencial maligno incierto” ya que se ha demostrado que casos clasificados de muy bajo o de bajo riesgo acaban progresando. Esto ha llevado a intentar encontrar otros parámetros que puedan aportar más información para la clasificación de malignidad.

Entre los nuevos parámetros que han sido estudiados por su posible implicación pronóstica se encuentra la **localización tumoral**, incluida como ya

hemos comentado en la clasificación de riesgo de Miettinen^{29, 43, 200, 311}. Los GISTs de menor tamaño suelen darse en el recto y estómago; mientras que los GISTs en el intestino delgado y colón se encuentran en estadíos muy avanzados^{183, 220}. La localización en el esófago suele ser maligna pero fundamentalmente por el avanzado estado en el que se diagnostica; sin embargo, GISTs esofágicos de pequeño tamaño con una escisión completa presentan muy buen pronóstico⁴², mientras que la localización extragastrointestinal, debido a su dificultad a la hora de extirpar el tumor completamente, tiende a progresar^{48, 237}. En nuestra serie no hemos obtenido una significación entre la localización del tumor y el intervalo libre de progresión; no obstante las localizaciones que más han progresado han sido la extragastrointestinal y el intestino grueso.

Otro parámetro que ha sido analizado en muchos estudios ha sido la **histología** del tumor. Singer y cols.⁶² encuentran que la histología que presenta mayor recurrencia es la mixta, seguida de la epitelioides, y por último la que mayor ILR presenta es la fusocelular. Del mismo modo, Fujimoto y cols.²³⁷ observan que la histología epitelioides es un factor pronóstico adverso. En nuestra serie hemos obtenido resultados diferentes ya que la histología que menor ILP presenta ha sido la mixta (32%), seguida de la variante fusocelular (63%) y la variante epitelioides que ha presentado más de un 83% con pronóstico favorable ($p=0,0004$), por lo que se comprueba que no hay un consenso en la literatura, a la hora de determinar qué tipo histológico es el más adverso por lo que se refiere a la progresión del tumor.

La **necrosis** en los GISTs también ha sido analizada por varios grupos^{224, 243, 280, 306}. Siendo un factor adverso en nuestra serie para la progresión tumoral ya que el ILP ha sido del 45% en los casos que la han presentado ($p=0,0001$).

El **pleomorfismo** nuclear es otro parámetro analizado en nuestra serie, presentando los casos con pleomorfismo más progresión ($p=0,032$). No ha sido un parámetro tan estudiado como los anteriores pero hay algunos estudios que confirman nuestros hallazgos²²⁴. Sin embargo, en otros el pleomorfismo no se considera un factor predictor de malignidad en GISTs²⁴⁴.

En la literatura encontramos que **c-KIT** es un marcador inmunohistoquímico de diagnóstico sensible para GISTs ya que es negativo para otros tumores mesenquimales incluidos los leiomiomas y schwannomas; que sin embargo no se puede usar como un índice pronóstico^{17, 241}. En nuestra serie se ha observado como los casos negativos para el marcador inmunohistoquímico c-KIT han presentado un ILP del 25% y por el contrario los casos positivos un 65%. Este hecho puede deberse, como ya se ha comentado anteriormente, a que en un principio los GISTs negativos inmunohistoquímicamente para c-KIT no eran tratados con Glivec presentando un mayor porcentaje de recaídas y de ahí la importancia de realizar el análisis molecular de los genes *c-KIT* y *PDGFRα*.

Una expresión elevada de **Ki-67** predice una mayor agresividad en GIST^{53, 241, 252}; además hay muchas series que observan una asociación entre la expresión de Ki 67 y la disminución del tiempo libre de progresión^{75, 252, 319, 320}. En nuestra serie se ha confirmado dicha asociación entre Ki-67 y el porcentaje libre de progresión: los casos negativos para el marcador han presentado más de un 82% de ILP; sin embargo, los casos con un índice proliferativo inferior al 5% han presentado un 56% de ILP y los casos con más del 5% de células teñidas un 43% ($p=0,0018$).

La expresión de p53 ha sido también ampliamente estudiada en muchas neoplasias humanas incluidos los GISTs, pero con conclusiones variadas^{53, 65, 68, 252, 321, 322}, sin que podamos apoyar ningún resultado anterior porque no hemos obtenido una significación en nuestro estudio empleando dicho marcador.

Se han realizado gran cantidad de estudios de los genes ***c-KIT*** y ***PDGFRα*** en GISTs, estableciendo las correspondientes asociaciones pronósticas de progresión y observando que los casos portadores de mutaciones en *c-KIT* presentan un mayor porcentaje de progresión^{62, 95, 145, 152, 159, 196}. Aunque también hay estudios como el de Corless y cols.¹⁴⁷ y Rubin y cols.¹⁴² en los que no encuentran una asociación entre las recurrencias y la presencia o tipo

de mutación. Los resultados obtenidos en nuestra serie confirman un mayor porcentaje de progresión en los casos mutados versus los no mutados ($p=0,0007$); esta asociación podría deberse como sugieren Kim y cols.¹⁵⁹ y Lasota y cols.²⁰ a que los GISTs mutados en *c-KIT* representan formas más agresivas, lo cual podría explicar la asociación con la progresión. Además, al analizar los exones mutados hemos apreciado un menor ILP en el exón 9 (14%), seguido de lejos por el exón 11 (50%) y con un gran ILP los casos no mutados (82%) ($p=0,002$), además hay trabajos que confirman nuestros resultados con un mayor potencial de progresión en el exón 9 de *c-KIT*, seguido por el exón 11^{154, 180, 261, 267, 313}. Sin embargo, hay un estudio de 145 casos de GIST con localización intestinal donde no se observan diferencias pronósticas entre los casos mutados en el exón 9 o el exón 11 de *c-KIT*, si bien este hecho puede deberse a la alta probabilidad de recaída y mortalidad según algunos autores de los pacientes con GIST localizados en el intestino delgado^{40, 41}.

La mayoría de estudios^{41, 159, 183, 196, 254, 323} observan que los casos portadores de deleciones en el exón 11 de *c-KIT* presentan menor porcentaje libre de progresión, más en concreto la deleción de los codones 557-558^{152, 196, 323} y por el contrario, los casos portadores de duplicaciones^{66, 261} y de mutaciones puntuales en el exón 11 de *c-KIT* son los de mayor porcentaje libre de progresión^{62, 159, 313}. Nuestros resultados difieren de estudios anteriores porque las deleciones más mutaciones puntuales en nuestra cohorte presentan un ILP del 25%, seguido de las duplicaciones 33%, y en tercer lugar las deleciones 43%, mientras que los casos con un mayor ILP han sido las mutaciones puntuales (73%) ($p=0,0007$). Estas diferencias respecto a otros estudios puede deberse a que en nuestra serie hay un gran número de casos en estados muy avanzados de la enfermedad.

Además, no hemos obtenido una significación de progresión en los casos portadores de la deleción de los codones 557-558 pero sí en aquellos casos que han presentado deleción del 557 más mutación puntual 558 ($p=0,0127$), deleción 559 ($p=0,0265$), deleción 558 ($p=0,004$), deleción 557 ($p=0,0621$) y

por consiguiente en los que han presentado mutación en cualquiera de los tres codones anteriores ($p=0,0127$).

Tampoco hemos obtenido una asociación entre el intervalo libre de progresión y los casos mutados en **homocigosis** como cabría esperar si se tiene en cuenta la teoría de que en la evolución tumoral (metástasis o recaídas) se produce la pérdida de un alelo o la ganancia de mutación en los dos alelos y por consiguiente la pérdida del alelo normal presentándose la mutación en homocigosis, en otras series sí que han observado una peor progresión en estos casos ^{162, 173, 266}.

Dependiendo del estudio realizado y del número de casos analizados se obtienen diferentes parámetros en el análisis multivariable para la progresión tumoral. DeMatteo y cols. ³¹³ han encontrado que el índice mitótico y la localización son parámetros independientes que predicen la recurrencia en los casos con resección completa. Martín y cols. ¹⁹⁶ apuntan como factores independientes de recurrencia el índice de alto riesgo, la elevada celularidad y la presencia de deleciones en los codones 557-558.

El grupo de Kim ¹⁵⁹ ha encontrado como parámetros asociados a peor pronóstico en el análisis multivariable un gran tamaño tumoral, un elevado índice mitótico y presencia de mutación en *c-KIT*.

En el estudio poblacional italiano obtienen como parámetro predictor de recurrencia en el análisis multivariable el alto riesgo histológico; y alternativamente el índice mitótico y un tamaño tumoral superior a los 10cm. ²⁹.

Singer y cols. ⁶² presentan como factores independientes de recurrencia la actividad mitótica superior a 15 mitosis en 30 HPF, la histología mixta, presencia de deleción/inserción en el exón 11 de *c-KIT* y el sexo masculino.

Keun y cols. ³²³ en su estudio de 93 casos de alto riesgo detectan como parámetros de mal pronóstico en la recurrencia el estadio de la enfermedad, el tipo de resección y el género masculino.

En nuestra serie, los parámetros independientes en el **análisis multivariable** han sido la **clasificación de alto riesgo de Fletcher**, la **histología fusocelular**, la **positividad** del marcador inmunohistoquímico **Ki-67** y la **presencia de la mutación en *c-KIT***.

Debido a que nuestra cohorte ha sido muy heterogénea hemos calculado la supervivencia global de toda la serie para poder establecer aquellos parámetros que peor pronóstico han presentado, pero también hemos realizado el análisis de supervivencia a los casos no tratados frente a los tratados con Glivec. Los parámetros de mal pronóstico en la serie global y los casos no tratados han sido prácticamente idénticos (resección completa o no del tumor, índice mitótico, clasificación de riesgo de Fletcher y marcador Ki-67); no obteniendo ninguna significación en los parámetros analizados de biología molecular. Sin embargo, en los casos tratados con Glivec los parámetros pronósticos de adversidad en la supervivencia han sido la resección completa, la clasificación de riesgo de Miettinen, presencia de mutación en el gen *c-KIT*, el exón y tipo de mutación, y la presencia de la delección de los codones 557-558. Con estos resultados se pone de manifiesto la importancia del análisis de los genes *c-KIT* y *PDGFRα* en los casos tratados con Glivec para predecir una menor supervivencia y el peso pronóstico de los parámetros anatomopatológicos en los casos no tratados con Glivec para la supervivencia.

El **sexo** masculino ha sido reportado como un parámetro adverso en la supervivencia en diversas series^{27, 43, 97, 237}, no siendo así en la nuestra.

En nuestros análisis de supervivencia de la serie global hemos observado que uno de los parámetros más importantes ha sido la **resección quirúrgica completa** del tumor; ya que aquellos casos en los que se ha realizado la resección completa presentan supervivencias del 76%; y en los que no está es del 27% ($p=0,0002$). Los mismos hallazgos son destacados en los estudios de Bucher y cols.¹⁰¹, Lin y cols.²²⁴, DeMatteo y cols.⁴³ y Pierie y cols.²²³.

En aquellos casos que han sido tratados con **Glivec**, dado que es la terapia más efectiva después de la resección quirúrgica, cabe esperar una supervivencia mayor frente los casos no tratados. No es así debido a que el Glivec se administra en aquellos casos que evolucionan muy desfavorablemente y presentan recaídas y metástasis no operables; con una supervivencia del 52% en los casos que han sido tratados con Glivec y del 76% en los no tratados ($p=0,0358$). Recientemente se está estudiando el papel

neoadyuvante y adyuvante del Glivec en los GISTs en diferentes momentos de la progresión tumoral para determinar el papel terapéutico del Glivec y establecer el mejor manejo del mismo para una mayor supervivencia de los pacientes³²⁴⁻³²⁸.

No hemos obtenido una asociación entre la supervivencia y el **tamaño** tumoral ($p=0,0742$) pero aquellos casos con un tamaño inferior a los 5 cm. han presentado una supervivencia del 81% y aquellos con un tamaño superior a los 5 cm. un 65% y además sí que hay muchos estudios^{27, 329} donde se observa una asociación muy fuerte entre el tamaño tumoral y la supervivencia; sobretodo, en tumores con un tamaño superior a los 10 cm^{43, 224, 237, 243, 312, 330}.

Tampoco hemos observado una asociación entre la **localización** del tumor y la supervivencia global, resultado que está en consonancia con otros estudios previos^{28, 43, 46, 329, 331}. Sin embargo, sí hay trabajos que observan una mayor supervivencia en los casos localizados en el estómago^{97, 102, 332}. Los GISTs localizados fuera del estómago pueden crecer asintóticamente más tiempo presentando un pronóstico más adverso al ser diagnosticados en estadios más avanzados⁵².

En nuestro estudio la supervivencia ha mostrado grandes diferencias entre aquellos casos que presentan menos de 5 mitosis en 50 HPF (83%) y los de más de 5 mitosis (48%) ($p=0,0007$), resultados similares a los observados en otras series como la de Steigen y cols.²⁶, Imamura y cols.³²⁹, Wu y cols.³¹⁹.

Tanto la **clasificación de riesgo** según los **criterios de Fletcher** como los de **Miettinen** han presentado una asociación con la supervivencia ($p=0,0004/p=0,0237$); los porcentajes de supervivencia entre los grupos de riesgo de muy bajo, bajo e intermedio han sido muy similares (84-94%), observando mayor diferencia con el grupo de alto riesgo ($\approx 50\%$), al igual que ocurre en otras series^{29, 60, 224, 329, 333}, basadas en la clasificación de NIH (Fletcher). No obstante, hay series como la de Rutkowski y cols.⁹⁷ que sí observan grandes diferencias entre los grupos de muy bajo y bajo y el de riesgo intermedio; sin embargo, estudios poblacionales como los de Suecia²⁸ e Islandia²⁰⁰ sólo detectan un 25% de casos clasificados de alto riesgo y por consiguiente presentan una mayor supervivencia. Estos estudios reflejan más

correctamente la verdadera incidencia y distribución que series institucionales como la nuestra, donde hay un mayor número de casos en estadios muy avanzados.

Otro parámetro asociado a una menor supervivencia ha sido la **presencia de necrosis** tumoral ($p=0,0134$), que ya se destaca como factor de mal pronóstico en series como la de Yan y cols.²⁴³, Fujimoto y cols.²³⁷.

En nuestro estudio el único marcador inmunohistoquímico que ha presentado una asociación con la supervivencia en la serie global ha sido el **Ki-67** ($p=0,033$). Al igual que ocurre en otras series^{28, 237, 243, 329, 334, 335} al comparar los resultados obtenidos con Ki-67 y el índice mitótico hemos observado una mayor significación en las mitosis, aunque siguen siendo ambas técnicas complementarias en el diagnóstico y pronóstico de cada caso.

DeMatteo y cols.⁴³ muestran como parámetros pronósticos adversos en el análisis multivariable el sexo masculino, un tamaño tumoral superior a 5cm y la resección incompleta del tumor.

La serie poblacional de Mucciarini y cols.²⁹ se refiere como factor pronóstico relacionado con la supervivencia el alto riesgo según el NIH, y por consiguiente los dos parámetros que simplifica la clasificación de riesgo: el índice mitótico superior a 5 mitosis en 50 HPF y el tamaño tumoral superior a los 10 cm.

En el estudio poblacional de Nilsson y cols.²⁸ destacan dos parámetros de pronóstico independiente en la supervivencia de los GISTs: el índice proliferativo estimado con Ki-67 y con el tamaño tumoral.

El grupo de Hassan⁶⁰ sin embargo, recoge factores diferentes, observando una disminución de la supervivencia en la regresión de Cox en presencia de GISTs de alto riesgo, presentación sintomática y localización en el intestino delgado.

Keun y cols.³²³ presentan como parámetros favorables para un descenso del riesgo de fallecimiento un índice mitótico bajo y la presencia de mutación en *c-KIT*.

En el estudio realizado por Rutkowski y cols.⁹⁷ se han identificado como factores adversos en el análisis multivariable: más de 5 mitosis en 50 HPF, tamaño tumoral superior a 5 cm., sexo masculino, una resección no completa o ruptura del tumor y localización primaria fuera del estómago.

En el análisis multivariable realizado por Fujimoto y cols.²³⁷ en una serie de GISTs gástricos se observa que el sexo masculino, tamaño tumoral mayor de 10 cm. presencia de celularidad epitelioides y un índice mitótico superior a 10 mitosis son indicadores estadísticamente significativos de peor pronóstico para la supervivencia.

En nuestro estudio hemos obtenido como **parámetros independientes** para la supervivencia en la serie global, la **resección completa del tumor** y el **índice mitótico inferior a 5 mitosis** por 50 HPF. Los mismos parámetros hemos obtenido en los casos no tratados con Glivec.

Cabe destacar la significación observada en los estudios de la biología molecular en los casos tratados con Glivec donde sólo el 20% de los casos no mutados sobreviven frente a un 58% de mutados en *c-KIT* ($p=0,0163$). Keun y cols.³²³ observan que la presencia de mutación en *c-KIT* es un indicador de buen pronóstico en la supervivencia, hecho que puede deberse a que los casos mutados en el exón 11 de *c-KIT* responden mejor a la terapia con Glivec. En nuestro estudio no ha habido diferencias significativas respecto a la supervivencia según el exón afectado, hay un porcentaje inferior en los casos mutados en el exón 9 pero ha sido mínimo respecto a los mutados en el exón 11 de *c-KIT*. Por el contrario, Debiec-Rychter y cols.¹⁶¹ y Heinrich y cols.¹⁸⁰ han observado que las mutaciones en el exón 9 son las que peor supervivencia presentan, superando a los casos no mutados, e incluso recomiendan una mayor dosis de Glivec para dichos casos.

Sin embargo, sí que hemos observado una asociación entre el tipo de mutación y la supervivencia. Destacando que los casos con mutaciones puntuales han presentado una supervivencia del 100% de casos, seguidos por 58% de deleciones, un 43% de duplicaciones (ya que se incluyen conjuntamente las localizadas en el exón 9 y 11) y aquellos casos portadores de una deleción más mutación puntual que han sido los que menos supervivencia han presentado con un 33% ($p=0,0757$). En el análisis multivariable para los casos tratados con Glivec ha destacado como parámetro independiente favorable de supervivencia la presencia de la deleción de los codones 557-558.

VI. CONCLUSIONES

El análisis anatómico-clínico, histológico, inmunohistoquímico, genético y pronóstico de 175 casos de neoplasias gastrointestinales incluíbles dentro del contexto de los llamados “tumores del estroma gastrointestinal (GIST)” nos han permitido obtener las siguientes conclusiones:

1.- El tamaño tumoral, de más de 5cm, e índice mitótico, de más de 5 mitosis por 50 HPF, son factores adversos en la progresión y están asociados a otros factores de mal pronóstico como presencia de necrosis, pleomorfismo nuclear, localización extragastrointestinal y resección incompleta. No obstante, aunque estos parámetros predicen una mayor malignidad su ausencia no garantiza un curso clínico benigno.

2.- La localización extragastrointestinal (EGISTs) presenta una evolución más desfavorable que el resto de localizaciones de los GISTs, seguida del colón e intestino delgado.

3.- Otros factores adversos que ayudan a predecir con mayor exactitud la malignidad del tumor son la presencia de necrosis, el pleomorfismo nuclear y la histología tumoral. Este último parámetro tiene valor pronóstico independiente.

4.- El anticuerpo c-KIT (CD117) es un marcador esencial para el diagnóstico de GISTs, sin embargo, en los casos GIST c-KIT negativos, el análisis mutacional de *c-KIT* y *PDGFR α* constituye una herramienta importante de confirmación diagnóstica.

5.- La determinación inmunohistoquímica de Ki-67 es un parámetro complementario del índice mitótico y constituye un factor pronóstico independiente tanto para supervivencia libre de progresión como para supervivencia global.

6.- Las mutaciones de *c-KIT* o *PDGFR α* son un evento precoz y mutuamente excluyente en la patogénesis de los GIST. Sin embargo, no son mutaciones exclusivamente asociadas con los GIST, apareciendo también mutaciones en

otras neoplasias, aunque de modo ocasional, como son los pólipos fibroides inflamatorios, los sarcomas sinoviales o melanomas.

7.- La presencia de mutación en *c-KIT* es un factor adverso en la progresión del tumor en la serie global. Sin embargo, aquellos casos portadores de mutación en *c-KIT* son más sensibles al tratamiento con Glivec.

8.- Las mutaciones en el exón 9 de *c-KIT* presentan peor pronóstico asociándose a una mayor progresión. Por el contrario, las mutaciones del exón 11 de *c-KIT* se asocian a un pronóstico más favorable.

9.- El tipo de mutación con mejor pronóstico en nuestra serie ha sido la mutación puntual mientras que la delección intersticial asociada a una mutación puntual se asocia a peor pronóstico.

10.- Los codones más frecuentemente mutados en este estudio son el 557, 558 y 559. La alteración en el codón 558 es la que más frecuentemente se asocia a parámetros de progresión y de pronóstico desfavorable.

11.- Una baja proporción de casos presentaron mutaciones de *c-KIT* en homocigosis. La presencia de alteraciones génicas en homocigosis se pueden considerar como marcador adverso adicional en GIST.

12.- Una escisión quirúrgica total es el tratamiento selectivo de los GISTs; induciéndose aumento de progresión y menor supervivencia en aquellos pacientes que no son sujetos a esta técnica o en los que la resección tumoral fue incompleta.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Herrera G: Historical perspective: a journey through evolution of classification schemes., in US-CAP Companion Meeting Syllabus. 2003, p.1-6
2. Stout AP: Bizarre smooth muscle tumors of the stomach, *Cancer* 1962, 15:400-409
3. Mazur MT, Clark HB: Gastric stromal tumors. Reappraisal of histogenesis, *Am J Surg Pathol* 1983, 7:507-519
4. 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, 29:275-284
5. Barker PEB, P; Ruddle, F.H: Human c-kit oncogen on human chromosome 4., *Am. J.Hum. Genet.* 1985, 37:A1431.
6. Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T, Coussens L, Munemitsu S, Dull TJ, Chen E, Schlessinger J, Francke U, Ullrich A: Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand, *Embo J* 1987, 6:3341-3351
7. d'Auriol L, Mattei MG, Andre C, Galibert F: Localization of the human c-kit protooncogene on the q11-q12 region of chromosome 4, *Hum Genet* 1988, 78:374-376
8. Mattei MGdA, L.; Andre, C.; Passage, E.; Mattei, J. F.; Galibert, F. : : Assignment of the human c-kit proto-oncogene to the q11-q12 region of chromosome 4, using in situ hybridization, *Cytogenet. Cell Genet.* 1987, 46: 657,:
9. 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, 152:1259-1269
10. Min KW, Sook Seo I: Intestinal cells of cajal in the human small intestine: immunochemical and ultrastructural study, *Ultrastruct Pathol* 2003, 27:67-78
11. Maeda H, Yamagata A, Nishikawa S, Yoshinaga K, Kobayashi S, Nishi K: Requirement of c-kit for development of intestinal pacemaker system, *Development* 1992, 116:369-375
12. Wang XY, Sanders KM, Ward SM: Intimate relationship between interstitial cells of cajal and enteric nerves in the guinea-pig small intestine, *Cell Tissue Res* 1999, 295:247-256
13. Thuneberg L: Interstitial cells of Cajal: intestinal pacemaker cells?, *Adv Anat Embryol Cell Biol* 1982, 71:1-130
14. 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, 11:728-734
15. Wang L, Vargas H, French SW: Cellular origin of gastrointestinal stromal tumors: a study of 27 cases, *Arch Pathol Lab Med* 2000, 124:1471-1475
16. Kodaira C, Kikuyama M, Matubayashi Y, Yamada T, Sumiyoshi S, Kageyama F, Nishihira T, Inoue A, Kitanaka H, Sasaguri Y, Hanai H: [A case of GIST with rapid growth caused by internal hemorrhage], *Nippon Shokakibyō Gakkai Zasshi* 2002, 99:941-945
17. Fletcher CD, Berman JJ, Corless C, Gorstein F, Lasota J, Longley BJ, Miettinen M, O'Leary TJ, Remotti H, Rubin BP, Shmookler B, Sobin LH, Weiss SW: Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: A consensus approach, *Hum Pathol* 2002, 33:459-465
18. Kitamura Y, Hirota S, Nishida T: Gastrointestinal stromal tumors (GIST): a model for molecule-based diagnosis and treatment of solid tumors, *Cancer Sci* 2003, 94:315-320
19. Nakahara M, Isozaki K, Hirota S, Miyagawa J, Hase-Sawada N, Taniguchi M, Nishida T, Kanayama S, Kitamura Y, Shinomura Y, Matsuzawa Y: A novel gain-of-

function mutation of c-kit gene in gastrointestinal stromal tumors, *Gastroenterology* 1998, 115:1090-1095

20. 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, 154:53-60

21. Joensuu H, Roberts PJ, Sarlomo-Rikala M, Andersson LC, Tervahartiala P, Tuveson D, Silberman S, Capdeville R, Dimitrijevic S, Druker B, Demetri GD: Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor, *N Engl J Med* 2001, 344:1052-1056

22. Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, McGreevey L, Chen CJ, Joseph N, Singer S, Griffith DJ, Haley A, Town A, Demetri GD, Fletcher CD, Fletcher JA: PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors, *Science* 2003, 299:708-710

23. Heinrich MC, Rubin BP, Longley BJ, Fletcher JA: Biology and genetic aspects of gastrointestinal stromal tumors: KIT activation and cytogenetic alterations, *Hum Pathol* 2002, 33:484-495

24. Heinrich MC, Blanke CD, Druker BJ, Corless CL: Inhibition of KIT tyrosine kinase activity: a novel molecular approach to the treatment of KIT-positive malignancies, *J Clin Oncol* 2002, 20:1692-1703

25. Wardelmann E, Hrychuk A, Merkelbach-Bruse S, Pauls K, Goldstein J, Hohenberger P, Losen I, Manegold C, Buttner R, Pietsch T: 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, 6:197-204

26. Steigen SE, Eide TJ, Wasag B, Lasota J, Miettinen M: Mutations in gastrointestinal stromal tumors--a population-based study from Northern Norway, *Apmis* 2007, 115:289-298

27. Steigen SE, Bjerkehagen B, Haugland HK, Nordrum IS, Loberg EM, Isaksen V, Eide TJ, Nielsen TO: Diagnostic and prognostic markers for gastrointestinal stromal tumors in Norway, *Mod Pathol* 2008, 21:46-53

28. Nilsson B, Bumming P, Meis-Kindblom JM, Oden A, Dortok A, Gustavsson B, Sablinska K, Kindblom LG: Gastrointestinal stromal tumors: the incidence, prevalence, clinical course, and prognostication in the preimatinib mesylate era--a population-based study in western Sweden, *Cancer* 2005, 103:821-829

29. Mucciariini C, Rossi G, Bertolini F, Valli R, Cirilli C, Rashid I, Marcheselli L, Luppi G, Federico M: Incidence and clinicopathologic features of gastrointestinal stromal tumors. A population-based study, *BMC Cancer* 2007, 7:230

30. Alvarado-Cabrero I, Vazquez G, Sierra Santiesteban FI, Hernandez-Hernandez DM, Pompa AZ: Clinicopathologic study of 275 cases of gastrointestinal stromal tumors: the experience at 3 large medical centers in Mexico, *Ann Diagn Pathol* 2007, 11:39-45

31. Rubio J, Marcos-Gragera R, Ortiz MR, Miro J, Vilardell L, Girones J, Hernandez-Yague X, Codina-Cazador A, Bernado L, Izquierdo A, Colomer R: Population-based incidence and survival of gastrointestinal stromal tumours (GIST) in Girona, Spain, *Eur J Cancer* 2007, 43:144-148

32. Andersson J, Sjogren H, Meis-Kindblom JM, Stenman G, Aman P, Kindblom LG: The complexity of KIT gene mutations and chromosome rearrangements and their clinical correlation in gastrointestinal stromal (pacemaker cell) tumors, *Am J Pathol* 2002, 160:15-22

33. Chen H, Hirota S, Isozaki K, Sun H, Ohashi A, Kinoshita K, O'Brien P, Kapusta L, Dardick I, Obayashi T, Okazaki T, Shinomura Y, Matsuzawa Y, Kitamura Y: Polyclonal nature of diffuse proliferation of interstitial cells of Cajal in patients with familial and multiple gastrointestinal stromal tumours, *Gut* 2002, 51:793-796
34. Nishida T, Hirota S, Taniguchi M, Hashimoto K, Isozaki K, Nakamura H, Kanakura Y, Tanaka T, Takabayashi A, Matsuda H, Kitamura Y: Familial gastrointestinal stromal tumours with germline mutation of the KIT gene, *Nat Genet* 1998, 19:323-324
35. Chompret A, Kannengiesser C, Barrois M, Terrier P, Dahan P, Tursz T, Lenoir GM, Bressac-De Paillerets B: PDGFRA germline mutation in a family with multiple cases of gastrointestinal stromal tumor, *Gastroenterology* 2004, 126:318-321
36. Kinoshita K, Hirota S, Isozaki K, Ohashi A, Nishida T, Kitamura Y, Shinomura Y, Matsuzawa Y: Absence of c-kit gene mutations in gastrointestinal stromal tumours from neurofibromatosis type 1 patients, *J Pathol* 2004, 202:80-85
37. Schaldenbrand JD, Appelman HD: Solitary solid stromal gastrointestinal tumors in von Recklinghausen's disease with minimal smooth muscle differentiation, *Hum Pathol* 1984, 15:229-232
38. Fletcher CD, Berman JJ, Corless C, Gorstein F, Lasota J, Longley BJ, Miettinen M, O'Leary TJ, Remotti H, Rubin BP, Shmookler B, Sobin LH, Weiss SW: Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: a consensus approach, *Int J Surg Pathol* 2002, 10:81-89
39. Miettinen M, Furlong M, Sarlomo-Rikala M, Burke A, Sobin LH, Lasota J: Gastrointestinal stromal tumors, intramural leiomyomas, and leiomyosarcomas in the rectum and anus: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 144 cases, *Am J Surg Pathol* 2001, 25:1121-1133
40. 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, 30:477-489
41. 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, 29:52-68
42. Miettinen M, Sarlomo-Rikala M, Sobin LH, Lasota J: Esophageal stromal tumors: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 17 cases and comparison with esophageal leiomyomas and leiomyosarcomas, *Am J Surg Pathol* 2000, 24:211-222
43. 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, 231:51-58
44. Sigel JE, Smith TA, Reith JD, Goldblum JR: Immunohistochemical analysis of anaplastic lymphoma kinase expression in deep soft tissue calcifying fibrous pseudotumor: evidence of a late sclerosing stage of inflammatory myofibroblastic tumor?, *Ann Diagn Pathol* 2001, 5:10-14
45. Cuevas E, Ortiz-Hidalgo C, Oliva H, Rivas C: Primary pleomorphic T-cell lymphoma of the spleen, *Leuk Lymphoma* 1993, 9:265-267
46. Miettinen M, Lasota J: Gastrointestinal stromal tumors--definition, clinical, histological, immunohistochemical, and molecular genetic features and differential diagnosis, *Virchows Arch* 2001, 438:1-12
47. Miettinen M, Monihan JM, Sarlomo-Rikala M, Kovatich AJ, Carr NJ, Emory TS, Sobin LH: 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, 23:1109-1118

48. Reith JD, Goldblum JR, Lyles RH, Weiss SW: Extragastrointestinal (soft tissue) stromal tumors: an analysis of 48 cases with emphasis on histologic predictors of outcome, *Mod Pathol* 2000, 13:577-585

49. Tworek JA, Goldblum JR, Weiss SW, Greenson JK, Appelman HD: Stromal tumors of the anorectum: a clinicopathologic study of 22 cases, *Am J Surg Pathol* 1999, 23:946-954

50. Tworek JA, Goldblum JR, Weiss SW, Greenson JK, Appelman HD: Stromal tumors of the abdominal colon: a clinicopathologic study of 20 cases, *Am J Surg Pathol* 1999, 23:937-945

51. Levy AD, Remotti HE, Thompson WM, Sobin LH, Miettinen M: Gastrointestinal stromal tumors: radiologic features with pathologic correlation, *Radiographics* 2003, 23:283-304, 456; quiz 532

52. Miettinen M, El-Rifai W, L HLS, Lasota J: Evaluation of malignancy and prognosis of gastrointestinal stromal tumors: a review, *Hum Pathol* 2002, 33:478-483

53. Wong NA, Young R, Malcomson RD, Nayar AG, Jamieson LA, Save VE, Carey FA, Brewster DH, Han C, Al-Nafussi A: Prognostic indicators for gastrointestinal stromal tumours: a clinicopathological and immunohistochemical study of 108 resected cases of the stomach, *Histopathology* 2003, 43:118-126

54. Miettinen M, Kopczynski J, Makhlof HR, Sarlomo-Rikala M, Gyorffy H, Burke A, Sobin LH, Lasota J: Gastrointestinal stromal tumors, intramural leiomyomas, and leiomyosarcomas in the duodenum: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 167 cases, *Am J Surg Pathol* 2003, 27:625-641

55. Tworek JA, Appelman HD, Singleton TP, Greenson JK: Stromal tumors of the jejunum and ileum, *Mod Pathol* 1997, 10:200-209

56. Kim KM, Kang DW, Moon WS, Park JB, Park CK, Sohn JH, Jeong JS, Cho MY, Jin SY, Choi JS, Kang DY: Gastrointestinal stromal tumors in Koreans: it's incidence and the clinical, pathologic and immunohistochemical findings, *J Korean Med Sci* 2005, 20:977-984

57. Yap WM, Tan HW, Goh SG, Chuah KL: Appendiceal gastrointestinal stromal tumor, *Am J Surg Pathol* 2005, 29:1545-1547

58. Agaimy A, Wunsch PH: Gastrointestinal stromal tumours: a regular origin in the muscularis propria, but an extremely diverse gross presentation. A review of 200 cases to critically re-evaluate the concept of so-called extra-gastrointestinal stromal tumours, *Langenbecks Arch Surg* 2006, 391:322-329

59. Steigen SE, Eide TJ: Gastrointestinal stromal tumors (GISTs): a review, *Apmis* 2009, 117:73-86

60. Hassan I, You YN, Shyyan R, Dozois EJ, Smyrk TC, Okuno SH, Schleck CD, Hodge DO, Donohue JH: Surgically managed gastrointestinal stromal tumors: a comparative and prognostic analysis, *Ann Surg Oncol* 2008, 15:52-59

61. Yantiss RK, Rosenberg AE, Selig MK, Nielsen GP: Gastrointestinal stromal tumors: an ultrastructural study, *Int J Surg Pathol* 2002, 10:101-113

62. Singer S, Rubin BP, Lux ML, Chen CJ, Demetri GD, Fletcher CD, Fletcher JA: Prognostic value of KIT mutation type, mitotic activity, and histologic subtype in gastrointestinal stromal tumors, *J Clin Oncol* 2002, 20:3898-3905

63. Medeiros F, Corless CL, Duensing A, Hornick JL, Oliveira AM, Heinrich MC, Fletcher JA, Fletcher CD: KIT-negative gastrointestinal stromal tumors: proof of concept and therapeutic implications, *Am J Surg Pathol* 2004, 28:889-894

64. Suster S, Fisher C, Moran CA: Expression of bcl-2 oncoprotein in benign and malignant spindle cell tumors of soft tissue, skin, serosal surfaces, and gastrointestinal tract, *Am J Surg Pathol* 1998, 22:863-872
65. Cunningham RE, Abbondanzo SL, Chu WS, Emory TS, Sobin LH, O'Leary TJ: Apoptosis, bcl-2 expression, and p53 expression in gastrointestinal stromal/smooth muscle tumors, *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2001, 9:19-23
66. Lasota J, Dansonka-Mieszkowska A, Stachura T, Schneider-Stock R, Kallajoki M, Steigen SE, Sarlomo-Rikala M, Boltze C, Kordek R, Roessner A, Stachura J, Miettinen M: 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, 16:1257-1264
67. Pauwels P, Debiec-Rychter M, Stul M, De Wever I, Van Oosterom AT, Sciot R: Changing phenotype of gastrointestinal stromal tumours under imatinib mesylate treatment: a potential diagnostic pitfall, *Histopathology* 2005, 47:41-47
68. Al-Bozom IA: p53 expression in gastrointestinal stromal tumors, *Pathol Int* 2001, 51:519-523
69. Feakins RM: The expression of p53 and bcl-2 in gastrointestinal stromal tumours is associated with anatomical site, and p53 expression is associated with grade and clinical outcome, *Histopathology* 2005, 46:270-279
70. Rossi G, Valli R, Bertolini F, Marchioni A, Cavazza A, Mucciarini C, Migaldi M, Federico M, Trentini GP, Sgambato A: PDGFR expression in differential diagnosis between KIT-negative gastrointestinal stromal tumours and other primary soft-tissue tumours of the gastrointestinal tract, *Histopathology* 2005, 46:522-531
71. Yi ES, Strong CR, Piao Z, Perucho M, Weidner N: Epithelioid gastrointestinal stromal tumor with PDGFRA activating mutation and immunoreactivity, *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2005, 13:157-161
72. Hou YY, Sun MH, Wei YK, Tan YS, Lu XY, Wang J, Zhu XZ, Zheng AH: [Clinicopathological, immunohistochemical and molecular genetic study of intra-abdomen extra-gastrointestinal stromal tumors], *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 2003, 32:422-426
73. Tornoczky T, Kalman E, Hegedus G, Horvath OP, Sapi Z, Antal L, Jakso P, Pajor L: High mitotic index associated with poor prognosis in gastrointestinal autonomic nerve tumour, *Histopathology* 1999, 35:121-128
74. Carrillo R, Candia A, Rodriguez-Peralto JL, Caz V: Prognostic significance of DNA ploidy and proliferative index (MIB-1 index) in gastrointestinal stromal tumors, *Hum Pathol* 1997, 28:160-165
75. 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, 29:791-800
76. Herrera GA, Cerezo L, Jones JE, Sack J, Grizzle WE, Pollack WJ, Lott RL: Gastrointestinal autonomic nerve tumors. 'Plexosarcomas', *Arch Pathol Lab Med* 1989, 113:846-853
77. Eyden B, Chorneyko KA, Shanks JH, Menasce LP, Banerjee SS: Contribution of electron microscopy to understanding cellular differentiation in mesenchymal tumors of the gastrointestinal tract: a study of 82 tumors, *Ultrastruct Pathol* 2002, 26:269-285
78. 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, 25:979-987

79. Schmid S, Wegmann W: Gastrointestinal pacemaker cell tumor: clinicopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study with special reference to c-kit receptor antibody, *Virchows Arch* 2000, 436:234-242
80. Blay P, Astudillo A, Buesa JM, Campo E, Abad M, Garcia-Garcia J, Miquel R, Marco V, Sierra M, Losa R, Lacave A, Brana A, Balbin M, Freije JM: Protein kinase C theta is highly expressed in gastrointestinal stromal tumors but not in other mesenchymal neoplasias, *Clin Cancer Res* 2004, 10:4089-4095
81. Duensing AJ, NE. Medeiros F, et al.: Protein kinase C theta (PKCtheta) expression and constitutive activation in gastrointestinal stromal tumors (GISTs), *Cancer Res.* 2004, 64:5127-5131
82. Ardeleanu C, Arsene D, Hinescu M, Andrei F, Gutu D, Luca L, Popescu LM: Pancreatic Expression of DOG1: A Novel Gastrointestinal Stromal Tumor (GIST) Biomarker, *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2009,
83. West RB, Corless CL, Chen X, Rubin BP, Subramanian S, Montgomery K, Zhu S, Ball CA, Nielsen TO, Patel R, Goldblum JR, Brown PO, Heinrich MC, van de Rijn M: The novel marker, DOG1, is expressed ubiquitously in gastrointestinal stromal tumors irrespective of KIT or PDGFRA mutation status, *Am J Pathol* 2004, 165:107-113
84. Espinosa I, Lee CH, Kim MK, Rouse BT, Subramanian S, Montgomery K, Varma S, Corless CL, Heinrich MC, Smith KS, Wang Z, Rubin B, Nielsen TO, Seitz RS, Ross DT, West RB, Cleary ML, van de Rijn M: A novel monoclonal antibody against DOG1 is a sensitive and specific marker for gastrointestinal stromal tumors, *Am J Surg Pathol* 2008, 32:210-218
85. Perrone F, Tamborini E, Dagrada GP, Colombo F, Bonadiman L, Albertini V, Lagonigro MS, Gabanti E, Caramuta S, Greco A, Torre GD, Gronchi A, Pierotti MA, Pilotti S: 9p21 locus analysis in high-risk gastrointestinal stromal tumors characterized for c-kit and platelet-derived growth factor receptor alpha gene alterations, *Cancer* 2005, 104:159-169
86. Miettinen M, Lasota J: Gastrointestinal stromal tumors (GISTs): definition, occurrence, pathology, differential diagnosis and molecular genetics, *Pol J Pathol* 2003, 54:3-24
87. Rudolph P, Chiaravalli AM, Pauser U, Oschlies I, Hillemanns M, Gobbo M, Marichal M, Eusebi V, Hofler H, Capella C, Kloppel G: Gastrointestinal mesenchymal tumors - immunophenotypic classification and survival analysis, *Virchows Arch* 2002, 441:238-248
88. Lonardo F, Pass HI, Lucas DR: Immunohistochemistry frequently detects c-Kit expression in pulmonary small cell carcinoma and may help select clinical subsets for a novel form of chemotherapy, *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2003, 11:51-55
89. Miettinen M, Sarlomo-Rikala M, Lasota J: KIT expression in angiosarcomas and fetal endothelial cells: lack of mutations of exon 11 and exon 17 of C-kit, *Mod Pathol* 2000, 13:536-541
90. Llombart-Bosch A, Navarro S, Giraudo P: Immunophenotypic Profile of Anti-Apoptotic and Neuroectodermal Differentiation Pathways in Ewing Family of Tumors (EFT), *Lab Invest* 2003, 83:73A
91. Smithey BE, Pappo AS, Hill DA: C-kit expression in pediatric solid tumors: a comparative immunohistochemical study, *Am J Surg Pathol* 2002, 26:486-492
92. Ranchod M, Kempson RL: Smooth muscle tumors of the gastrointestinal tract and retroperitoneum: a pathologic analysis of 100 cases, *Cancer* 1977, 39:255-262
93. Evans HL: Smooth muscle tumors of the gastrointestinal tract. A study of 56 cases followed for a minimum of 10 years, *Cancer* 1985, 56:2242-2250

94. Demetri GD: Targeting c-kit mutations in solid tumors: scientific rationale and novel therapeutic options, *Semin Oncol* 2001, 28:19-26
95. Taniguchi M, Nishida T, Hirota S, Isozaki K, Ito T, Nomura T, Matsuda H, Kitamura Y: Effect of c-kit mutation on prognosis of gastrointestinal stromal tumors, *Cancer Res* 1999, 59:4297-4300
96. Fletcher CD: Clinicopathologic correlations in gastrointestinal stromal tumors, *Hum Pathol* 2002, 33:455
97. Rutkowski P, Nowecki ZI, Michej W, Debiec-Rychter M, Wozniak A, Limon J, Siedlecki J, Grzesiakowska U, Kakol M, Osuch C, Polkowski M, Gluszek S, Zurawski Z, Ruka W: Risk criteria and prognostic factors for predicting recurrences after resection of primary gastrointestinal stromal tumor, *Ann Surg Oncol* 2007, 14:2018-2027
98. DeMatteo RP, Gold JS, Saran L, Gonen M, Liau KH, Maki RG, Singer S, Besmer P, Brennan MF, Antonescu CR: Tumor mitotic rate, size, and location independently predict recurrence after resection of primary gastrointestinal stromal tumor (GIST), *Cancer* 2007,
99. Meara RS, Cangiarella J, Simsir A, Horton D, Eltoun I, Chhieng DC: Prediction of aggressiveness of gastrointestinal stromal tumours based on immunostaining with bcl-2, Ki-67 and p53, *Cytopathology* 2007, 18:283-289
100. Plaat BE, Hollema H, Molenaar WM, Torn Broers GH, Pijpe J, Mastik MF, Hoekstra HJ, van den Berg E, Scheper RJ, van der Graaf WT: Soft tissue leiomyosarcomas and malignant gastrointestinal stromal tumors: differences in clinical outcome and expression of multidrug resistance proteins, *J Clin Oncol* 2000, 18:3211-3220
101. Bucher P, Villiger P, Egger JF, Buhler LH, Morel P: Management of gastrointestinal stromal tumors: from diagnosis to treatment, *Swiss Med Wkly* 2004, 134:145-153
102. Miettinen M, Lasota J: Gastrointestinal stromal tumors: review on morphology, molecular pathology, prognosis, and differential diagnosis, *Arch Pathol Lab Med* 2006, 130:1466-1478
103. Langel D, Grotte D, Batts K: Multiple gastrointestinal tumors arising from the interstitial cells of Cajal (ICCs)—a potential association with neurofibromatosis type 1 (NF1). *Mod Pathol* 1999, 12:78A
104. 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, 30:90-96
105. Yantiss RK, Rosenberg AE, Saran L, Besmer P, Antonescu CR: Multiple gastrointestinal stromal tumors in type I neurofibromatosis: a pathologic and molecular study, *Mod Pathol* 2005, 18:475-484
106. 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, 74:543-552
107. Agaram NP, Laquaglia MP, Ustun B, Guo T, Wong GC, Socci ND, Maki RG, DeMatteo RP, Besmer P, Antonescu CR: Molecular characterization of pediatric gastrointestinal stromal tumors, *Clin Cancer Res* 2008, 14:3204-3215
108. 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, 29:1373-1381

109. Agaimy A, Wunsch PH, Hofstaedter F, Blaszyk H, Rummele P, Gaumann A, Dietmaier W, Hartmann A: Minute gastric sclerosing stromal tumors (GIST tumorlets) are common in adults and frequently show c-KIT mutations, *Am J Surg Pathol* 2007, 31:113-120
110. Li FP, Fletcher JA, Heinrich MC, Garber JE, Sallan SE, Curiel-Lewandrowski C, Duensing A, van de Rijn M, Schnipper LE, Demetri GD: Familial gastrointestinal stromal tumor syndrome: phenotypic and molecular features in a kindred, *J Clin Oncol* 2005, 23:2735-2743
111. Yaish P, Gazit A, Gilon C, Levitzki A: Blocking of EGF-dependent cell proliferation by EGF receptor kinase inhibitors, *Science* 1988, 242:933-935
112. Heinrich MC, Griffith DJ, Druker BJ, Wait CL, Ott KA, Ziegler AJ: Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor, *Blood* 2000, 96:925-932
113. Tuveson DA, Willis NA, Jacks T, Griffin JD, Singer S, Fletcher CD, Fletcher JA, Demetri GD: STI571 inactivation of the gastrointestinal stromal tumor c-KIT oncoprotein: biological and clinical implications, *Oncogene* 2001, 20:5054-5058
114. Candelaria M, de la Garza J, Duenas-Gonzalez A: A clinical and biological overview of gastrointestinal stromal tumors, *Med Oncol* 2005, 22:1-10
115. Demetri GD: GIST 1, chemotherapy 0, with a brand new hitter up next, *Cancer Invest* 2002, 20:853-854
116. Corless CL, Fletcher JA, Heinrich MC: Biology of gastrointestinal stromal tumors, *J Clin Oncol* 2004, 22:3813-3825
117. Burger H, den Bakker MA, Stoter G, Verweij J, Nooter K: Lack of c-kit exon 11 activating mutations in c-KIT/CD117-positive SCLC tumour specimens, *Eur J Cancer* 2003, 39:793-799
118. Faivre S, Delbaldo C, Vera K, Robert C, Lozahic S, Lassau N, Bello C, Deprimo S, Brega N, Massimini G, Armand JP, Scigalla P, Raymond E: Safety, pharmacokinetic, and antitumor activity of SU11248, a novel oral multitarget tyrosine kinase inhibitor, in patients with cancer, *J Clin Oncol* 2006, 24:25-35
119. J. D: Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt., *Curr.Opin.Cell. Biol.* 1998, 10:262-267
120. Vandenbark GR, deCastro CM, Taylor H, Dew-Knight S, Kaufman RE: Cloning and structural analysis of the human c-kit gene, *Oncogene* 1992, 7:1259-1266
121. Pawson T: Regulation and targets of receptor tyrosine kinases, *Eur J Cancer* 2002, 38 Suppl 5:S3-10
122. Qiu FH, Ray P, Brown K, Barker PE, Jhanwar S, Ruddle FH, Besmer P: 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, 7:1003-1011
123. Zhu WM, Dong WF, Minden M: Alternate splicing creates two forms of the human kit protein, *Leuk Lymphoma* 1994, 12:441-447
124. Crosier PS, Ricciardi ST, Hall LR, Vitas MR, Clark SC, Crosier KE: Expression of isoforms of the human receptor tyrosine kinase c-kit in leukemic cell lines and acute myeloid leukemia, *Blood* 1993, 82:1151-1158
125. Turner AM, Bennett LG, Lin NL, Wypych J, Bartley TD, Hunt RW, Atkins HL, Langley KE, Parker V, Martin F, et al.: Identification and characterization of a soluble c-kit receptor produced by human hematopoietic cell lines, *Blood* 1995, 85:2052-2058
126. Wypych J, Bennett LG, Schwartz MG, Clogston CL, Lu HS, Broudy VC, Bartley TD, Parker VP, Langley KE: Soluble kit receptor in human serum, *Blood* 1995, 85:66-73

127. Sandberg AA, Bridge JA: Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors. gastrointestinal stromal tumors, *Cancer Genet Cytogenet* 2002, 135:1-22
128. Wardelmann E: Association of Platelet-Derived Growth Factor Receptor a Mutations with Gastric Primary Site and Epithelioid or Mixed Cell Morphology in Gastrointestinal Stromal Tumor., *Journal of Molecular Diagnostics* 2004, 6:197-204
129. Schlessinger J: Signal transduction by allosteric receptor oligomerization, *Trends Biochem Sci* 1988, 13:443-447
130. Leever SJ VBaWM: Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage., *Curr.Opin.Cell. Biol.* 1999, 11:219-225
131. Darnell JE J, Kerr im and Stark GR Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to INFs and another extracellular signaling proteins., *Science* 1994, 264:1415-1421
132. J. D: Control of ras activation., *Cancer Surv.* 1996, 27:87-100
133. Guan KL DJ: Evidence for protein-tyrosine-phosphatase catalysis proceeding via a cysteine-phosphatase intermediate., *J Biol Chem* 1991, 266:17026-17030
134. Wang WL HM, Sattler M, Verma S, Lin J, Maulik G y col.: Growth inhibition and modulation of kinase pathways of small cell lung cancer cell lines by the novel tyrosine kinase inhibitor STI 571. , *Oncogene* 2000, 19:3521-3528
135. Rohrschneider LR FJ, Wolf I, Liu Y, Lucas DM: Structure, function, and biology of SHIP proteins., *Genes Dev.* 2002, 14:505-520
136. Yamada KM AM: Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis., *J Cell Sci.* 2001, 114:2375-2382
137. Musashi M OS, Shiroshta N.: The role of protein kinase C isoforms in cell proliferation and apoptosis., *Int J Hematol.* 2000, 72:12-19
138. Blume- Jensen P RL, Gout I, Waterfield MD, Heldin CH.: Modulation of Kit/stem cell factor receptor-induced signaling by protein kinase C., *J Biol Chem* 1994, 269:21793-21802
139. Antonescu CR, Viale A, Sarran L, Tschernyavsky SJ, Gonen M, Segal NH, Maki RG, Socci ND, DeMatteo RP, Besmer P: Gene expression in gastrointestinal stromal tumors is distinguished by KIT genotype and anatomic site, *Clin Cancer Res* 2004, 10:3282-3290
140. Kluppel M, Huizinga JD, Malysz J, Bernstein A: Developmental origin and Kit-dependent development of the interstitial cells of cajal in the mammalian small intestine, *Dev Dyn* 1998, 211:60-71
141. Swick BL, Ravdel L, Fitzpatrick JE, Robinson WA: Platelet-derived growth factor receptor alpha mutational status and immunohistochemical expression in Merkel cell carcinoma: implications for treatment with imatinib mesylate, *J Cutan Pathol* 2008, 35:197-202
142. Rubin BP, Singer S, Tsao C, Duensing A, Lux ML, Ruiz R, Hibbard MK, Chen CJ, Xiao S, Tuveson DA, Demetri GD, Fletcher CD, Fletcher JA: KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors, *Cancer Res* 2001, 61:8118-8121
143. Rubin BP, Fletcher JA, Fletcher CD: Molecular Insights into the Histogenesis and Pathogenesis of Gastrointestinal Stromal Tumors, *Int J Surg Pathol* 2000, 8:5-10
144. Lee AG, Tang RA, Feldon SE, Pless M, Schiffman JS, Rubin RM, Rao N: Orbital presentations of giant cell arteritis, *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2001, 239:509-513

145. Ernst SI, Hubbs AE, Przygodzki RM, Emory TS, Sobin LH, O'Leary TJ: KIT mutation portends poor prognosis in gastrointestinal stromal/smooth muscle tumors, *Lab Invest* 1998, 78:1633-1636
146. Moskaluk CA, Tian Q, Marshall CR, Rumpel CA, Franquemont DW, Frierson HF, Jr.: Mutations of c-kit JM domain are found in a minority of human gastrointestinal stromal tumors, *Oncogene* 1999, 18:1897-1902
147. Corless CL, McGreevey L, Haley A, Town A, Heinrich MC: KIT mutations are common in incidental gastrointestinal stromal tumors one centimeter or less in size, *Am J Pathol* 2002, 160:1567-1572
148. Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, Guilhot F, Schiffer C, Gambacorti-Passerini C, Niederwieser D, Resta D, Capdeville R, Zoellner U, Talpaz M, Druker B, Goldman J, O'Brien SG, Russell N, Fischer T, Ottmann O, Cony-Makhoul P, Facon T, Stone R, Miller C, Tallman M, Brown R, Schuster M, Loughran T, Gratwohl A, Mandelli F, Saglio G, Lazzarino M, Russo D, Baccarani M, Morra E: Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia, *N Engl J Med* 2002, 346:645-652
149. Hirota S, Nishida T, Isozaki K, Taniguchi M, Nakamura J, Okazaki T, Kitamura Y: Gain-of-function mutation at the extracellular domain of KIT in gastrointestinal stromal tumours, *J Pathol* 2001, 193:505-510
150. Kinoshita K, Isozaki K, Hirota S, Nishida T, Chen H, Nakahara M, Nagasawa Y, Ohashi A, Shinomura Y, Kitamura Y, Matsuzawa Y: c-kit gene mutation at exon 17 or 13 is very rare in sporadic gastrointestinal stromal tumors, *J Gastroenterol Hepatol* 2003, 18:147-151
151. Wardelmann E, Neidt I, Bierhoff E, Speidel N, Manegold C, Fischer HP, Pfeifer U, Pietsch T: c-kit mutations in gastrointestinal stromal tumors occur preferentially in the spindle rather than in the epithelioid cell variant, *Mod Pathol* 2002, 15:125-136
152. Wardelmann E, Losen I, Hans V, Neidt I, Speidel N, Bierhoff E, Heinicke T, Pietsch T, Buttner R, Merkelbach-Bruse S: 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, 106:887-895
153. Lux ML, Rubin BP, Biase TL, Chen CJ, Maclure T, Demetri G, Xiao S, Singer S, Fletcher CD, Fletcher JA: KIT extracellular and kinase domain mutations in gastrointestinal stromal tumors, *Am J Pathol* 2000, 156:791-795
154. Sakurai S, Oguni S, Hironaka M, Fukayama M, Morinaga S, Saito K: Mutations in c-kit gene exons 9 and 13 in gastrointestinal stromal tumors among Japanese, *Jpn J Cancer Res* 2001, 92:494-498
155. Longley BJ, Tyrrell L, Lu SZ, Ma YS, Langley K, Ding TG, Duffy T, Jacobs P, Tang LH, Modlin I: Somatic c-KIT activating mutation in urticaria pigmentosa and aggressive mastocytosis: establishment of clonality in a human mast cell neoplasm, *Nat Genet* 1996, 12:312-314
156. Gari M, Goodeve A, Wilson G, Winship P, Langabeer S, Linch D, Vandenberghe E, Peake I, Reilly J: c-kit proto-oncogene exon 8 in-frame deletion plus insertion mutations in acute myeloid leukaemia, *Br J Haematol* 1999, 105:894-900
157. Sakurai S, Fukasawa T, Chong JM, Tanaka A, Fukayama M: Embryonic form of smooth muscle myosin heavy chain (SMemb/MHC-B) in gastrointestinal stromal tumor and interstitial cells of Cajal, *Am J Pathol* 1999, 154:23-28
158. Sommer G, Agosti V, Ehlers I, Rossi F, Corbacioglu S, Farkas J, Moore M, Manova K, Antonescu CR, Besmer P: Gastrointestinal stromal tumors in a mouse model by targeted mutation of the Kit receptor tyrosine kinase, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100:6706-6711

159. Kim TW, Lee H, Kang YK, Choe MS, Ryu MH, Chang HM, Kim JS, Yook JH, Kim BS, Lee JS: Prognostic significance of c-kit mutation in localized gastrointestinal stromal tumors, *Clin Cancer Res* 2004, 10:3076-3081
160. Carballo M, Roig I, Aguilar F, Pol MA, Gamundi MJ, Hernan I, Martinez-Gimeno M: Novel c-KIT germline mutation in a family with gastrointestinal stromal tumors and cutaneous hyperpigmentation, *Am J Med Genet A* 2005, 132:361-364
161. Debiec-Rychter M, Sciot R, Le Cesne A, Schlemmer M, Hohenberger P, van Oosterom AT, Blay JY, Leyvraz S, Stul M, Casali PG, Zalcborg J, Verweij J, Van Glabbeke M, Hagemeijer A, Judson I: KIT mutations and dose selection for imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumours, *Eur J Cancer* 2006, 42:1093-1103
162. Cho S, Kitadai Y, Yoshida S, Tanaka S, Yoshihara M, Yoshida K, Chayama K: Deletion of the KIT gene is associated with liver metastasis and poor prognosis in patients with gastrointestinal stromal tumor in the stomach, *Int J Oncol* 2006, 28:1361-1367
163. Lopez-Guerrero JA, Noguera R, Llombart-Bosch A: GIST: particular aspects related to cell cultures, xenografts, and cytogenetics, *Semin Diagn Pathol* 2006, 23:103-110
164. Rubin BP, Antonescu CR, Scott-Browne JP, Comstock ML, Gu Y, Tanas MR, Ware CB, Woodell J: A knock-in mouse model of gastrointestinal stromal tumor harboring kit K641E, *Cancer Res* 2005, 65:6631-6639
165. Huang E, Nocka K, Beier DR, Chu TY, Buck J, Lahm HW, Wellner D, Leder P, Besmer P: The hematopoietic growth factor KL is encoded by the Sl locus and is the ligand of the c-kit receptor, the gene product of the W locus, *Cell* 1990, 63:225-233
166. Matsui T, Heidarani M, Miki T, Popescu N, La Rochelle W, Kraus M, Pierce J, Aaronson S: Isolation of a novel receptor cDNA establishes the existence of two PDGF receptor genes, *Science* 1989, 243:800-804
167. Kawagishi J, Kumabe T, Yoshimoto T, Yamamoto T: Structure, organization, and transcription units of the human alpha-platelet-derived growth factor receptor gene, PDGFRA, *Genomics* 1995, 30:224-232
168. Hirota S, Ohashi A, Nishida T, Isozaki K, Kinoshita K, Shinomura Y, Kitamura Y: Gain-of-function mutations of platelet-derived growth factor receptor alpha gene in gastrointestinal stromal tumors, *Gastroenterology* 2003, 125:660-667
169. Corless CL, Schroeder A, Griffith D, Town A, McGreevey L, Harrell P, Shiraga S, Bainbridge T, Morich J, Heinrich MC: PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors: frequency, spectrum and in vitro sensitivity to imatinib, *J Clin Oncol* 2005, 23:5357-5364
170. Schneider-Stock R, Boltze C, Lasota J, Peters B, Corless CL, Ruummele P, Terracciano L, Pross M, Insabato L, Di Vizio D, Iesalnieks I, Dirnhofer S, Hartmann A, Heinrich M, Miettinen M, Roessner A, Tornillo L: Loss of p16 protein defines high-risk patients with gastrointestinal stromal tumors: a tissue microarray study, *Clin Cancer Res* 2005, 11:638-645
171. Lasota J, Stachura J, Miettinen M: GISTs with PDGFRA exon 14 mutations represent subset of clinically favorable gastric tumors with epithelioid morphology, *Lab Invest* 2006, 86:94-100
172. Heinrich MC, Corless CL, Blanke CD, Demetri GD, Joensuu H, Roberts PJ, Eisenberg BL, von Mehren M, Fletcher CD, Sandau K, McDougall K, Ou WB, Chen CJ, Fletcher JA: Molecular correlates of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors, *J Clin Oncol* 2006, 24:4764-4774

173. Debiec-Rychter M, Cools J, Dumez H, Sciot R, Stul M, Mentens N, Vranckx H, Wasag B, Prenen H, Roesel J, Hagemeyer A, Van Oosterom A, Marynen P: Mechanisms of resistance to imatinib mesylate in gastrointestinal stromal tumors and activity of the PKC412 inhibitor against imatinib-resistant mutants, *Gastroenterology* 2005, 128:270-279
174. Wardelmann E, Merkelbach-Bruse S, Pauls K, Thomas N, Schildhaus HU, Heinicke T, Speidel N, Pietsch T, Buettner R, Pink D, Reichardt P, Hohenberger P: Polyclonal evolution of multiple secondary KIT mutations in gastrointestinal stromal tumors under treatment with imatinib mesylate, *Clin Cancer Res* 2006, 12:1743-1749
175. Grimpén F, Yip D, McArthur G, Waring P, Goldstein D, Loughrey M, Beshay V, Chong G: Resistance to imatinib, low-grade FDG-avidity on PET, and acquired KIT exon 17 mutation in gastrointestinal stromal tumour, *Lancet Oncol* 2005, 6:724-727
176. Antonescu CR, Besmer P, Guo T, Arkun K, Hom G, Koryotowski B, Leversha MA, Jeffrey PD, Desantis D, Singer S, Brennan MF, Maki RG, DeMatteo RP: Acquired resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumor occurs through secondary gene mutation, *Clin Cancer Res* 2005, 11:4182-4190
177. Marci V, Casorzo L, Sarotto I, Dogliani N, Milazzo MG, Risio M: Gastrointestinal stromal tumor, uncommitted type, with monosomies 14 and 22 as the only chromosomal abnormalities, *Cancer Genet Cytogenet* 1998, 102:135-138
178. 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, 128:24-30
179. 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, 60:3899-3903
180. Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, Blanke CD, von Mehren M, Joensuu H, McGreevey LS, Chen CJ, Van den Abbeele AD, Druker BJ, Kiese B, Eisenberg B, Roberts PJ, Singer S, Fletcher CD, Silberman S, Dimitrijevic S, Fletcher JA: Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor, *J Clin Oncol* 2003, 21:4342-4349
181. Hermanns B, Bergmann F, Gunawan B, Hoer J, Fuzesi L: [Ultrastructural differential diagnosis of gastrointestinal stromal tumors], *Verh Dtsch Ges Pathol* 1998, 82:267-274
182. Kim NG, Kim JJ, Ahn JY, Seong CM, Noh SH, Kim CB, Min JS, Kim H: Putative chromosomal deletions on 9P, 9Q and 22Q occur preferentially in malignant gastrointestinal stromal tumors, *Int J Cancer* 2000, 85:633-638
183. 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, 23:82-87
184. Knuutila S, Armengol G, Bjorkqvist AM, el-Rifai W, Larramendy ML, Monni O, Szymanska J: Comparative genomic hybridization study on pooled DNAs from tumors of one clinical-pathological entity, *Cancer Genet Cytogenet* 1998, 100:25-30
185. Ricci R, Arena V, Castri F, Martini M, Maggiano N, Murazio M, Pacelli F, Potenza AE, Vecchio FM, Larocca LM: Role of p16/INK4a in gastrointestinal stromal tumor progression, *Am J Clin Pathol* 2004, 122:35-43
186. Chen Y, Tzeng CC, Liou CP, Chang MY, Li CF, Lin CN: Biological significance of chromosomal imbalance aberrations in gastrointestinal stromal tumors, *J Biomed Sci* 2004, 11:65-71
187. Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S, Kawano K, Hanada M, Kurata A, Takeda M, Muhammad Tunio G, Matsuzawa Y, Kanakura Y,

- Shinomura Y, Kitamura Y: Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors, *Science* 1998, 279:577-580
188. Hsu SM, Raine L, Fanger H: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures, *J Histochem Cytochem* 1981, 29:577-580
189. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP: Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens, *Nat Med* 1998, 4:844-847
190. Shergill IS, Arya M: Tissue microarrays, *Expert Rev Mol Diagn* 2004, 4:421-423
191. Tian ZQ, Liu JF, Zhang SW, Li BQ, Wang FS, Zhang YF: [A study on the method of DNA extraction from unbuffered formalin-fixed and paraffin-embedded samples], *Ai Zheng* 2004, 23:342-435
192. Joensuu H: Treatment of inoperable gastrointestinal stromal tumor (GIST) with Imatinib (Glivec, Gleevec), *Med Klin (Munich)* 2002, 97 Suppl 1:28-30
193. Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, Van den Abbeele AD, Eisenberg B, Roberts PJ, Heinrich MC, Tuveson DA, Singer S, Janicek M, Fletcher JA, Silverman SG, Silberman SL, Capdeville R, Kiese B, Peng B, Dimitrijevic S, Druker BJ, Corless C, Fletcher CD, Joensuu H: Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors, *N Engl J Med* 2002, 347:472-480
194. van Oosterom AT, Judson I, Verweij J, Stroobants S, Donato di Paola E, Dimitrijevic S, Martens M, Webb A, Scot R, Van Glabbeke M, Silberman S, Nielsen OS: Safety and efficacy of imatinib (STI571) in metastatic gastrointestinal stromal tumours: a phase I study, *Lancet* 2001, 358:1421-1423
195. Miettinen M, Sobin LH: Gastrointestinal stromal tumors in the appendix: a clinicopathologic and immunohistochemical study of four cases, *Am J Surg Pathol* 2001, 25:1433-1437
196. Martin J, Poveda A, Llombart-Bosch A, Ramos R, Lopez-Guerrero JA, Garcia del Muro J, Maurel J, Calabuig S, Gutierrez A, Gonzalez de Sande JL, Martinez J, De Juan A, Lainez N, Losa F, Alija V, Escudero P, Casado A, Garcia P, Blanco R, Buesa JM: 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, 23:6190-6198
197. 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, 13:1134-1142
198. Miettinen M, Sarlomo-Rikala M, Lasota J: Gastrointestinal stromal tumors: recent advances in understanding of their biology, *Hum Pathol* 1999, 30:1213-1220
199. Thomas RM, Sobin LH: Gastrointestinal cancer, *Cancer* 1995, 75:154-170
200. Tryggvason G, Gislason HG, Magnusson MK, Jonasson JG: Gastrointestinal stromal tumors in Iceland, 1990-2003: the icelandic GIST study, a population-based incidence and pathologic risk stratification study, *Int J Cancer* 2005, 117:289-293
201. Gupta P, Tewari M, Shukla HS: Gastrointestinal stromal tumor, *Surg Oncol* 2008, 17:129-138
202. Boccon-Gibod L, Boman F, Boudjemaa S, Fabre M, Leverger G, Carney AJ: Separate occurrence of extra-adrenal paraganglioma and gastrointestinal stromal tumor in monozygotic twins: probable familial Carney syndrome, *Pediatr Dev Pathol* 2004, 7:380-384
203. Cypriano MS, Jenkins JJ, Pappo AS, Rao BN, Daw NC: Pediatric gastrointestinal stromal tumors and leiomyosarcoma, *Cancer* 2004, 101:39-50

204. Durham MM, Gow KW, Shehata BM, Katzenstein HM, Lorenzo RL, Ricketts RR: Gastrointestinal stromal tumors arising from the stomach: a report of three children, *J Pediatr Surg* 2004, 39:1495-1499
205. Haider N, Kader M, Mc Dermott M, Devaney D, Corbally MT, Fitzgerald RJ: Gastric stromal tumors in children, *Pediatr Blood Cancer* 2004, 42:186-189
206. Carney JA, Stratakis CA: Familial paraganglioma and gastric stromal sarcoma: a new syndrome distinct from the Carney triad, *Am J Med Genet* 2002, 108:132-139
207. Hayashi Y, Okazaki T, Yamataka A, Yanai T, Yamashiro Y, Tsurumaru M, Kajiyama Y, Miyano T: Gastrointestinal stromal tumor in a child and review of the literature, *Pediatr Surg Int* 2005, 21:914-917
208. Wang X, Mori I, Tang W, Utsunomiya H, Nakamura M, Nakamura Y, Zhou G, Kakudo K: Gastrointestinal stromal tumors: clinicopathological study of Chinese cases, *Pathol Int* 2001, 51:701-706
209. van der Zwan SM, DeMatteo RP: Gastrointestinal stromal tumor: 5 years later, *Cancer* 2005, 104:1781-1788
210. Antonescu CR, Busam KJ, Francone TD, Wong GC, Guo T, Agaram NP, Besmer P, Jungbluth A, Gimbel M, Chen CT, Veach D, Clarkson BD, Paty PB, Weiser MR: L576P KIT mutation in anal melanomas correlates with KIT protein expression and is sensitive to specific kinase inhibition, *Int J Cancer* 2007, 121:257-264
211. Miettinen M, Majidi M, Lasota J: Pathology and diagnostic criteria of gastrointestinal stromal tumors (GISTs): a review, *Eur J Cancer* 2002, 38 Suppl 5:S39-51
212. Rossi CR, Mocellin S, Mencarelli R, Foletto M, Pilati P, Nitti D, Lise M: Gastrointestinal stromal tumors: from a surgical to a molecular approach, *Int J Cancer* 2003, 107:171-176
213. Rosai J: GIST: an update, *Int J Surg Pathol* 2003, 11:177-186
214. Fuller CE, Williams GT: Gastrointestinal manifestations of type 1 neurofibromatosis (von Recklinghausen's disease), *Histopathology* 1991, 19:1-11
215. Carney JA: The triad of gastric epithelioid leiomyosarcoma, pulmonary chondroma, and functioning extra-adrenal paraganglioma: a five-year review, *Medicine (Baltimore)* 1983, 62:159-169
216. Lasota J, Miettinen M: KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors (GISTs), *Semin Diagn Pathol* 2006, 23:91-102
217. Maruta H, Burgess AW: Regulation of the Ras signalling network, *Bioessays* 1994, 16:489-496
218. Linnekin D: Early signaling pathways activated by c-Kit in hematopoietic cells, *Int J Biochem Cell Biol* 1999, 31:1053-1074
219. Maertens O, Prenen H, Debiec-Rychter M, Wozniak A, Sciot R, Pauwels P, De Wever I, Vermeesch JR, de Raedt T, De Paepe A, Speleman F, van Oosterom A, Messiaen L, Legius E: Molecular pathogenesis of multiple gastrointestinal stromal tumors in NF1 patients, *Hum Mol Genet* 2006, 15:1015-1023
220. Ueyama T, Guo KJ, Hashimoto H, Daimaru Y, Enjoji M: A clinicopathologic and immunohistochemical study of gastrointestinal stromal tumors, *Cancer* 1992, 69:947-955
221. DeMatteo RP: The GIST of targeted cancer therapy: a tumor (gastrointestinal stromal tumor), a mutated gene (c-kit), and a molecular inhibitor (STI571), *Ann Surg Oncol* 2002, 9:831-839
222. Bucher P, Taylor S, Villiger P, Morel P, Brundler MA: Are there any prognostic factors for small intestinal stromal tumors?, *Am J Surg* 2004, 187:761-766

223. Pierie JP, Choudry U, Muzikansky A, Yeap BY, Souba WW, Ott MJ: The effect of surgery and grade on outcome of gastrointestinal stromal tumors, *Arch Surg* 2001, 136:383-389
224. Lin SC, Huang MJ, Zeng CY, Wang TI, Liu ZL, Shiay RK: Clinical manifestations and prognostic factors in patients with gastrointestinal stromal tumors, *World J Gastroenterol* 2003, 9:2809-2812
225. Brunstein CG, McGlave PB: The biology and treatment of chronic myelogenous leukemia, *Oncology (Williston Park)* 2001, 15:23-31; discussion 31-22, 35
226. Maslak P, Scheinberg D: Targeted therapies for the myeloid leukaemias, *Expert Opin Investig Drugs* 2000, 9:1197-1205
227. Radford IR: Imatinib. Novartis, *Curr Opin Investig Drugs* 2002, 3:492-499
228. Bauer S, Hagen V, Pielken HJ, Bojko P, Seeber S, Schutte J: Imatinib mesylate therapy in patients with gastrointestinal stromal tumors and impaired liver function, *Anticancer Drugs* 2002, 13:847-849
229. Wilson J, Connock M, Song F, Yao G, Fry-Smith A, Raftery J, Peake D: Imatinib for the treatment of patients with unresectable and/or metastatic gastrointestinal stromal tumours: systematic review and economic evaluation, *Health Technol Assess* 2005, 9:1-142
230. Zalberg JR, Verweij J, Casali PG, Le Cesne A, Reichardt P, Blay JY, Schlemmer M, Van Glabbeke M, Brown M, Judson IR: Outcome of patients with advanced gastro-intestinal stromal tumours crossing over to a daily imatinib dose of 800 mg after progression on 400 mg, *Eur J Cancer* 2005, 41:1751-1757
231. Daum O, Klecka J, Ferda J, Treska V, Vanecek T, Sima R, Mukensnabl P, Michal M: Gastrointestinal stromal tumor of the pancreas: case report with documentation of KIT gene mutation, *Virchows Arch* 2005, 446:470-472
232. Ortiz-Hidalgo C, de Leon Bojorge B, Albores-Saavedra J: Stromal tumor of the gallbladder with phenotype of interstitial cells of Cajal: a previously unrecognized neoplasm, *Am J Surg Pathol* 2000, 24:1420-1423
233. Basoglu A, Kaya E, Celik B, Yildiz L: Giant gastrointestinal stromal tumor of the esophagus presenting with dyspnea, *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006, 131:1198-1199
234. Gouveia AM, Pimenta AP, Lopes JM, Capelinha AF, Ferreira SS, Valbuena C, Oliveira MC: Esophageal GIST: therapeutic implications of an uncommon presentation of a rare tumor, *Dis Esophagus* 2005, 18:70-73
235. Iijima S, Maesawa C, Sato N, Ikeda K, Inaba T, Akiyama Y, Ishida K, Saito K, Masuda T: Gastrointestinal stromal tumour of the oesophagus: significance of immunohistochemical and genetic analyses of the c-kit gene, *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002, 14:445-448
236. Trupiano JK, Stewart RE, Misick C, Appelman HD, Goldblum JR: Gastric stromal tumors: a clinicopathologic study of 77 cases with correlation of features with nonaggressive and aggressive clinical behaviors, *Am J Surg Pathol* 2002, 26:705-714
237. Fujimoto Y, Nakanishi Y, Yoshimura K, Shimoda T: Clinicopathologic study of primary malignant gastrointestinal stromal tumor of the stomach, with special reference to prognostic factors: analysis of results in 140 surgically resected patients, *Gastric Cancer* 2003, 6:39-48
238. Yamamoto H, Oda Y, Kawaguchi K, Nakamura N, Takahira T, Tamiya S, Saito T, Oshiro Y, Ohta M, Yao T, Tsuneyoshi M: c-kit and PDGFRA mutations in extragastrointestinal stromal tumor (gastrointestinal stromal tumor of the soft tissue), *Am J Surg Pathol* 2004, 28:479-488

239. 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, 24:1339-1352
240. Ferchichi L, Kourda N, Zermani R, Aouem J, Zaouche A, Abdjellil Z, Najah N, Baltagi Ben Jilani S: [Extragastrintestinal stromal tumors: a report of 4 cases], *Ann Chir* 2006, 131:271-275
241. 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, 33:669-676
242. Rubin BP: Gastrointestinal stromal tumours: an update, *Histopathology* 2006, 48:83-96
243. Yan H, Marchettini P, Acherman YI, Gething SA, Brun E, Sugarbaker PH: Prognostic assessment of gastrointestinal stromal tumor, *Am J Clin Oncol* 2003, 26:221-228
244. Pidhorecky I, Cheney RT, Kraybill WG, Gibbs JF: Gastrointestinal stromal tumors: current diagnosis, biologic behavior, and management, *Ann Surg Oncol* 2000, 7:705-712
245. de Silva CM, Reid R: Gastrointestinal stromal tumors (GIST): C-kit mutations, CD117 expression, differential diagnosis and targeted cancer therapy with Imatinib, *Pathol Oncol Res* 2003, 9:13-19
246. Tsuruta Y, Hiraki H, Watanabe K, Igarashi S, Shimamura K, Fukuda T, Suzuki T, Seito T: Preferential localization of c-kit product in tissue mast cells, basal cells of skin, epithelial cells of breast, small cell lung carcinoma and seminoma/dysgerminoma in human: immunohistochemical study on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues, *Virchows Arch* 1994, 424:135-141
247. Blay JY, Bonvalot S, Casali P, Choi H, Debiec-Richter M, Dei Tos AP, Emile JF, Gronchi A, Hogendoorn PC, Joensuu H, Le Cesne A, McClure J, Maurel J, Nupponen N, Ray-Coquard I, Reichardt P, Sciot R, Stroobants S, van Glabbeke M, van Oosterom A, Demetri GD: 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, 16:566-578
248. Graadt van Roggen JF, van Velthuysen ML, Hogendoorn PC: The histopathological differential diagnosis of gastrointestinal stromal tumours, *J Clin Pathol* 2001, 54:96-102
249. Gumurdulu D, Erdogan S, Kayaselcuk F, Seydaoglu G, Parsak CK, Demircan O, Tuncer I: Expression of COX-2, PCNA, Ki-67 and p53 in gastrointestinal stromal tumors and its relationship with histopathological parameters, *World J Gastroenterol* 2007, 13:426-431
250. Lane DP: Cancer. p53, guardian of the genome, *Nature* 1992, 358:15-16
251. Wang Q, Kou YW: Study of the expressions of p53 and bcl-2 genes, the telomerase activity and apoptosis in GIST patients, *World J Gastroenterol* 2007, 13:2626-2628
252. Panizo-Santos A, Sola I, Vega F, de Alava E, Lozano MD, Idoate MA, Pardo-Mindan J: Predicting Metastatic Risk of Gastrointestinal Stromal Tumors: Role of Cell Proliferation and Cell Cycle Regulatory Proteins, *Int J Surg Pathol* 2000, 8:133-144
253. Kontogianni K, Demonakou M, Kavantzias N, Lazaris A, Lariou K, Vourolakou C, Davaris P: Prognostic predictors of gastrointestinal stromal tumors: a multi-institutional analysis of 102 patients with definition of a prognostic index, *Eur J Surg Oncol* 2003, 29:548-556

254. Andersson J, Bumming P, Meis-Kindblom JM, Sihto H, Nupponen N, Joensuu H, Oden A, Gustavsson B, Kindblom LG, Nilsson B: Gastrointestinal stromal tumors with KIT exon 11 deletions are associated with poor prognosis, *Gastroenterology* 2006, 130:1573-1581
255. Fletcher JA, Rubin BP: KIT mutations in GIST, *Curr Opin Genet Dev* 2007, 17:3-7
256. Rubin BP, Heinrich MC, Corless CL: Gastrointestinal stromal tumour, *Lancet* 2007, 369:1731-1741
257. Lasota J, Miettinen M: Clinical significance of oncogenic KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumours, *Histopathology* 2008, 53:245-266
258. Lasota J, Miettinen M: KIT exon 11 deletion-inversions represent complex mutations in gastrointestinal stromal tumors, *Cancer Genet Cytogenet* 2007, 175:69-72
259. Lasota J, Kuban W, Wardelmann E, Debiec-Rychter M, Merkelbach-Bruse S, Sciort R, Rys J, Steigen SE, Iwanik K, Holden JA, Jerzak Vel Dobosz A, Schildhaus HU, Miettinen M: KIT codon 558 insertions in gastrointestinal stromal tumors. Analysis of 17 rare KIT mutants, *Hum Pathol* 2008, 39:1728-1736
260. Mol CD, Dougan DR, Schneider TR, Skene RJ, Kraus ML, Scheibe DN, Snell GP, Zou H, Sang BC, Wilson KP: Structural basis for the autoinhibition and STI-571 inhibition of c-Kit tyrosine kinase, *J Biol Chem* 2004, 279:31655-31663
261. Antonescu CR, Sommer G, Sarran L, Tschernyavsky SJ, Riedel E, Woodruff JM, Robson M, Maki R, Brennan MF, Ladanyi M, DeMatteo RP, Besmer P: 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, 9:3329-3337
262. McNaught AI, Allen JG, Healey DL, McCartney PJ, Coote MA, Wong TL, Craig JE, Green CM, Rait JL, Mackey DA: Accuracy and implications of a reported family history of glaucoma: experience from the Glaucoma Inheritance Study in Tasmania, *Arch Ophthalmol* 2000, 118:900-904
263. Price VE, Zielenska M, Chilton-MacNeill S, Smith CR, Pappo AS: Clinical and molecular characteristics of pediatric gastrointestinal stromal tumors (GISTs), *Pediatr Blood Cancer* 2005, 45:20-24
264. Vu HA, Xinh PT, Kikushima M, Zhu Y, Tokuhara M, Tani M, Shimizu T, Saito K, Tokunaga K, Sato Y: A recurrent duodenal gastrointestinal stromal tumor with a frameshift mutation resulting in a stop codon in KIT exon 13, *Genes Chromosomes Cancer* 2005, 42:179-183
265. Lasota J, vel Dobosz AJ, Wasag B, Wozniak A, Kraszewska E, Michej W, Ptaszynski K, Rutkowski P, Sarlomo-Rikala M, Steigen SE, Schneider-Stock R, Stachura J, Chosia M, Ogun G, Ruka W, Siedlecki JA, Miettinen M: Presence of homozygous KIT exon 11 mutations is strongly associated with malignant clinical behavior in gastrointestinal stromal tumors, *Lab Invest* 2007, 87:1029-1041
266. Kikuchi H, Yamashita K, Kawabata T, Yamamoto M, Hiramatsu Y, Kondo K, Baba M, Ohta M, Kamiya K, Tanaka T, Suzuki S, Kitagawa K, Kitagawa M, Sugimura H, Konno H: Immunohistochemical and genetic features of gastric and metastatic liver gastrointestinal stromal tumors: sequential analyses, *Cancer Sci* 2006, 97:127-132
267. Lasota J, Wozniak A, Sarlomo-Rikala M, Rys J, Kordek R, Nassar A, Sobin LH, Miettinen M: 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, 157:1091-1095
268. Lasota J, Corless CL, Heinrich MC, Debiec-Rychter M, Sciort R, Wardelmann E, Merkelbach-Bruse S, Schildhaus HU, Steigen SE, Stachura J, Wozniak A, Antonescu C,

- Daum O, Martin J, Del Muro JG, Miettinen M: 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, 21:476-484
269. He HY, Xiang YN, Li Y, Zhong HH, Wu BQ, Zheng J: [c-kit and PDGFRA mutations in 60 cases of gastrointestinal stromal tumors (GISTs)], *Beijing Da Xue Xue Bao* 2005, 37:320-324
270. Kinoshita K, Hirota S, Isozaki K, Nishitani A, Tsutsui S, Watabe K, Tamura S, Ishikawa T, Kanda T, Nishida T, Hayashi N: Characterization of tyrosine kinase I domain c-kit gene mutation Asn655Lys newly found in primary jejunal gastrointestinal stromal tumor, *Am J Gastroenterol* 2007, 102:1134-1136
271. Daum O, Grossmann P, Vanecek T, Sima R, Mukensnabl P, Michal M: Diagnostic morphological features of PDGFRA-mutated gastrointestinal stromal tumors: molecular genetic and histologic analysis of 60 cases of gastric gastrointestinal stromal tumors, *Ann Diagn Pathol* 2007, 11:27-33
272. Penzel R, Aulmann S, Moock M, Schwarzbach M, Rieker RJ, Mechtersheimer G: The location of KIT and PDGFRA gene mutations in gastrointestinal stromal tumours is site and phenotype associated, *J Clin Pathol* 2005, 58:634-639
273. Lasota J, Dansonka-Mieszkowska A, Sobin LH, Miettinen M: A great majority of GISTs with PDGFRA mutations represent gastric tumors of low or no malignant potential, *Lab Invest* 2004, 84:874-883
274. Haller F, Happel N, Schulten HJ, von Heydebreck A, Schwager S, Armbrust T, Langer C, Gunawan B, Doenecke D, Fuzesi L: Site-dependent differential KIT and PDGFRA expression in gastric and intestinal gastrointestinal stromal tumors, *Mod Pathol* 2007, 20:1103-1111
275. Nishida T, Hirota S: Biological and clinical review of stromal tumors in the gastrointestinal tract, *Histol Histopathol* 2000, 15:1293-1301
276. Sakurai S, Fukasawa T, Chong JM, Tanaka A, Fukayama M: C-kit gene abnormalities in gastrointestinal stromal tumors (tumors of interstitial cells of Cajal, *Jpn J Cancer Res* 1999, 90:1321-1328
277. Wardelmann E, Pauls K, Merkelbach-Bruse S, Hrychuk A, Losen I, Hohenberger P, Buttner R, Pietsch T: [Gastrointestinal stromal tumors carrying PDGFRalpha mutations occur preferentially in the stomach and exhibit an epithelioid or mixed phenotype], *Verh Dtsch Ges Pathol* 2004, 88:174-183
278. Lasota J, Kopczynski J, Sarlomo-Rikala M, Schneider-Stock R, Stachura T, Kordek R, Michal M, Boltze C, Roessner A, Stachura J, Miettinen M: KIT 1530ins6 mutation defines a subset of predominantly malignant gastrointestinal stromal tumors of intestinal origin, *Hum Pathol* 2003, 34:1306-1312
279. Miettinen M, Lasota J: Gastrointestinal stromal tumors: pathology and prognosis at different sites, *Semin Diagn Pathol* 2006, 23:70-83
280. Emile JF, Theou N, Tabone S, Cortez A, Terrier P, Chaumette MT, Julie C, Bertheau P, Lavergne-Slove A, Donadieu J, Barrier A, Le Cesne A, Debuire B, Lemoine A: Clinicopathologic, phenotypic, and genotypic characteristics of gastrointestinal mesenchymal tumors, *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004, 2:597-605
281. Judson I, Ma P, Peng B, Verweij J, Racine A, di Paola ED, van Glabbeke M, Dimitrijevic S, Scurr M, Dumez H, van Oosterom A: Imatinib pharmacokinetics in patients with gastrointestinal stromal tumour: a retrospective population pharmacokinetic study over time. EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group, *Cancer Chemother Pharmacol* 2005, 55:379-386

282. Therasse P, Le Cesne A, Van Glabbeke M, Verweij J, Judson I: RECIST vs. WHO: prospective comparison of response criteria in an EORTC phase II clinical trial investigating ET-743 in advanced soft tissue sarcoma, *Eur J Cancer* 2005, 41:1426-1430
283. Sciot R, Debiec-Rychter M, Daugaard S, Fisher C, Collin F, van Glabbeke M, Verweij J, Blay JY, Hogendoorn PC: Distribution and prognostic value of histopathologic data and immunohistochemical markers in gastrointestinal stromal tumours (GISTs): An analysis of the EORTC phase III trial of treatment of metastatic GISTs with imatinib mesylate, *Eur J Cancer* 2008, 44:1855-1860
284. Demetri GD: Identification and treatment of chemoresistant inoperable or metastatic GIST: experience with the selective tyrosine kinase inhibitor imatinib mesylate (STI571), *Eur J Cancer* 2002, 38 Suppl 5:S52-59
285. Van Glabbeke M, Verweij J, Casali PG, Le Cesne A, Hohenberger P, Ray-Coquard I, Schlemmer M, van Oosterom AT, Goldstein D, Sciot R, Hogendoorn PC, Brown M, Bertulli R, Judson IR: Initial and late resistance to imatinib in advanced gastrointestinal stromal tumors are predicted by different prognostic factors: a European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Italian Sarcoma Group-Australasian Gastrointestinal Trials Group study, *J Clin Oncol* 2005, 23:5795-5804
286. Nakagomi N, Hirota S: Juxtamembrane-type c-kit gene mutation found in aggressive systemic mastocytosis induces imatinib-resistant constitutive KIT activation, *Lab Invest* 2007,
287. Ma Y, Zeng S, Metcalfe DD, Akin C, Dimitrijevic S, Butterfield JH, McMahon G, Longley BJ: The c-KIT mutation causing human mastocytosis is resistant to STI571 and other KIT kinase inhibitors; kinases with enzymatic site mutations show different inhibitor sensitivity profiles than wild-type kinases and those with regulatory-type mutations, *Blood* 2002, 99:1741-1744
288. Chen LL, Trent JC, Wu EF, Fuller GN, Ramdas L, Zhang W, Raymond AK, Prieto VG, Oyedeji CO, Hunt KK, Pollock RE, Feig BW, Hayes KJ, Choi H, Macapinlac HA, Hittelman W, Velasco MA, Patel S, Burgess MA, Benjamin RS, Frazier ML: A missense mutation in KIT kinase domain 1 correlates with imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors, *Cancer Res* 2004, 64:5913-5919
289. Tamborini E, Bonadiman L, Greco A, Albertini V, Negri T, Gronchi A, Bertulli R, Colecchia M, Casali PG, Pierotti MA, Pilotti S: A new mutation in the KIT ATP pocket causes acquired resistance to imatinib in a gastrointestinal stromal tumor patient, *Gastroenterology* 2004, 127:294-299
290. Calabuig-Farinas S, Lopez-Guerrero JA, Ribera MJ, Navarro S, Ramos D, Pellin A, Llombart-Bosch A: Inflammatory fibroid polyp of the small bowel with a mutation in exon 12 of PDGFRalpha, *Virchows Arch* 2009, 454:327-331
291. Schildhaus HU, Cavlar T, Binot E, Buttner R, Wardelmann E, Merkelbach-Bruse S: Inflammatory fibroid polyps harbour mutations in the platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFRA) gene, *J Pathol* 2008, 216:176-182
292. Carney JA, Stratakis CA: Stromal, fibrous, and fatty gastrointestinal tumors in a patient with a PDGFRA gene mutation, *Am J Surg Pathol* 2008, 32:1412-1420
293. Lopez-Guerrero JA, Navarro S, Noguera R, Carda C, Farinas SC, Pellin A, Llombart-Bosch A: Mutational analysis of the c-KIT AND PDGFRalpha in a series of molecularly well-characterized synovial sarcomas, *Diagn Mol Pathol* 2005, 14:134-139
294. Christina E Høei-Hansen SMK, Vera M Abelar, Janne Kaern, Ewa Rajpert-De Meyts and Ragnhild A Lothe. : Ovarian dysgerminomas are characterised by frequent KIT mutations and abundant expression of pluripotency markers., *Molecular Cancer* 2007, 6:

295. Do I, Araujo ES, Kalil RK, Bacchini P, Bertoni F, Unni KK, Park YK: Protein expression of KIT and gene mutation of c-kit and PDGFRs in Ewing sarcomas, *Pathol Res Pract* 2007, 203:127-134
296. Chugh R, Dunn R, Zalupski MM, Biermann JS, Sondak VK, Mace JR, Leu KM, Chandler WF, Baker LH: Phase II study of 9-nitro-camptothecin in patients with advanced chordoma or soft tissue sarcoma, *J Clin Oncol* 2005, 23:3597-3604
297. Debiec-Rychter M, Wasag B, Stul M, De Wever I, Van Oosterom A, Hagemeyer A, Sciot R: Gastrointestinal stromal tumours (GISTs) negative for KIT (CD117 antigen) immunoreactivity, *J Pathol* 2004, 202:430-438
298. Kontogianni-Katsarou K, Lariou C, Tsompanaki E, Vourlakou C, Kairi-Vassilatou E, Mastoris C, Pantazi G, Kondi-Pafiti A: KIT-negative gastrointestinal stromal tumors with a long term follow-up: a new subgroup does exist, *World J Gastroenterol* 2007, 13:1098-1102
299. Motegi A, Sakurai S, Nakayama H, Sano T, Oyama T, Nakajima T: PKC theta, a novel immunohistochemical marker for gastrointestinal stromal tumors (GIST), especially useful for identifying KIT-negative tumors, *Pathol Int* 2005, 55:106-112
300. Kim KM, Kang DW, Moon WS, Park JB, Park CK, Sohn JH, Jeong JS, Cho MY, Jin SY, Choi JS, Kang DY: PKCtheta expression in gastrointestinal stromal tumor, *Mod Pathol* 2006, 19:1480-1486
301. 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, 33:437-446
302. Tzen CY, Mau BL: Analysis of CD117-negative gastrointestinal stromal tumors, *World J Gastroenterol* 2005, 11:1052-1055
303. Braconi C, Bracci R, Bearzi I, Bianchi F, Sabato S, Mandolesi A, Belvederesi L, Cascinu S, Valeri N, Cellerino R: Insulin-like growth factor (IGF) 1 and 2 help to predict disease outcome in GIST patients, *Ann Oncol* 2008, 19:1293-1298
304. Tarn C, Rink L, Merkel E, Flieder D, Pathak H, Koumbi D, Testa JR, Eisenberg B, von Mehren M, Godwin AK: Insulin-like growth factor 1 receptor is a potential therapeutic target for gastrointestinal stromal tumors, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, 105:8387-8392
305. Steigen SE, Eide TJ: Trends in incidence and survival of mesenchymal neoplasm of the digestive tract within a defined population of northern Norway, *Apmis* 2006, 114:192-200
306. Wu PC, Langerman A, Ryan CW, Hart J, Swiger S, Posner MC: Surgical treatment of gastrointestinal stromal tumors in the imatinib (STI-571) era, *Surgery* 2003, 134:656-665; discussion 665-656
307. van Oosterom AT, Judson IR, Verweij J, Stroobants S, Dumez H, Donato di Paola E, Sciot R, Van Glabbeke M, Dimitrijevic S, Nielsen OS: Update of phase I study of imatinib (STI571) in advanced soft tissue sarcomas and gastrointestinal stromal tumors: a report of the EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group, *Eur J Cancer* 2002, 38 Suppl 5:S83-87
308. Verweij J, van Oosterom A, Blay JY, Judson I, Rodenhuis S, van der Graaf W, Radford J, Le Cesne A, Hogendoorn PC, di Paola ED, Brown M, Nielsen OS: Imatinib mesylate (STI-571 Glivec, Gleevec) is an active agent for gastrointestinal stromal tumours, but does not yield responses in other soft-tissue sarcomas that are unselected for a molecular target. Results from an EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group phase II study, *Eur J Cancer* 2003, 39:2006-2011

309. Langer C, Gunawan B, Schuler P, Huber W, Fuzesi L, Becker H: Prognostic factors influencing surgical management and outcome of gastrointestinal stromal tumours, *Br J Surg* 2003, 90:332-339
310. Aparicio T, Boige V, Sabourin JC, Crenn P, Ducreux M, Le Cesne A, Bonvalot S: Prognostic factors after surgery of primary resectable gastrointestinal stromal tumours, *Eur J Surg Oncol* 2004, 30:1098-1103
311. Ryu MH, Kang YK, Jang SJ, Kim TW, Lee H, Kim JS, Park YH, Lee SS, Ryou BY, Chang HM, Lee JL, Yook JH, Kim BS, Lee JS: Prognostic significance of p53 gene mutations and protein overexpression in localized gastrointestinal stromal tumours, *Histopathology* 2007, 51:379-389
312. Hsu KH, Yang TM, Shan YS, Lin PW: Tumor size is a major determinant of recurrence in patients with resectable gastrointestinal stromal tumor, *Am J Surg* 2007, 194:148-152
313. Dematteo RP, Gold JS, Saran L, Gonen M, Liau KH, Maki RG, Singer S, Besmer P, Brennan MF, Antonescu CR: Tumor mitotic rate, size, and location independently predict recurrence after resection of primary gastrointestinal stromal tumor (GIST), *Cancer* 2008, 112:608-615
314. Ng EH, Pollock RE, Munsell MF, Atkinson EN, Romsdahl MM: Prognostic factors influencing survival in gastrointestinal leiomyosarcomas. Implications for surgical management and staging, *Ann Surg* 1992, 215:68-77
315. Ballarini C, Intra M, Ceretti AP, Prestipino F, Bianchi FM, Sparacio F, Berti E, Perrone S, Silva F: Gastrointestinal stromal tumors: a "benign" tumor with hepatic metastasis after 11 years, *Tumori* 1998, 84:78-81
316. Takahashi T, Nakajima K, Nishitani A, Souma Y, Hirota S, Sawa Y, Nishida T: An enhanced risk-group stratification system for more practical prognostication of clinically malignant gastrointestinal stromal tumors, *Int J Clin Oncol* 2007, 12:369-374
317. Huang HY, Li CF, Huang WW, Hu TH, Lin CN, Uen YH, Hsiung CY, Lu D: A modification of NIH consensus criteria to better distinguish the highly lethal subset of primary localized gastrointestinal stromal tumors: a subdivision of the original high-risk group on the basis of outcome, *Surgery* 2007, 141:748-756
318. Rutkowski P, Debiec-Rychter M, Nowecki ZI, Wozniak A, Michej W, Limon J, Siedlecki JA, Jerzak Vel Dobosz A, Grzesiakowska U, Nasierowska-Guttmejer A, Sygut J, Nyckowski P, Krawczyk M, Ruka W: Different factors are responsible for predicting relapses after primary tumors resection and for imatinib treatment outcomes in gastrointestinal stromal tumors, *Med Sci Monit* 2007, 13:CR515-522
319. Wu TJ, Lee LY, Yeh CN, Wu PY, Chao TC, Hwang TL, Jan YY, Chen MF: Surgical treatment and prognostic analysis for gastrointestinal stromal tumors (GISTs) of the small intestine: before the era of imatinib mesylate, *BMC Gastroenterol* 2006, 6:29
320. Di Vizio D, Demichelis F, Simonetti S, Pettinato G, Terracciano L, Tornillo L, Freeman MR, Insabato L: Skp2 expression is associated with high risk and elevated Ki67 expression in gastrointestinal stromal tumours, *BMC Cancer* 2008, 8:134
321. Hillemanns M, Pasold S, Bottcher K, Hofler H: [Prognostic factors of gastrointestinal stromal tumors of the stomach], *Verh Dtsch Ges Pathol* 1998, 82:261-266
322. Wang X, Mori I, Tang W, Utsunomiya H, Nakamura M, Nakamura Y, Zhou G, Kennichi K: Helpful parameter for malignant potential of gastrointestinal stromal tumors (GIST), *Jpn J Clin Oncol* 2002, 32:347-351

323. Keun Park C, Lee EJ, Kim M, Lim HY, Choi DI, Noh JH, Sohn TS, Kim S, Kim MJ, Lee HK, Kim KM: Prognostic stratification of high-risk gastrointestinal stromal tumors in the era of targeted therapy, *Ann Surg* 2008, 247:1011-1018
324. McAuliffe JC, Hunt KK, Lazar AJ, Choi H, Qiao W, Thall P, Pollock RE, Benjamin RS, Trent JC: A randomized, phase II study of preoperative plus postoperative imatinib in GIST: evidence of rapid radiographic response and temporal induction of tumor cell apoptosis, *Ann Surg Oncol* 2009, 16:910-919
325. Sym SJ, Ryu MH, Lee JL, Chang HM, Kim TW, Kim HC, Kim KH, Yook JH, Kim BS, Kang YK: Surgical intervention following imatinib treatment in patients with advanced gastrointestinal stromal tumors (GISTs), *J Surg Oncol* 2008, 98:27-33
326. Ebihara Y, Okushiba S, Kawarada Y, Kitashiro S, Katoh H, Kondo S: Neoadjuvant imatinib in a gastrointestinal stromal tumor of the rectum: report of a case, *Surg Today* 2008, 38:174-177
327. Date RS, Stylianides NA, Pursnani KG, Ward JB, Mughal MM: Management of gastrointestinal stromal tumours in the Imatinib era: a surgeon's perspective, *World J Surg Oncol* 2008, 6:77
328. Blanke CD, Rankin C, Demetri GD, Ryan CW, von Mehren M, Benjamin RS, Raymond AK, Bramwell VH, Baker LH, Maki RG, Tanaka M, Hecht JR, Heinrich MC, Fletcher CD, Crowley JJ, Borden EC: Phase III randomized, intergroup trial assessing imatinib mesylate at two dose levels in patients with unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors expressing the kit receptor tyrosine kinase: S0033, *J Clin Oncol* 2008, 26:626-632
329. Imamura M, Yamamoto H, Nakamura N, Oda Y, Yao T, Kakeji Y, Baba H, Maehara Y, Tsuneyoshi M: Prognostic significance of angiogenesis in gastrointestinal stromal tumor, *Mod Pathol* 2007, 20:529-537
330. Koay MH, Goh YW, Iacopetta B, Grieu F, Segal A, Sterrett GF, Platten M, Spagnolo DV: Gastrointestinal stromal tumours (GISTs): a clinicopathological and molecular study of 66 cases, *Pathology* 2005, 37:22-31
331. Dematteo RP, Heinrich MC, El-Rifai WM, Demetri G: Clinical management of gastrointestinal stromal tumors: before and after STI-571, *Hum Pathol* 2002, 33:466-477
332. Trent JC, Benjamin RS: New developments in gastrointestinal stromal tumor, *Curr Opin Oncol* 2006, 18:386-395
333. Bumming P, Ahlman H, Andersson J, Meis-Kindblom JM, Kindblom LG, Nilsson B: Population-based study of the diagnosis and treatment of gastrointestinal stromal tumours, *Br J Surg* 2006, 93:836-843
334. Ozguc H, Yilmazlar T, Yerci O, Soylu R, Tumay V, Filiz G, Zorluoglu A: Analysis of prognostic and immunohistochemical factors in gastrointestinal stromal tumors with malignant potential, *J Gastrointest Surg* 2005, 9:418-429
335. Liu FY, Qi JP, Xu FL, Wu AP: Clinicopathological and immunohistochemical analysis of gastrointestinal stromal tumor, *World J Gastroenterol* 2006, 12:4161-4165