

DESARROLLO DE UN MÉTODO
DIAGNÓSTICO DE LOS
TUMORES DEL ESTROMA
GASTROINTESTINAL (GIST)



Ruth González Sánchez

2016

“El éxito es aprender a ir de fracaso en fracaso sin
desesperarse”

Winston Churchill.

AGRADECIMIENTOS:

Quiero daros las gracias por poder estar escribiendo estas palabras, porque eso quiere decir que lo hemos conseguido.

Quiero dar las gracias a Javier, mi director y a Javi y a Clara, mis codirectores.

A Javier, por la gran oportunidad, porque confiaste en mi sin conocerme y por creer en mí en todo momento. Por tu optimismo, incluso en los momentos difíciles y por compartir esa pasión y alegría por el trabajo.

A Javi, por hacerla realidad. Por tu paciencia (sobre todo al principio), por tus ánimos, por las apuestas que rompían la rutina, por tu ayuda y apoyo a cada paso y por haberla hecho tuya también.

A Clara, porque sin ti esto no hubiese ocurrido. Por haber buscado la oportunidad y por respaldarme desde el principio, por ser mi apoyo.

A Dr. Pedro Muñoz, por su inestimable ayuda en el análisis estadístico, sin ella no habría sido posible.

Gracias al equipo de Molecular (Montse, Estibaliz, Yolanda, Kety, Marilo, y Emilia) que me acogió como una más desde el primer día y siempre tenían palabras de ánimo, aliento y una mano dispuesta para la ayuda. En especial a mi Zipi, Saray, gracias por todos estos años de ayuda (trabajo y enseñanza, vales mucho!), de risas, complicidad y lo más importante, de amistad. A Clara Caballero, por tu ayuda y esfuerzo, y por la ilusión con la que te involucraste en el proyecto. A Servando, porque contigo empecé a rodar.

A “conexión Santander” y Mabel, gracias a todas por vuestra amistad. Por aguantarme durante tantos años y apoyarme siempre, por tantos buenos momentos y alguna que otra pena, por todo lo que hemos compartido... por ser mi familia en el norte.

A mi familia, porque sois mi “coche escoba” y por largo, duro o lejos que esté el camino que escoja, siempre estáis ahí, empujando, animando, ilusionados con cada nuevo paso.

A Alex, porque “somos un equipo y juntos podemos con todo”. Gracias por tu paciencia infinita y tu sonrisa permanente, por ser el pilar de mi vida y por creer en mí más que yo misma.

“Me pregunto si las estrellas se iluminan con el fin de que algún día, cada uno pueda encontrar la suya”

“El Principito” Antoine de Saint-Exupéry

ABREVIATURAS:

Cp: ciclo umbral (del inglés *crossing point*)

GI: gastrointestinal.

GIST: tumor estromal gastrointestinal (del inglés, *gastrointestinal stromal tumors*)

H&E: hematoxilina eosina

IHQ: inmunohistoquímica.

MUT: mutado

NA: no analizado

NV: no valorable

SG: supervivencia global

THP: tiempo hasta progresión

TK: tirosin quinasa

TKI: inhibidores de la tirosin quinasa (del inglés, *tyrosin kinase inhibitor*)

WT: ausencia de mutación (del inglés, *wild-type*)

RESUMEN

INTRODUCCIÓN:

El término GIST responde a la expresión inglesa “Gastrointestinal Stromal Tumor”. Durante décadas esta neoplasia fue considerada como un tumor mesenquimal confuso, a menudo diagnosticado erróneamente como leiomioma, leiomioblastoma, y que, por tanto, respondía mal a tratamientos tanto con quimioterapia como con radioterapia.

La mayoría de los GIST se caracterizan molecularmente por presentar mutaciones en *CKIT* (60-80%) o *PDGFRA* (5-15%). (1-4) La distribución y tipo de mutación pueden afectar al grado de la activación constitutiva de la proteína(5), lo que a su vez genera diferencias en el crecimiento y la agresividad del tumor.

El análisis de la curva de fusión de un fragmento de ADN, mediante lecturas de alta resolución (HRM) se fundamenta en la propiedad de desnaturalización o fusión de la doble hebra de ADN, en condiciones de pH y calor muy concretas. Su aplicación en Biología Molecular ha supuesto un gran avance pues permite caracterizar de una manera más fácil y sencilla diferencias genéticas entre distintas muestras.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS:

El análisis de las curvas de fusión por alta resolución puede ser una herramienta óptima para la detección de mutaciones en los tumores del estroma gastrointestinal, al ser una metodología sencilla, rápida, barata y con una altísima sensibilidad. Como tal, podría ser contemplada su implantación en la rutina diagnóstica para la evaluación de dichos tumores.

Con el fin de evaluar la citada hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Realización de técnicas inmunohistoquímicas para los marcadores *CKIT*, *PDGFRA* y *DOG-1* en una serie de pacientes diagnosticados de GIST.
2. Realización del análisis molecular de las curvas de fusión de alta resolución para los genes *CKIT* y *PDGFRA* en todos los casos.

3. Correlacionar los resultados inmunohistoquímicos para *CKIT*, *PDGFRA* y *DOG-1* con los hallazgos mutacionales para *CKIT* y *PDGFRA* obtenidos mediante HRM.
4. Confirmar los resultados de HRM mediante métodos de secuenciación masiva.

Como objetivos secundarios nos planteamos:

- a) Establecer el método óptimo de extracción y purificación de ADN para el estudio mutacional mediante HRM de los tumores a partir de muestras clínicas.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se seleccionaron un total de 50 muestras correspondientes a 50 pacientes previamente diagnosticados de tumor del estroma gastrointestinal (GIST) en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla entre los años 1993 y 2011 ambos inclusive. De los 50 casos, descartamos 13 debido a discrepancias en el diagnóstico diferido en la nueva revisión diagnóstica. Estos 13 casos fueron analizados como un grupo aparte.

Se visualizaron nuevamente todas las preparaciones histológicas por dos patólogos independientes con dos objetivos principales, en primer lugar confirmar el diagnóstico previo (ya que se basaba en diagnósticos de diferentes patólogos) y en segundo lugar elegir un bloque en el que tuviéramos una mayor representación de células tumorales para el análisis molecular. Como controles negativos se seleccionaron casos con representación tisular representativa de las diferentes localizaciones y ausencia de células tumorales.

Para cada uno de los casos se realizó el siguiente protocolo:

Inmunotinción para la expresión de *KIT*, *PDGFRA* y *DOG1* (marcadores básicos de GIST)

Extracción de ADN

PCR a tiempo Real y análisis por curvas de fusión de alta resolución (HRM) de los genes *CKIT* y *PDGFRA*

Secuenciación de los principales exones de los genes en estudio mediante técnica de secuenciación masiva

RESULTADOS:

En cuanto a la distribución por sexos de la población en estudio, 19 tumores de los 37 analizados se detectaron en varones (51,35%) y los restantes en mujeres (48,65%).

Por rango de edad, los pacientes reclutados tenían entre 24 y 84 años, con una media de $60,4 \pm 15,9$ años y una mediana de 60 años. (Figura 17). Nuestra población presentó una mayor frecuencia en el intervalo comprendido entre los 60 y los 81 años.

El porcentaje total de expresión de CKIT en nuestra serie fue del 97,3%. El estudio inmunohistoquímico de DOG-1 demostró un porcentaje de positividad del 86,5% con un patrón de marcaje similar al de CKIT sin diferencias significativas, mientras que PDGFRA se diferenció significativamente y presentó un porcentaje de marcaje muy inferior al resto, del solo 54,1%.

El análisis estadístico demostró una homogeneidad intramuestral mayor en el análisis de las muestras extraídas con el kit de Roche así como un inicio de la amplificación más temprano, al compararla con sus homólogas extraídas con el kit de Qiagen. Aunque estadísticamente no existe una diferencia significativa ($p=0,069$, test de Wilcoxon) debido al limitado número muestral.

Al igual que se presenta en la literatura científica, el exón 11 de *CKIT*, presentó una mayor frecuencia de mutaciones (44,8%), con un total de 13 muestras mutadas de 37 casos. Tras el exón 11, el análisis del exón 9 mostró un porcentaje de muestras mutadas del 25%, el exón 13 un 18,8% de mutaciones mientras que para el exón 17 sólo se observó mutaciones en un 11,1% de las muestras analizadas. Respecto a *PDGFRA*, se encontraron mutaciones del exón 12 en el 26,5% de las muestras. El exón 18, por su parte presentó una tasa de mutaciones del 21,4%

Debido a que la secuenciación permite un análisis más detallado del tipo de alteraciones moleculares encontradas, se observó en la serie una gran presencia de polimorfismos de nucleótido simple silenciosos (SNPs). El 81,08% de los pacientes presentó mutación en *CKIT* o *PDGFRA* (30/37), de las cuales el 43,24% fueron mutaciones activas (considerándose activa aquellas mutaciones que implican un cambio en la funcionalidad de la proteína) y el 37,84% correspondió a pacientes con SNPs. El 18,92% restante de los pacientes no presentaron alteración alguna en los genes analizados (WT).

Lo más destacable del estudio de secuenciación masiva fue el alto índice de mutaciones silenciosas encontradas. Se describieron 88 SNPs silenciosos en los

diferentes exones estudiados de *CKIT* y *PDGFRA*. Treinta muestras del total analizadas presentaron una o más sustituciones silenciosas (81,1%). Varias de esas muestras, presentaron a su vez coincidencia con mutaciones activas.

Dentro de las mutaciones silenciosas se encontró un mayor porcentaje de sustituciones en el gen *PDGFRA* (93,18% de mutaciones) y concretamente en el exón 12 (80,68% de mutaciones). Cabe destacar la presencia de una alteración repetitiva presente en los codones 569 y 579 (exón 12, c.1707A>G/c.1737G>A) que se observó en el 54 % de las muestras (20 de 37) de la que no consta referencia ni por tanto frecuencia de aparición por no haberse descrito previamente.

El porcentaje global de concordancia entra el HRM y la secuenciación, no presentó una correspondencia estadística, ya que valorando tanto las mutaciones activas y como las mutaciones silenciosas sólo se encontró una equivalencia máxima del 60%.

CONCLUSIONES

- 1) Recomendamos la realización de un panel inmunohistoquímico con DOG-1 y *CKIT* como herramienta para el diagnóstico de los GISTs. El uso de *PDGFRA*, no resulta fiable para el diagnóstico certero de los GIST.
- 2) Aunque con un menor rendimiento en la extracción, el método de extracción DNA Sample Preparation Kit de ROCHE presenta una mayor homogeneidad y reproducibilidad en muestras fijadas en formol e incluidas en parafina.
- 3) Hemos hallado menor porcentaje de mutaciones en *CKIT* que lo descrito en la bibliografía. En el 81,08% de los tumores estudiados se hallaron mutaciones, de las cuales el 43,24% correspondieron a mutaciones activas y el 37,84% restante a variaciones silenciosas.
- 4) Describimos dos SNPs repetitivos en el exón 12 de *PDGFRA* en un 54% de los pacientes que no han sido descritos previamente.
- 5) La concordancia obtenida entre el HRM y la secuenciación masiva fue del 37,08% y aumentó hasta un 60% al tomar en consideración los SNPs.
- 6) El alto porcentaje de variaciones silenciosas crea la necesidad de utilizar otra técnica distintas al HRM para el análisis del perfil mutacional de los GIST, ya que esta tecnología no permite discriminar entre mutaciones activas y variación silenciosa.

ÍNDICE

I. Introducción	1
1.1. Sarcomas	4
1.1.1 Tumores del Estroma Gastrointestinal, GIST	4
1.1.1.1. Epidemiología y manifestaciones clínicas	5
1.1.1.2. Histopatogénesis.	6
1.1.1.3. Patrón de inmunotinción.	8
1.1.1.4. CKIT y PDGFRA	12
1.1.1.5. Tratamiento del GIST.	14
1.1.1.5.1. Imatinib.	15
1.1.1.5.2. Otros fármacos utilizados en el tratamiento del GIST.	16
1.2. Metodología para la detección de mutaciones.	16
1.2.1. Curvas de fusión de alta resolución (HRM)	16
1.2.1.1. Colorantes intercalantes.	19
1.2.1.2. Aplicaciones de HRM.	21
1.2.2. Secuenciación.	24
1.2.2.1. Métodos clásicos de secuenciación.	24
1.2.2.1.1. Método de degradación química, Maxam y Gilbert.	24
1.2.2.1.2. Método enzimático de Sanger, Nicklen y Coulson.	25
1.2.2.2. Secuenciación automática.	26
1.2.2.3. Otros métodos de secuenciación automatizada.	27
1.2.2.3.1. Pirosecuenciación.	27
1.2.2.3.1.1. Secuenciación de nueva generación.	28

II. Hipótesis y Objetivos	31
III. Material y Métodos	35
3.1. Muestras.	37
3.2. Inmunohistoquímica.	38
3.3. Extracción y purificación del ADN.	38
3.3.1 Extracción con QIAamp® DNA mini kit (QIAGEN, Cat. No. 51306)	39
3.3.2 Extracción con DNA sample preparation kit, (COBAS, ROCHE Diagnostic, Ref. P/N: 05985536190)	40
3.3.3 Extracción con Kit de purificación de DNA (Genomica, Madrid, Ref: BK-0295-050-01)	41
3.3.4 Comparación entre los métodos de extracción de DNA y elección de concentración de trabajo.	42
3.4. PCR a tiempo real y HRM.	43
3.5. Secuenciación.	46
3.6. Evaluación de resultados.	48
IV. Resultados	51
4.1. Descripción general de la población en estudio.	53
4.2. Perfil inmunohistoquímico de los GIST.	55
4.3. Optimización de la técnica de HRM.	56
4.3.1. Análisis de la extracción de ADN.	57
4.4. Análisis de las curvas de fusión de alta resolución.	61
4.5. Estudio de secuenciación masiva.	64

4.6. Tumores discordantes en el diagnóstico de GIST.	69
4.7. Análisis comparativo de HRM, secuenciación masiva e inmunohistoquímica.	70
V. Discusión	73
5.1. Parámetros clínicos.	75
5.2. Inmunohistoquímica en GIST.	77
5.3. Método de extracción.	79
5.4. Hallazgos moleculares.	81
VI. Conclusiones	87
VII. Bibliografía	91
VIII. Anexos	101

I. INTRODUCCIÓN

El término GIST responde a la expresión inglesa “Gastrointestinal Stromal Tumor”. Durante décadas esta neoplasia fue considerada como un tumor mesenquimal confuso, a menudo diagnosticado erróneamente como leiomioma, leiomioblastoma o leiomioblastoma, y que, por tanto, respondían mal a tratamientos tanto con quimioterapia como con radioterapia, susceptibles por tanto únicamente de respuesta a la intervención quirúrgica

En los últimos 20 años el manejo de esta enfermedad ha sufrido una revolución asombrosa, no sólo en el conocimiento de su etiología, evolución clínica y mecanismos moleculares si no también en lo referente a su tratamiento. El descubrimiento de su patogénesis molecular, asociada a la presencia de mutaciones en el gen *CKIT*, abrió el camino hacia un diagnóstico más certero y un tratamiento más eficaz mediante el uso de inhibidores específicos de la actividad tirosina quinasa como el STI 571 (Imatinib mesilato, Glivec), utilizados hasta entonces únicamente para el tratamiento de la Leucemia Mieloide Crónica (LMC).

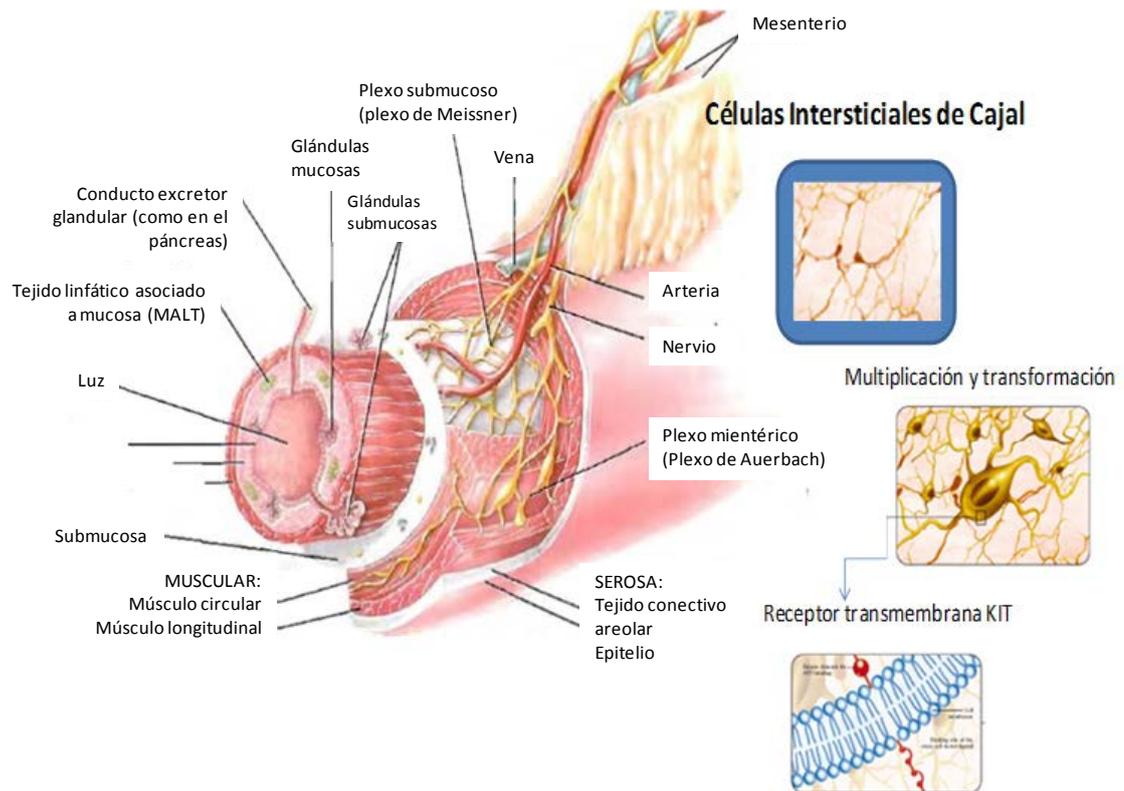
1.1 Sarcomas.

Los sarcomas son tumores de origen mesenquimal que se desarrollan principalmente en el hueso y en los tejidos blandos. Son un grupo heterogéneo y poco frecuente que suponen menos del 5% de las neoplasias de adultos y el 10% de los tumores infantiles. Desde el punto de vista de su clasificación histológica existen más de cien variantes diferentes, mientras que desde el punto de vista molecular se agrupan en dos tipos principales:

- Sarcomas con alteraciones génicas específicas. Generalmente se trata de traslocaciones, como la t (11; 22) que fusiona los genes *EWS* y *FLII* en el sarcoma de Ewing), o bien mutaciones puntuales específicas como el caso de *CKIT* en los tumores del estroma gastrointestinal (GIST).
- Sarcomas con alteraciones genéticas inespecíficas y cariotipos complejos.

1.1.1. Tumor del estroma gastrointestinal; GIST.

El término de GIST fue utilizado por primera vez en 1983 por Mazur y Clark(6), para describir un tipo tumoral no epitelial del tubo digestivo. Estos tumores carecían tanto de rasgos ultraestructurales de músculo liso como características inmunohistoquímicas de células de Schwann. No fue hasta 1998, sin embargo, cuando Kindblom(7) vinculó estos tumores con una población de células poco 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. Estas células forman una red localizada en el plexo de Auerbach regulando la comunicación entre las neuronas y las fibras musculares lisas y son necesarias para la regulación de los movimientos peristálticos intestinales (Figura 1). Según algunos autores la célula tumoral progenitora tendría la capacidad de diferenciarse indistintamente hacia una célula muscular lisa o intersticial de Cajal(2). Aún no existe una evidencia demostrada que permita asegurar la presencia de estas células precursoras de los GIST, no obstante, la hipótesis de su existencia y su vinculación con el origen tumoral se sustenta en el hecho de que desde el punto de vista inmunohistoquímico las CIC y los GIST presentan marcadores celulares comunes como *CKIT*(4). Sin embargo, a pesar de este hecho, la posibilidad de que exista un precursor común es un debate que aun está en discusión.



Figural: Esquema del tubo digestivo y localización de las Células Intersticiales de Cajal(CIC).

1.1.1.1. Epidemiología y manifestaciones clínicas.

Aunque su correcto diagnóstico es relativamente reciente, los GIST se han convertido en los tumores mesenquimales más frecuentes del tracto gastrointestinal (GI). Su incidencia en España se estima en 457 casos al año, es decir, 1,1 casos por cada 100.000 habitantes. Aun no existen datos concretos acerca de su prevalencia mundial debido, principalmente, a que su diagnóstico certero es muy novedoso; en general se cree que representan entre el 1% y el 3% de los tumores malignos gastrointestinales (www.seom.org), y que se dan alrededor de 6000 nuevos caso al año en Estados Unidos(8).

Los tumores del estroma gastrointestinal se pueden desarrollar en cualquier parte del aparato digestivo, desde el esófago hasta el recto, aunque su localización más frecuente es en el estomago (60%) e intestino delgado (20-30%), especialmente en yeyuno e íleon, siendo su incidencia en intestino grueso y esófago sólo del 2 al 5%. Los tumores del estroma localizados fuera del tracto gastrointestinal, como en vesícula biliar o páncreas, son excepcionales. Localizaciones mesentéricas, omentales o

retoperitoneales, en la mayoría de los casos, se deben principalmente a extensiones del tumor primario o a metástasis, más que a un tumor primario(9).

Este tipo de tumor presenta una mayor incidencia en pacientes entre los 50 y los 60 años, el diagnóstico en pacientes menores de 40 años resulta raro(10), aunque en la literatura científica se han descrito casos de GIST pediátricos(11).La distribución de los GIST atendiendo al sexo de los pacientes ha generado un debate abierto, pues existen trabajos que presentan una prevalencia significativamente mayor en varones(12), mientras que otros análisis defienden lo contrario(13).

Las manifestaciones clínicas de los GIST son muy variables y dependen del tamaño y la localización del tumor. Generalmente, los de pequeño tamaño se suelen descubrir de forma accidental cuando los pacientes son sometidos a pruebas de imagen o a cirugías por otras causas. Sin embargo, los de gran tamaño (que pueden llegar a presentarse como masas palpables en el abdomen) pueden cursar con distensión abdominal, síndrome oclusivo o anemia provocada por hemorragias de las mucosas del tracto gastrointestinal.

Además de una entidad en sí misma, los GIST pueden encontrarse como componente de otros síndromes como la neurofibromatosis tipo I, la triada de Carney o el síndrome familiar de GIST, en un 5% de los casos(9).

1.1.1.2. Histopatogénesis

Los GIST son tumores con tamaños heterogéneos, que pueden oscilar desde unos pocos milímetros hasta más de 30 cm, con una media entre los 5 y 8cm(14).En pieza, presentan una forma redondeada, lobulada o multilobulada. Al corte macroscópico, son tumores bien delimitados, no encapsulados y blanquecinos; pudiendo mostrar áreas de hemorragia, necrosis y, raramente, cambios quísticos.

Una de las principales características microscópicas de los GIST -que los diferencia histológicamente de los leiomiomas, leiomiomas y schwannomas- es que se trata de tumores mucho más celulares. Además, también presentan una actividad mitótica más variable que la descrita para otros sarcomas gastrointestinales(15, 16).En cuanto a su caracterización microscópica, se ha descrito que aproximadamente el 70% de los GIST presentan un patrón histológico fusocelular, el 20% un patrón epiteloide y un 5% corresponden a tipos mixtos (fusocelular y epiteloide). Además se han publicado estudios que describen rasgos microscópicos relacionados con el origen tumoral, como

por ejemplo que la mayoría de los GIST intestinales presenten un patrón fusocelular, mostrando agregados eosinófilos PAS positivos de fibras de colágeno con frecuentes áreas anucleares intratumorales(17-19).

- Los GIST con diferenciación fusocelular están compuestos por células dispuestas en un patrón de nido o mantos sólidos. Se caracterizan por presentar células con una morfología elongada, uniformes que poseen citoplasma pálido, eosinófilo, asemejando células musculares lisas. Los núcleos son redondos, con cromatina laxa y un nucléolo poco destacado, y en ocasiones, pueden presentar en forma focal algunas células gigantes multinucleadas(20). Pueden observarse, también, signos de reabsorción con transformación quística, en los tumores de gran tamaño (Fig.2a).
- Los GIST con diferenciación epitelioides poseen células con un aspecto poligonal y un 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. (Fig.2b).
- GIST con variante mixta se combinan áreas epitelioides y fusocelulares, incluso se encuentran células de transición que progresivamente van adoptando una apariencia epitelioides a partir de formas fusiformes o viceversa. Básicamente carece de significado pronóstico y biológicamente su comportamiento es semejante a los tipos puros.

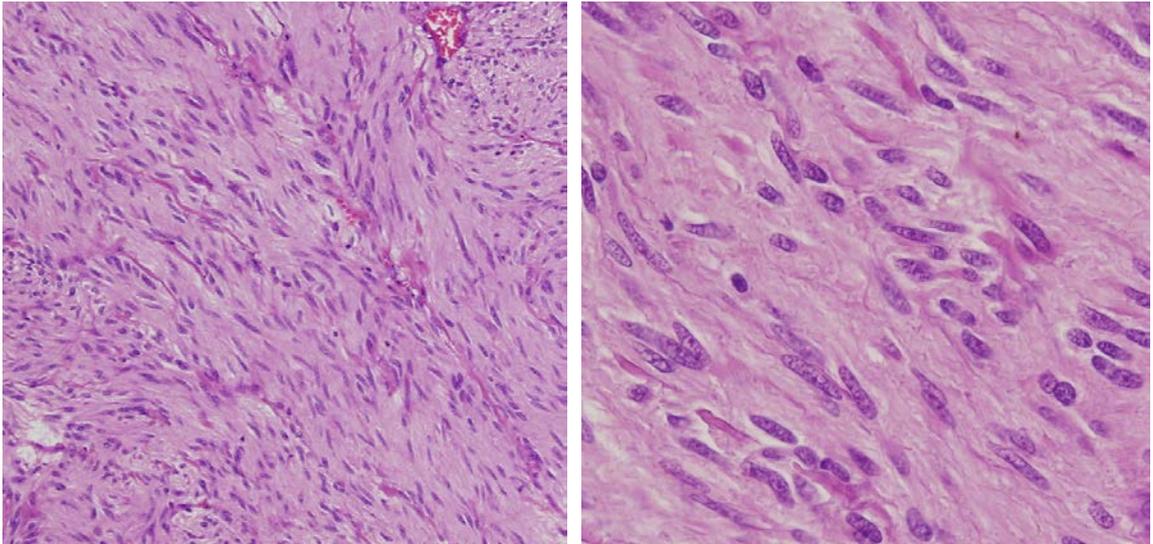


Fig.2a: HE GIST Fusocelular

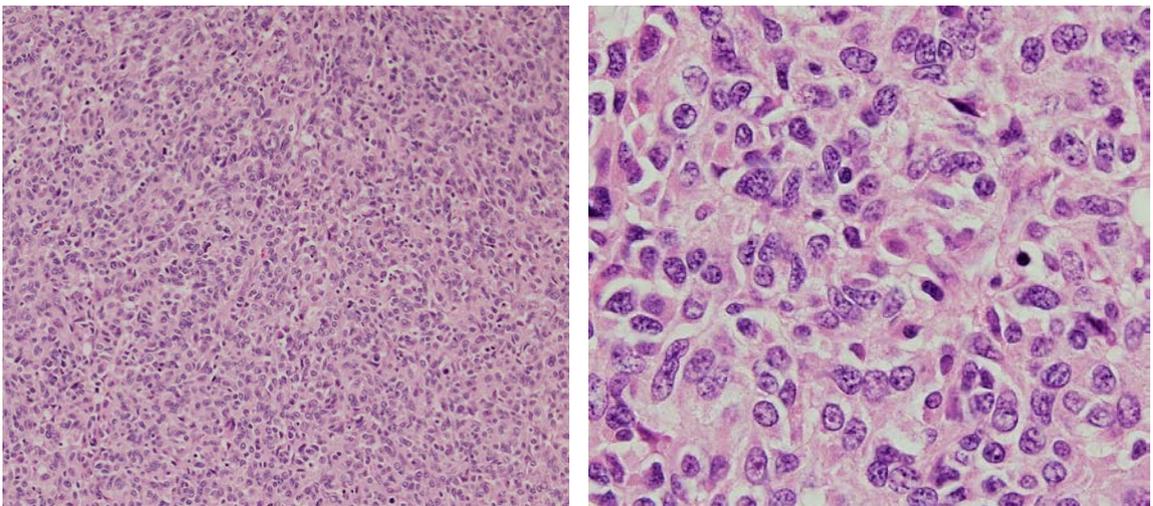


Fig. 2b: HE GIST Epiteloide

1.1.1.3. Patrón de inmunotinción.

Desde que en 2002 se publicara la guía consenso del *National Institute of Health* (NIH), el principal criterio histológico para clasificar un tumor como GIST es la presencia de inmunomarcaje frente al CKIT que se considera positivo cuando se observa la marca, de manera específica, citoplasmática y/o membranosa en las células

tumorales. El marcaje debe de ser intenso, aunque se admite que algunos tumores expresan la proteína con una tinción citoplasmática más débil y difusa coexistiendo con un patrón paranuclear (patrón Golgi-like) y en las membranas celulares con tinción circunferencial ya sea completa o incompleta, (CKIT pharmDx™-Interpretation Manual). En uno u otro caso, la tinción debe presentarse en al menos el 90% de las células tumorales(7, 21) (Fig.3a). Sin embargo, existen casos en los que la tinción es más débil, además de tener una menor concentración de células positivas (20%-30%), pudiendo, por tanto, ser motivo de confusión y deberán ser evaluados de modo más riguroso. De igual manera pueden darse casos en los que el inmunomarcaje frente a CKIT sea negativo (5%) pero que deben de tenerse en consideración(14, 22, 23), no obstante, el hecho de que la inmunohistoquímica sea negativa pueda obedecer a motivos distintos a la ausencia de mutaciones o de sobreexpresión de CKIT, como pueden ser la escasez de representación tumoral, la pérdida de antigenicidad por defectos en el procesamiento histológico o bien alteraciones postratamiento. Además, existen algunos tumores GIST que pueden mostrar una sobreexpresión de CKIT limitada a un porcentaje escaso de células tumorales (5-20%), lo cual puede justificar algunos casos inmunohistoquímicamente negativos(22, 24). Por tanto, aunque la expresión de CKIT es una de las características que mejor define a este tipo de tumores, al no tratarse de un marcador celular o tumoral específico no se considera un requisito imprescindible para que un tumor sea diagnosticado como GIST.

En el tracto digestivo normal, la inmunoreacción positiva al PDGFRA (Fig. 3b) muestra una distribución similar a la observada con otras proteínas, estando presente en células ganglionares, fibras nerviosas y células de Schwann(25). En los GIST, el patrón de expresión del PDGFRA es variable pudiendo ser citoplasmático, para nuclear (patrón Golgi-like) o una combinación de ambos(26). El inmunomarcaje de PDGFRA se ha considerado como no específico y con escaso papel en el diagnóstico de GIST, sin embargo, estudios recientes han demostrado que un patrón de tinción tipo Golgi, ya sea para CKIT o PDGFRA pueden ser predictivos del estado mutacional(26-29).

Recientemente, ha surgido un nuevo marcador que parece más eficiente para el diagnóstico de los GIST. Se basa en la expresión de un gen llamado “*Discovered on GIST*” (DOG1) descrito en estudios de expresión(30-32) (Fig. 3c). Aunque no se conoce aun su función en esta patología, esta proteína está expresada, según la bibliografía, en una mayor proporción que CKIT en tumores GIST. DOG1 es, además, independiente del estado mutacional de CKIT y no presenta cruzamientos con otros sarcomas debido a

que su expresión es nula en la mayoría de estas neoplasias. DOG1, por tanto, parece presentar una mayor especificidad y sensibilidad que CKIT para el diagnóstico certero de tumores GIST(32-35).

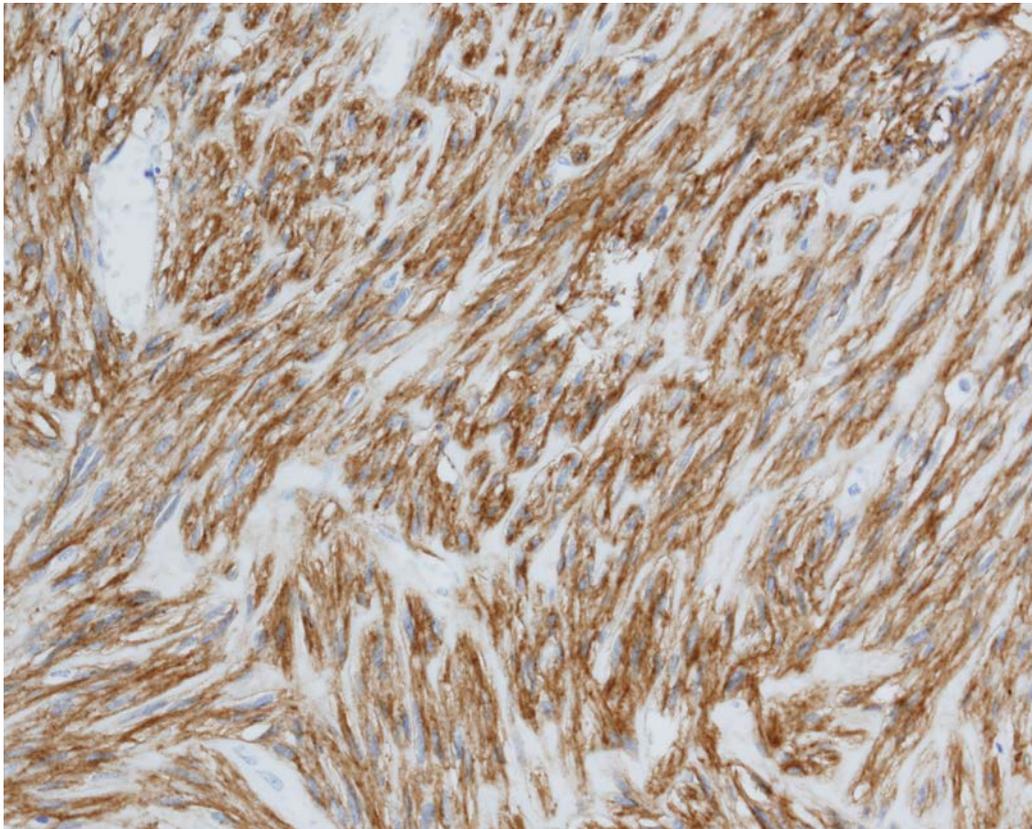


Fig. 3ª: inmunotinción CKIT

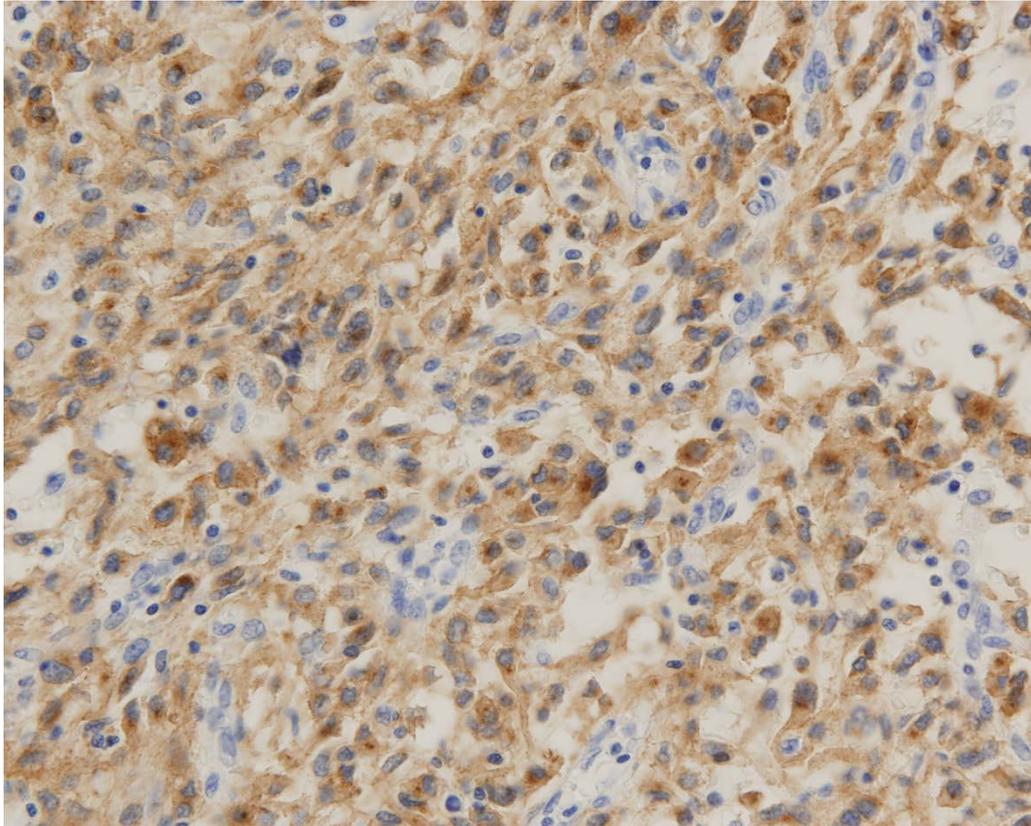


Fig. 3b: inmunotinción PDGFRA

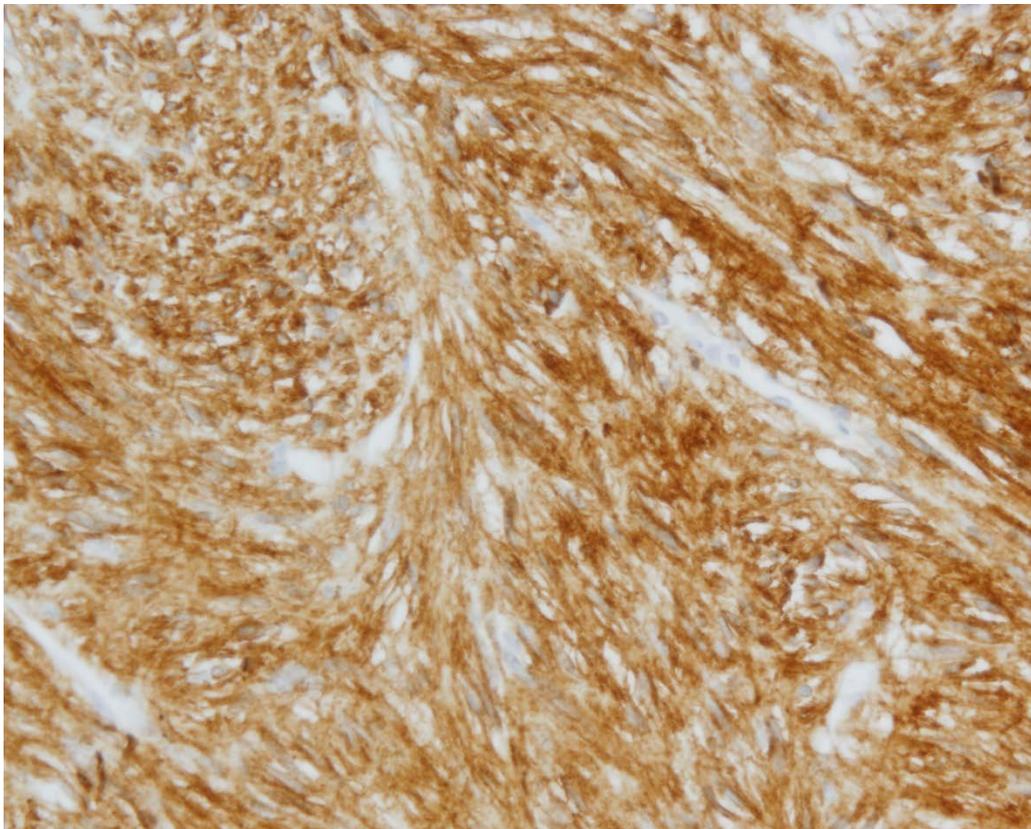


Fig. 3c: inmunotinción DOG-1

1.1.1.4. CKIT y PDGFRA

CKIT y PDGFRA son proteínas transmembrana (glicoproteínas) que pertenecen a la subclase III de la familia de receptores tirosina quinasa(36). Esta familia de proteínas se caracterizan por tener una estructura molecular específica (Figura 4), que consiste en un dominio extracelular (EC) con cinco regiones de tipo Ig-like, una única región transmembrana (JM) y un dominio intracitoplasmático con actividad tirosina quinasa (TK). Este último está dividido por un puente hidrofílico en una región unida a adenosin-trifosfato (TK1) y una región fosfotransferasa (TK2)(37). Ambos genes se localizan en el cromosoma 4 (4q11-12), próximo al gen del receptor de crecimiento epidérmico (EGFR)(38, 39).

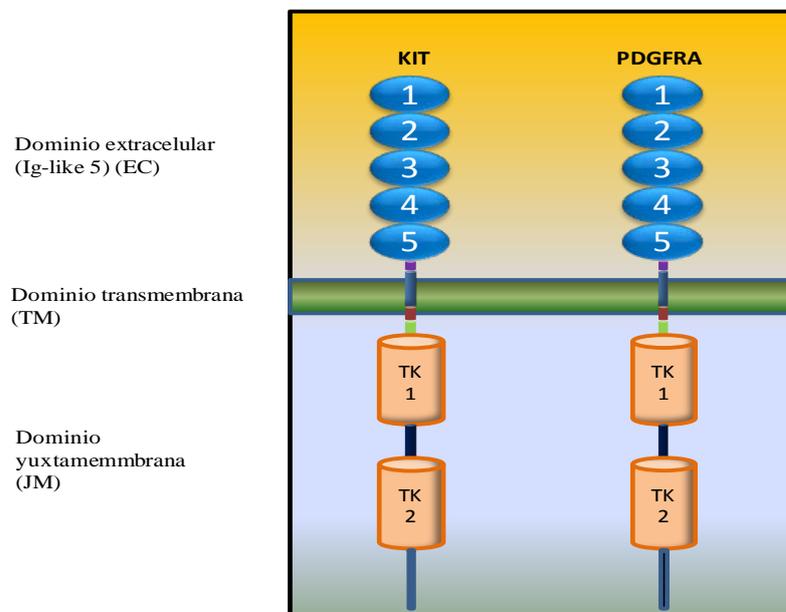


Figura 4: Representación esquemática de la estructura de CKIT y PDGFRA.

El ligando para CKIT se conoce como factor de crecimiento de células madre (*stem cell factor*, SCF) y el ligando para PDGFRA se conoce como PDGF. La activación del receptor, por unión con sus ligandos, se produce como consecuencia de un proceso de homodimerización que provoca una serie de cambios estructurales en el receptor, que determinan una activación del dominio con actividad quinasa y la fosforilación posterior de diversas proteínas. El resultado final es el inicio de una serie de señales que actúan sobre procesos cruciales del ciclo celular, como la proliferación celular, la adhesión, la

apoptosis y la diferenciación.(9, 40) Las mutaciones en el gen *CKIT* y de *PDGFRA* permiten la autofosforilación intracelular del receptor que implica una activación constitutiva en ausencia de ligandos, y por tanto una alteración en el ciclo celular. (Fig. 5)

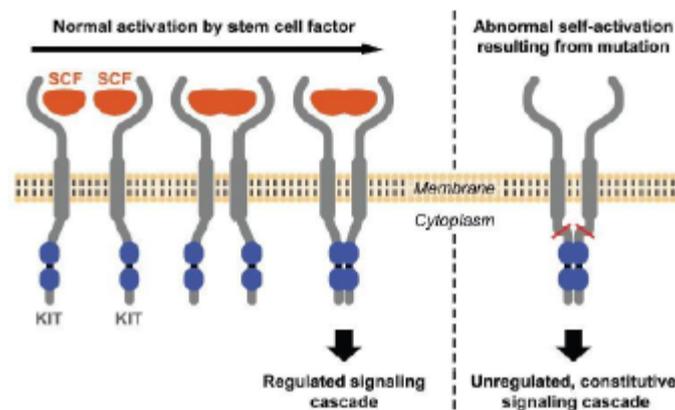


Figura 5: representación esquemática de la activación de CKIT en presencia de ligando SCF y como resultado de una mutación. Figura adaptada de www.gistespaña.es

La mayoría de los GIST se caracterizan molecularmente por presentar mutaciones en *CKIT* (60-80%) o *PDGFRA* (5-15%). (1-4) La distribución y tipo de mutación pueden afectar al grado de la activación constitutiva de la proteína(5), lo que a su vez se genera diferencias en el crecimiento y la agresividad del tumor.

Las mutaciones en *CKIT* se producen principalmente en el exón 11(65,7%) seguido del exón 9 (11%). El resto de exones presenta tasas de mutación muy bajas, como un 0,9% en el exón 13 o un 0,5% en el exón 17 (Fig. 6a)(10). Basándonos en el locus donde se producen las mutaciones, se pueden dividir en dos categorías principales: mutaciones que se dan en el dominio regulador del receptor (EC y JM) y mutaciones en el dominio enzimático (TK1 y TK2). La mayoría de las localizadas en el dominio JM consisten en deleciones o mutaciones puntuales y afectarán a la autorregulación y a la activación espontánea(37).

En el año 2003, el grupo del doctor Heinrich(39) describió que la mitad de los GIST que no presentaban mutaciones en *CKIT*, si las presentaban en el *PDGFRA*. La mayoría de estas mutaciones afectan al dominio TK2 en el exón 18, siendo el más afectado con

el 6,9% de los casos diagnosticados de GIST. Le sigue en frecuencia el exón 12 (2,5%) y el exón 14 (0,5%). (Fig. 6b)(10, 23, 37).

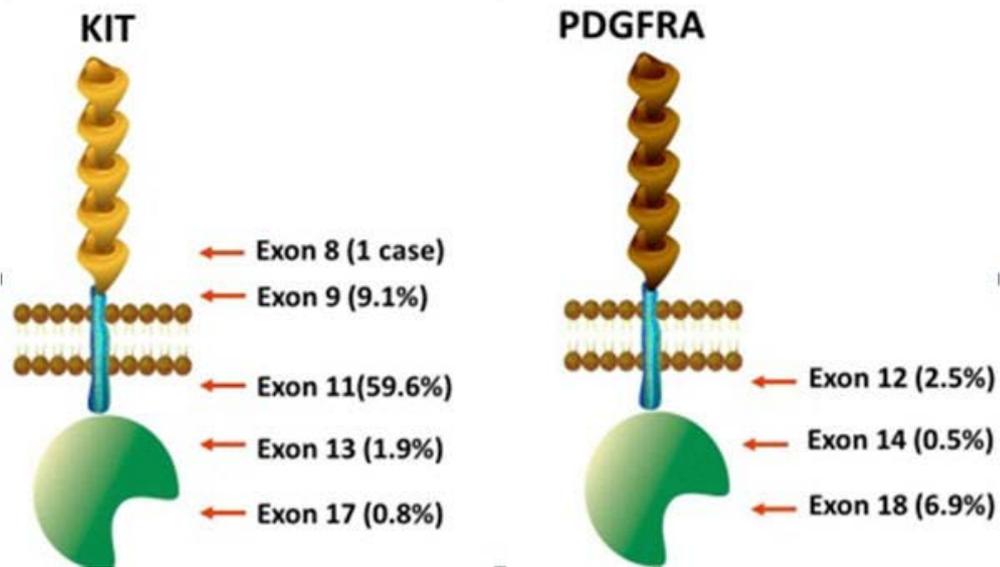


Figura 6: Distribución de las principales mutaciones encontradas en los genes de CKIT y PDGFRA. Adaptada de www.gistsupport.org

1.1.1.5. Tratamiento del GIST

El tratamiento de elección, siempre que sea posible, es la extirpación quirúrgica completa del tumor. En ocasiones, puede ser necesaria la resección de órganos adyacentes para lograr la eliminación completa del tumor. La rotura del tumor (R1), antes o durante la intervención entraña un mal pronóstico. Las grandes limitaciones del tratamiento quirúrgico de los GIST primarios son su aparición en localizaciones anatómicamente complicadas o la presencia de tumores de gran tamaño.

Antes de la aparición de la terapia molecular dirigida con los inhibidores selectivos de la actividad tirosina quinasa (TKI), los esfuerzos para tratar los GIST con quimioterapia convencional fueron ineficaces. La extrema resistencia que presenta este tipo de tumores ha llevado al acuerdo de que la quimioterapia convencional no aporta ningún beneficio en el tratamiento primario de los tumores del estroma gastrointestinal (128).

Sin embargo, la aprobación por la FDA (Food and Drug Administration) y la EMEA (European Medicines Agency) del uso del Mesilato de Imatinib (Gleevec, Novartis, Basel, Switzeland) para el tratamiento de pacientes con GIST *CKIT* positivos inoperables o metastáticos, ha supuesto un grandísimo avance en la lucha contra esta patología.

1.1.1.5.1. Imatinib

El mesilato de Imatinib es un inhibidor selectivo de la actividad tirosina quinasa (TKI) de *CKIT*, *PDGFRA*, *PDGFRB* y *ABL*. Originalmente se desarrollo para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica provocada por la fusión oncogénica *BCR-ABL*(41). Recordemos que los GIST se caracterizan por una sobreexpresión del receptor *CKIT*, generada en la mayoría de los casos por una mutación en los proto-oncogenes *CKIT* o *PDGFRA*(39, 42).

El Imatinib es un derivado de la 2-fenilaminopirimidina. Actúa específicamente bloqueando el lugar de unión para el ATP de las quinasas, por lo que inhibe la capacidad de ésta para transferir grupos fosfatos desde el ATP y residuos de tirosina fosforilados a las proteínas sustratos, lo que a su vez, interrumpe la transducción de las señales necesarias para la proliferación celular.

Los primeros estudios de fase II y fase III presentaron una alta tasa global de respuesta y una excepcionalmente buena tasa de supervivencia libre de progresión en pacientes con GIST inoperables o metastáticos, así como una respuesta objetiva en más del 50% de los pacientes (NCCN.org). Tras comparar una dosis de 400mg/día con otra de 800mg/día en dos ensayos clínicos randomizados Fase III en pacientes con GIST metastáticos *CKIT* positivos (EORTC-ISG-AGITG y NASG-S0033), se estableció una dosis de 400 mg/día, al no encontrar diferencias en la supervivencia global (SG) con la dosis de 800mg/día pero presentando perfiles de toxicidad más aceptables.

En los ensayos clínicos, pacientes con mutación en el exón 11 de *CKIT* presentan mejores tasas de respuesta y un mayor tiempo hasta progresión y de supervivencia global comparándolos con pacientes que tenían mutación en el exón 9 o pacientes wild-type (no mutado) para *CKIT* y *PDGFRA*(39).

Gracias a los avances en el conocimiento de la biología tumoral y al desarrollo de nuevos fármacos se ha mejorado mucho en el abordaje terapéutico de esta enfermedad.

1.1.1.5.2. Otros fármacos utilizados en el tratamiento del GIST

Se han descrito dos tipos de resistencias al uso del imatinib en los últimos años. La resistencia primaria, que se presenta entre un 10-20% de los pacientes y que se relaciona, principalmente con tres factores; la presencia de mutación en el exón 9 de *CKIT*, la mutación en el exón 18 de *PDGFRA* o la ausencia de mutación para ambos genes(43).

La llamada resistencia secundaria ocurre cuando se produce una progresión tumoral después de más de seis meses de respuesta clínica al tratamiento. Este tipo de resistencia se atribuye a la aparición de nuevas mutaciones en *CKIT* o *PDGFRA*(43-45).

Para poder tratar estas resistencias, se han desarrollado nuevos fármacos inhibidores de la tirosin quinasa, que actúan mediante mecanismos distintos al imatinib.

El sunitinib es un inhibidor de la tirosin quinasa multidiana que, en un reciente estudio fase III, demostró una mejora significativa del tiempo hasta progresión (27,3 frente a 6,4 semanas) y una mayor supervivencia global estimada en pacientes con resistencia o intolerancia a imatinib(46). La actividad clínica del sunitinib en pacientes resistentes al imatinib, está claramente influenciada por el dominio del receptor *CKIT* donde tenga lugar la mutación. Sunitinib produce una mayor respuesta en pacientes con mutación primaria en el exón 9 respecto a aquellos que la presentan en el exón 11 de *CKIT* (58% frente al 34%)(43).

Los inhibidores de la tirosina quinasa de segunda generación como son el sorafenib, nilotinib, dasatinib o regorafenib (de diseño muy reciente) han demostrado actividad terapéutica en pacientes con resistencia al imatinib y al sunitinib(43).

1.2. Metodología para la detección de mutaciones

Aunque existen multitud de técnicas que se pueden utilizar para el análisis de mutaciones, en el siguiente apartado se resumen brevemente las utilizadas en el estudio realizado.

1.2.1. Curvas de fusión de alta resolución (High Resolution Melting)

El análisis de la curva de fusión de un fragmento de ADN, mediante lecturas de alta resolución (HRM) es una nueva tecnología desarrollada en 2002 por Idaho Technology en colaboración con la Universidad de Utah(47). Su aplicación en Biología Molecular ha supuesto un gran avance pues permite caracterizar de una manera más fácil y sencilla diferencias genéticas entre distintas muestras; pudiendo aplicarse en el genotipado de SNPs, análisis de mutaciones, identificación de especies o el análisis de la metilación del ADN.

La base fundamental del HRM es la propiedad de desnaturalización o fusión de la doble hebra de ADN, en condiciones de pH y calor muy concretas. Esta tecnología se basa en el cálculo concreto de la temperatura de desnaturalización de distintos fragmentos de ADN.

Los puentes de hidrógeno son una de las fuerzas electroestáticas que ayudan a mantener la estructura de doble hélice del ADN. Estos puentes se producen entre las bases nitrogenadas de los distintos nucleótidos y se consideran fuerzas débiles que interaccionan de forma distinta dependiendo de qué bases estén implicadas en el enlace. Mientras que entre la adenina y la timina (A-T), se produce un enlace sencillo, la guanina y la citosina (C-G) generan un triple enlace. Por tanto, regiones ricas en C-G, se encuentran más fuertemente unidas que aquellas que poseen una mayor proporción de A-T. La rotura de estos puentes provoca el desenrollamiento (desnaturalización) de la doble hélice, ya sea parcialmente, de manera que parte de la molécula todavía conserve la estructura de doble hélice, o bien de manera absoluta, dando lugar a dos hebras sencillas de ADN. Cada molécula de ADN (a un pH determinado) tiene una temperatura de desnaturalización característica, denominada punto de fusión (T_m). La T_m se define como la temperatura a la cual la un 50% de la secuencia de ADN se encuentra desnaturalizada (Fig. 7). Esta temperatura dependerá de factores como la longitud de la cadena, contenido en GC y de la secuencia de nucleótidos(23). Cuanto mayor es el contenido en guanina y citosina, más alto será el punto de fusión del ADN. Así la determinación de la temperatura de fusión de una muestra de ADN, en condiciones de pH y fuerza iónica controladas, es característica de dicho fragmento y puede proporcionar una estimación de su composición en bases(48).

El análisis de curvas de fusión de alta resolución se lleva a cabo sobre muestras de ADN de doble cadena. En un primer paso se realiza una amplificación de la región de interés mediante una PCR-RT. Posteriormente comienza el análisis mediante HRM. El proceso consiste en un preciso calentamiento del producto de la amplificación del ADN

desde 50 °C hasta 95 °C. Al alcanzar la temperatura de fusión las dos hebras de ADN se separan y la transición del ADN de doble cadena al ADN de cadena sencilla desnaturalizado se cuantifica mediante fluorescencia. Los marcadores fluorescentes intercalantes, sólo son activos cuando se encuentran unidos al ADN de doble cadena de modo que en la primera etapa del HRM habrá un alto nivel de fluorescencia debido a la alta concentración de copias de doble cadena. Posteriormente, a medida que la muestra se va calentando y las dos hebras de ADN se separan, disminuirá la concentración de fluorocromos activos y por lo tanto la fluorescencia. Los equipos de HRM tienen cámaras especializadas en capturar y medirla fluorescencia. Posteriormente, mediante un software de análisis se generan gráficos con las curvas de fusión, que muestran la variación de fluorescencia frente a la temperatura (Fig.7).

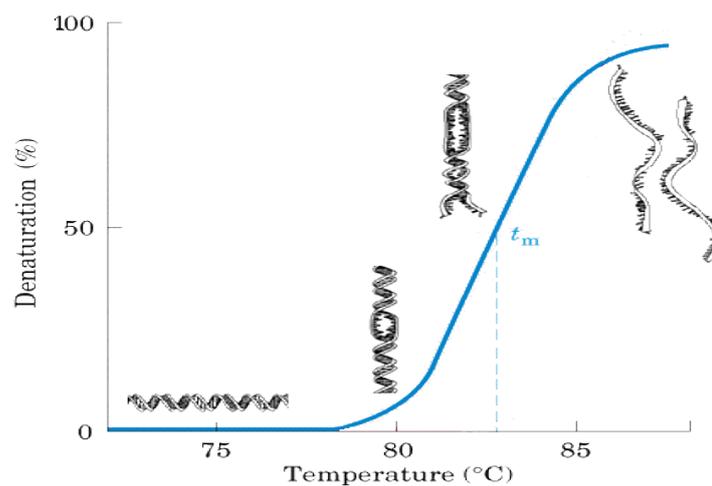


Figura7: Representación de la temperatura de fusión (T_m) de una molécula de ADN.

El análisis de curvas de fusión de alta resolución (HRM) presenta varias ventajas sobre otras técnicas para el estudio de mutaciones:

- Rapidez y potencia: el análisis se realiza instantáneamente después de una PCR y es capaz de detectar el simple cambio de un aminoácido en un 5% de la muestra(49).

- Al realizarse toda la técnica en placas capilares y de una sola vez se disminuye considerablemente el riesgo de contaminación (50).
- El análisis es muy sencillo, no requiere una normalización/calibración previa a la detección de mutaciones.
- Es un método no destructivo, lo que permite realizar otros análisis, por ejemplo electroforesis en gel o secuenciación, de las mismas muestras(51).

1.2.1.1. Colorantes intercalantes

Para monitorizar la desnaturalización del ADN de doble cadena a ADN de cadena simple se utilizan colorantes intercalantes. Estos tintes muestran distinta emisión de fluorescencia dependiendo de si se encuentran unidos al ADN de doble cadena (donde la emisión de fluorescencia es máxima) o de cadena simple (en las cuales la emisión es mínima). (Fig.8)

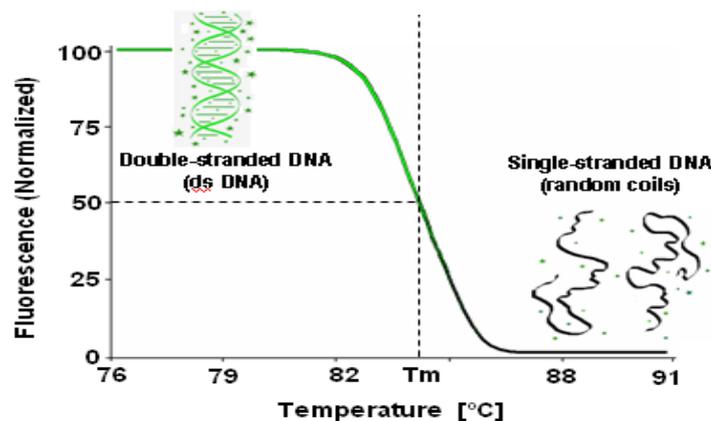


Figura 8: Esta gráfica representa la fluorescencia frente a la temperatura. Representa como al principio tenemos las dos cadenas unidas y un máximo de fluorescencia, pero a medida que la temperatura aumenta, las dos hebras se van separando y la fluorescencia desciende hasta que se alcanza la temperatura de desnaturalización. Superada ésta y alcanzada la desnaturalización total no habrá emisión de fluorescencia por parte de los colorantes intercalantes.

Hay varios tipos de colorantes intercalantes, con propiedades claramente diferentes:

- SYBR Green I fue el primer colorante utilizado en HRM. También utilizado en la tinción de ADN para el análisis por electroforesis de productos de PCR, o

como fluorocromo utilizado como medio de visualización directa de los productos de la PCR en tiempo real.

Esta molécula se introduce en la estructura secundaria de la doble hélice del ADN y se acopla energéticamente a los ácidos nucleicos que lo forman, de manera que se incrementa su tasa de emisión fluorescente. El complejo resultante ADN-SYBR Green presenta el pico de absorción en $\lambda = 498$ nm y el pico de emisión en $\lambda = 522$ nm (correspondiente a la zona verde del espectro, de ahí su nombre).

Este colorante presenta dos grandes inconvenientes, no puede ser utilizado en concentraciones de saturación ya que inhibiría la PCR y el hecho de que una vez que comienza la desnaturalización, se redistribuyen a lo largo de la doble hebra, de modo que no permite el seguimiento exhaustivo de la desnaturalización.

Algunos investigadores han desalentado el uso de SYBR Green para el HRM proponiendo el uso de nuevos tintes LC verde y LC Green Plus, Resolight, EvaGreen, Chromofy SYTO, HRM dyes de Roche, que se encuentran disponibles en el mercado y se han utilizado con éxito en análisis de curvas de fusión(52) (Fig.9a).

- Colorantes de 2ª generación o saturantes. Presentan la ventaja de no inhibir la ADN-polimerasa y no alteran la temperatura de fusión de los productos de PCR: LC verde y LC Green Plus, Resolight, HRM dyes de Roche.

Además, estos colorantes no difunden de nuevo a la doble hebra de ADN pues ya se encuentra saturada, lo que va a permitir seguir mejor el proceso de desnaturalización. (Fig. 9b)

- Otro tipo de colorante utilizados en el HRM son los release-on-demand (liberación a demanda). Pueden ser añadidos en concentraciones no saturantes. Se debe a un novedoso método de fluorescencia de emisión, cuando el colorante está en disolución está en equilibrio entre la forma inactiva y la activa y la unida a la doble hebra de ADN que es donde muestra la máxima fluorescencia. (Fig. 7c)

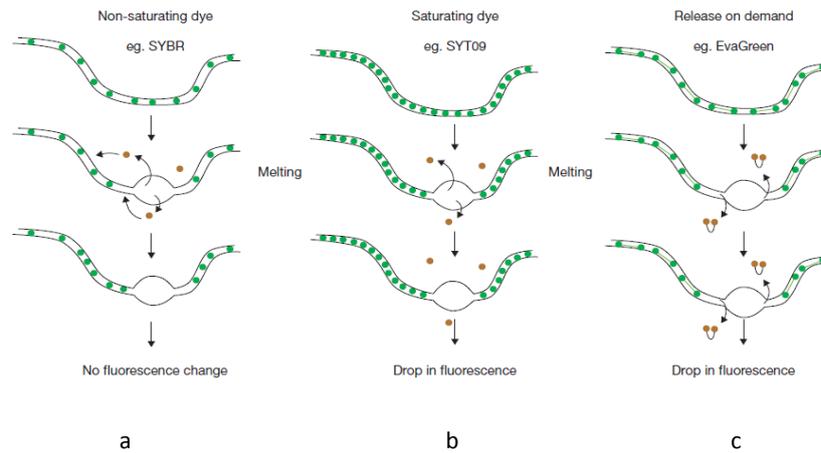


Figura 9: Representación de las diferentes clases de colorantes intercalantes.

1.2.1.2. Aplicaciones de la HRM

A) Detección de mutaciones:

Si se comparan dos muestras de pacientes diferentes, siempre que ambos posean una secuencia idéntica, las curvas de fusión de ambos deberán poseer la misma forma. Sin embargo, si una de las muestras presenta alguna alteración la temperatura de fusión de las hebras cambiará, produciendo curvas de fusión diferentes. Aunque la diferencia sea pequeña, tal vez de una pequeña fracción de grado, la tecnología aplicada tiene la potencia suficiente para resolver a “alta resolución” los cambios de fluorescencia, capacitándolo para documentar con precisión estos cambios y por lo tanto, determinar si existe o no una mutación(Fig.10). Son muchos los artículos que hacen referencia al uso de esta técnica como método de detección de mutaciones aplicándola al estudio de diversos genes: como *KRAS*(49, 53), *EGFR*(54-56), *BRCA1* y *BRCA2*(57, 58), *PDGFRA*(4), *CKIT*(2).

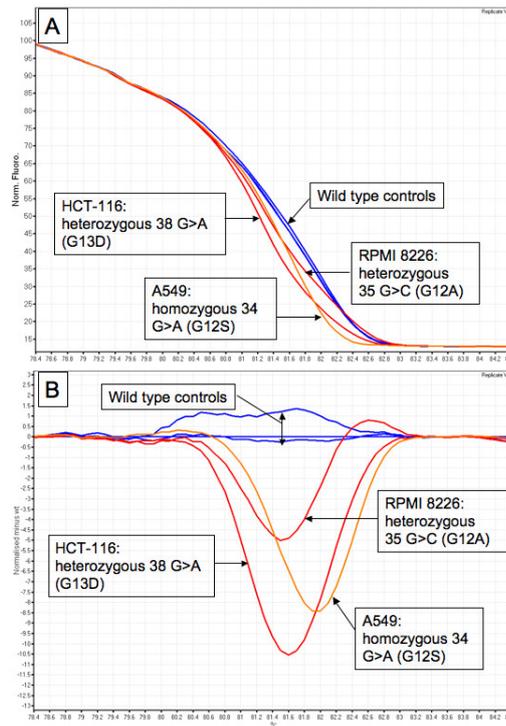


Figura 10: Detección de mutaciones en KRAS por HRM. Figura adaptada de Krypuy M et al. *BMC Cancer* 2006,6:295(49).

Debido a la configuración bialélica de los genes, el análisis de mutaciones mediante HRM plantea tres posibles escenarios:

1. Que ningún alelo contenga mutación.
2. Que uno de los dos alelos esté mutado.
3. Que ambos alelos contengan mutación.

Estas tres posibilidades son conocidas como “tipo salvaje”, “heterocigoto” u “homocigoto”, respectivamente. Cada uno dará una curva ligeramente diferente que podrá ser distinguida mediante un ensayo de HRM. (Fig. 11)

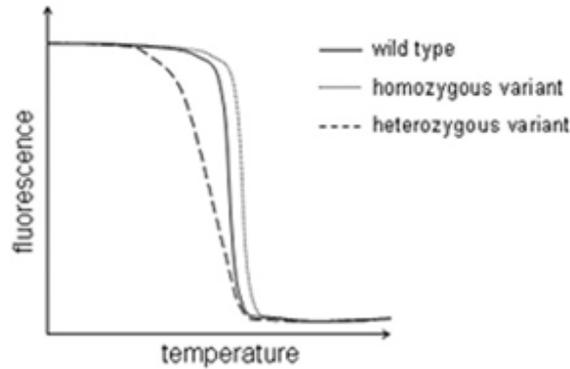


Figura 11: Representación de las curvas de fusión para muestras homocigotas, heterocigotas y tipo salvaje de un mismo exón.

B) Método de tipificación de SNP (*single-nucleotide polymorphism*).

HRM fue inicialmente desarrollado para la detección de SNP (Fig. 12)(59). Los métodos convencionales son largos y costosos, el HRM es más rentable y reduce la necesidad de diseñar varios pares de cebadores y de comprar costosas sondas(50, 60, 61).

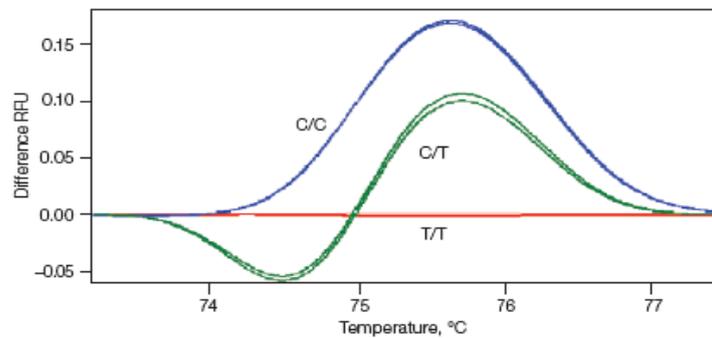


Figura 12: Curvas de fusión de alta resolución de dos muestras que presentan un único cambio de base en la secuencia de ADN.

C) Pruebas de zigosis:

El uso de HRM reduce el tiempo necesario para el análisis(62).

D) Epigenética:

El análisis de curvas de fusión de alta resolución también ha sido aprovechado para realizar un análisis rápido del estado de metilación del ADN(51, 63).

1.2.2. Secuenciación

En los años 70, se produjo un gran avance en la biología molecular debido al descubrimiento de los primeros métodos de secuenciación. Todos los métodos de secuenciación comparten características comunes, como son la necesidad de separar los distintos fragmentos de ADN de tamaño variado y el marcaje de los mismos bien por métodos radioactivos o fluorescentes, de manera que permita determinar la secuencia nucleotídica exacta del fragmento en estudio.

1.2.2.1. Métodos clásicos de secuenciación

Dentro de los métodos de secuenciación considerados como clásicos encontramos dos tipos, el de degradación química de Maxam y Gilbert(64) y el método enzimático o método de Sanger.

1.2.2.1.1. Método de degradación química, Maxam y Gilbert, 1977(64)

En el método químico de secuenciación, un fragmento de ADN se marca en uno de sus extremos con fósforo o azufre radiactivo por acción de la enzima polinucleótidoquinasa. Ambos extremos se separan mediante una enzima de restricción.

Posteriormente se rompen estos fragmentos, no más de una o dos veces por molécula, con reacciones químicas específicas para cada una de las cuatro bases: se hacen cuatro alícuotas y se tratan cada una de ellas con un compuesto químico que modifique una de las cuatro bases, aproximadamente una vez por molécula de ADN. Un tratamiento posterior con piperidina producirá la rotura de la cadena allí donde la base había sido alterada generando fragmentos marcados radiactivamente hasta el primer lugar de rotura de la molécula (los restos no se podrán detectar al no estar marcados). Tras ello se analizan los fragmentos generados (ADN monocatenario marcado) en geles desnaturalizantes, separando los productos de las cuatro reacciones en cuatro carreras electroforéticas distintas, una al lado de la otra.

Los fragmentos son visualizados mediante el empleo de una autoradiografía del gel, proporcionando una serie de bandas oscuras, correspondientes a los fragmentos marcados con el radioisótopo y de ahí podemos inferir la secuencia (Fig. 13)

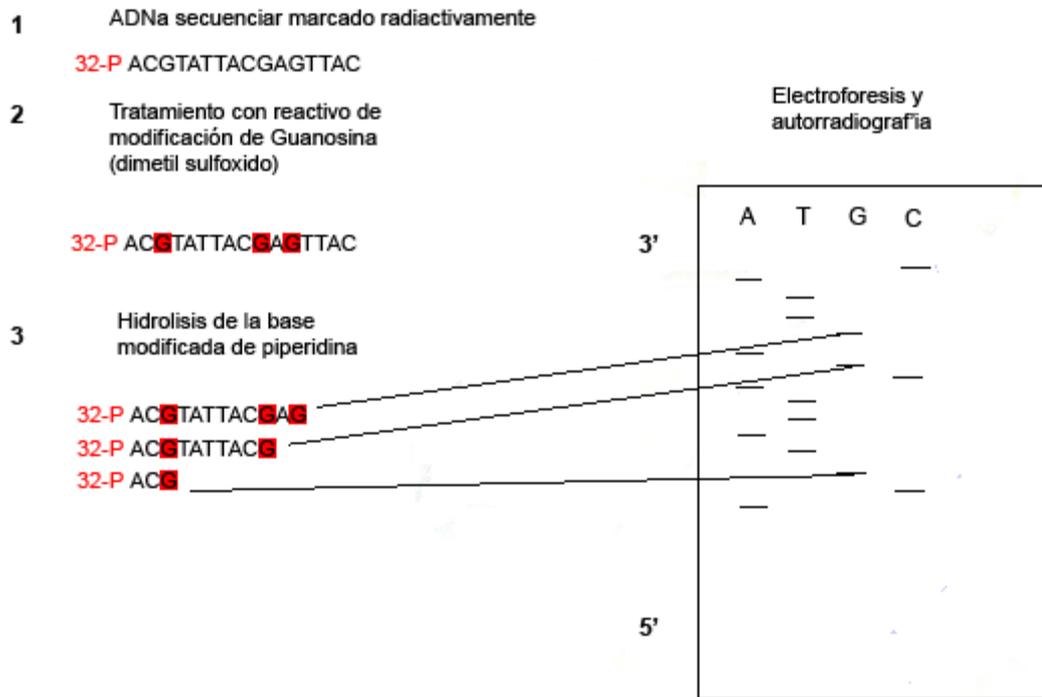


Figura 13: Esquema del método de Maxam y Gilbert con marcaje radiactivo con fosforo-32 para el nucleotidoguanosina.

1.2.2.1.2. Método enzimático de Sanger, Nicklen y Coulson, 1977

El método de Sanger(33) se basa en el uso de la ADN-polimerasa para sintetizar cadenas de ADN con una terminación específica. Con este método se generan fragmentos de ADN de todos los tamaños posibles que se puedan distinguir entre sí, por el tipo de marcaje que llevan o por la incorporación de un terminador específico ADN-polimerasa. Entre los componentes de la reacción se incluyen nucleótidos que no tienen un grupo hidroxilo en su extremo 3' (ddNTP), para poder obtener una terminación específica en las cadenas. Una vez que el ddNTP se incorpora como el residuo terminal, evita que la cadena de ADN sintetizada continúe extendiéndose. De esta forma, se sintetizan cadenas de todos los tamaños, para cada tipo de ddNTP. Posteriormente, los fragmentos se separan mediante electroforesis. La incorporación previa de un dNTP marcado radiativamente permite la visualización de los fragmentos mediante radiografía. Mediante la lectura consecutiva de las bandas se obtiene la secuencia nucleotídica del fragmento analizado. (Fig. 14)

fluorocromos diferentes. La mezcla de los productos de la PCR se cargaba en un único carril de gel en tubo, y se usaba un detector óptico para determinar la absorción de cada banda. Esta información se transfería directamente a un ordenador que permitía obtener información precisa de hasta 200 pares de bases (pb).

Posteriormente, se experimentó con el uso de equipos que tenían un detector óptico capaz de leer la información de cuatro carriles, de modo que era posible obtener información precisa de más de 400 pb, usando sólo un marcador fluorescente y separando las cuatro reacciones.

En 1994, se describió el uso de la polimerasa termoestable “SequiTherm”, que era capaz de sintetizar fragmentos grandes con terminación específica. Esto permitió determinar hasta 1000 bases de una secuencia por reacción(66) y supuso un gran avance, porque hasta el momento, la información que se obtenía después de unas 400 pb de secuencia era difícil de interpretar y susceptible a error. La excepción eran reacciones de secuenciación utilizando la polimerasa T7, la cual permitía obtener hasta 700 pb de secuencia con 99% de precisión, pero con el gran inconveniente de no ser termoestable(67).

1.2.2.3. Otros métodos de secuenciación automatizada.

1.2.2.3.1. Pirosecuenciación.

Se trata de una técnica para la secuenciación de fragmentos cortos de ADN, generalmente empleada en la búsqueda de mutaciones y polimorfismos. Se caracteriza por la adición secuencial de los distintos nucleótidos. Cuando el nucleótido que se añade es el complementario a la cadena molde, la ADN-polimerasa cataliza la unión de éste a la cadena, liberando pirofosfato (PPi). La ATP sulfurilasa convierte el PPi en ATP en presencia de APS (adenosina 5 fosfosulfato). Este ATP sirve de mediador en una reacción secundaria acoplada a la extensión del ADN que lleva a cabo la luciferasa. Esta enzima convierte la luciferina en oxiluciferina, emitiendo luz en presencia del ATP generado desde el PPi. La cantidad de luz emitida es, por tanto, directamente proporcional al número de dNTPs añadidos.

1.2.2.3.1.1. Secuenciación de nueva generación.

El desarrollo en los últimos años de las denominadas tecnologías de secuenciación masiva permite actualmente obtener millones de secuencias de ADN a una velocidad sin precedentes y a un coste cada vez más reducido. Estas tecnologías están permitiendo la consecución de logros científicos trascendentales, con la identificación de nuevos genes y la resolución de las bases genéticas de enfermedades. Su potencial ha permitido el desarrollo de nuevas aplicaciones y pruebas biológicas que van a revolucionar, en un futuro próximo, el diagnóstico.

En este apartado vamos a describir una tecnología concreta de secuenciación masiva basada en la pirosecuenciación. Esta tecnología, desarrollada por ROCHE®, permite la secuenciación de hasta 100.000 fragmentos independientes en un solo experimento, y además en un equipo diseñado para uso en pequeños laboratorios. La tomamos como ejemplo de la secuenciación masiva, ya que como se verá posteriormente es la tecnología que se ha utilizado para el desarrollo de este trabajo de tesis doctoral.

El ADN generado en una PCR convencional se aísla y se fragmenta para ligarle adaptadores específicos y separarlo en hebras sencillas (Fig. 15a). Los fragmentos producidos se unen a microperlas en condiciones que favorezcan la unión de un solo fragmento por microesfera (Fig.15b). Las perlas se aíslan y compartimentan en gotitas de una emulsión de aceite que contiene la mezcla de productos necesarios para llevar a cabo una reacción de amplificación. Cada microesfera, por tanto, contendrá tras la PCR múltiples copias de un sólo fragmento concreto de ADN (Fig. 15c). Posteriormente, la emulsión se rompe y las hebras de ADN se desnaturalizan. Las perlas unidas a los productos de PCR se depositan en los pocillos de un portaobjetos de fibra óptica. En cada pocillo se añaden además perlas más pequeñas que llevan inmovilizadas las enzimas necesarias para una reacción de pirosecuenciación(Fig. 15d). El proceso de secuenciación, la captura de imágenes y su interpretación está automatizado. El secuenciador vierte automáticamente sobre los pocillos los reactivos necesarios y un tipo de nucleótido cada vez. La ADN polimerasa añade los nucleótidos dependiendo de la secuencia que actúa como molde y se emite luz con una intensidad proporcional al número de nucleótidos incorporados a la nueva cadena (Fig. 15f). El secuenciador consta de un sistema óptico que recoge el patrón de destellos luminosos que se emiten y que se como incorporación o no de nucleótidos y su número.

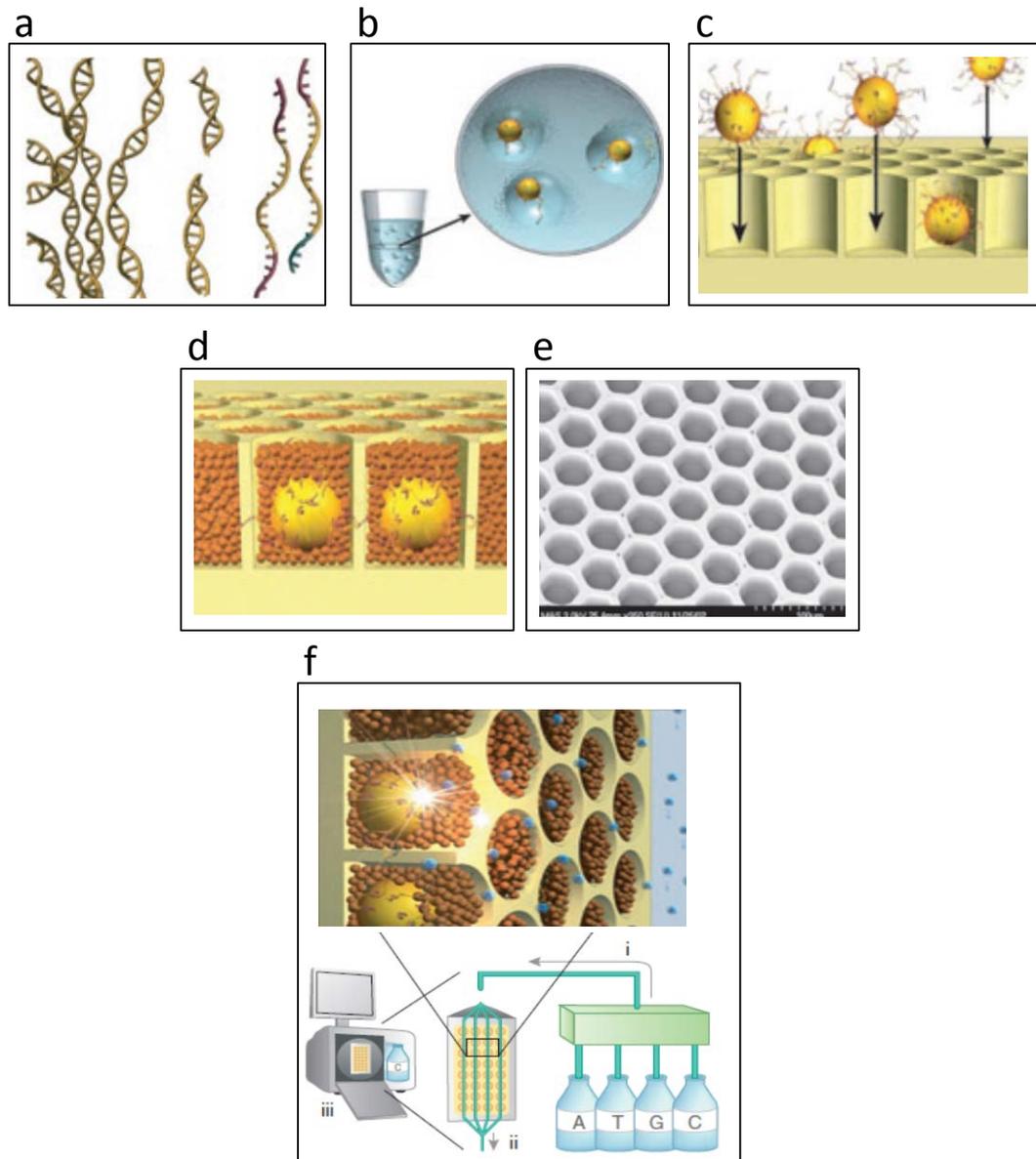


Fig.15: Tecnología del secuenciador 454. Figura adaptada del artículo: *The development and impact 454 sequencing. Jonathan M Rothberg and John H Leamon. Nature Biotechnology, vol 26 n10, Oct 2008(40).*

a) Cadenas de ADN desnaturalizadas, b) fusión de cadenas individuales en microperlas, c) perlas aisladas y compartimentadas en una emulsión con los productos necesarios para la PCR, d) perlas depositadas en el portaobjetos junto con perlas más pequeñas que contienen las enzimas de reacción, e) portaobjetos de fibra óptica donde se depositan las perlas para llevar a cabo la reacción, f) partes del secuenciador 454.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

A la vista de los datos expuestos en la introducción nos planteamos la siguiente hipótesis: El análisis de las curvas de fusión por alta resolución puede ser una herramienta óptima para la detección de mutaciones en los tumores del estroma gastrointestinal en el devenir diario de la anatomía patológica, al ser una metodología sencilla, rápida, barata y con una altísima sensibilidad.

Con el fin de evaluar la citada hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Realización de técnicas inmunohistoquímicas para los marcadores *CKIT*, *PDGFR α* , *DOG-1* en una serie de pacientes diagnosticados de GIST.
2. Realización del análisis molecular de las curvas de fusión de alta resolución para los genes *CKIT* y *PDGFRA* en todos los casos.
3. Correlacionar los resultados inmunohistoquímicos para *CKIT*, *PDGFRA* y *DOG-1* con los hallazgos mutacionales para *CKIT* y *PDGFRA* obtenidos mediante HRM.
4. Confirmar los resultados de HRM mediante métodos de secuenciación masiva

Como objetivo secundario nos planteamos:

- a) Establecer el método óptimo de extracción y purificación de ADN para el estudio mutacional mediante HRM de los tumores a partir de muestras clínicas.

III. MATERIAL Y MÉTODO

3.1. Muestras:

Con el fin de evaluar una nueva herramienta en el análisis de mutaciones de CKIT y PDGFRA nos servimos del Biobanco de muestras sólidas del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV) perteneciente al Biobanco de la Comunidad de Cantabria. Se seleccionaron un total de 50 muestras previamente diagnosticadas de tumor del estroma gastrointestinal (GIST). La búsqueda se realizó en la base de datos informatizada (LIS) del servicio entre los años 1993 y 2011 ambos inclusive. Todos los casos habían sufrido el procesado rutinario de fijación en formol, deshidratación e inclusión en parafina. Es preciso destacar que hasta el año 2000 no se usó de manera constante formol tamponado al 4% y un tiempo preestablecido no mayor de 24 horas para la fijación.

De cada paciente se revisó su historia clínica y se recopilaron los datos esenciales para el estudio referidos a edad, sexo, diagnóstico, localización del tumor, seguimiento y tratamiento recibido. Este estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) de Cantabria.

Se visualizaron nuevamente todas las preparaciones histológicas teñidas con Hematoxilina y Eosina de los diferentes casos por dos patólogos independientes con dos objetivos principales, en primer lugar confirmar el diagnóstico previo (ya que se basaba en diagnósticos de diferentes patólogos) y en segundo lugar elegir un bloque en el que tuviéramos una mayor representación de células tumorales. Como controles negativos se seleccionaron casos con representación tisular representativa de las diferentes localizaciones y ausencia de tumor.

Para cada uno de los casos se realizó el siguiente protocolo:

1. Inmunotinción para la expresión de KIT, PDGFRA y DOG1 (marcadores básicos de GIST)
2. Extracción de ADN
3. PCR a tiempo Real y análisis por curvas de fusión de alta resolución (HRM)
4. Secuenciación de los principales exones de los genes en estudio mediante técnica de secuenciación masiva.

3.2. Inmunohistoquímica

A partir de los bloques de parafina se realizaron cortes de tres μm y se colocaron sobre portaobjetos pretratados IHC FlexTM (DAKO, Glostrup, Dinamarca). Los cortes se desparafinaron y se pretrataron simultáneamente en el buffer Envision FlexTM Target Retrieval Solution High pH (DAKO) durante 20 min en el equipo ptLINK (DAKO) a 95°C.

Una vez sometidos a la recuperación antigénica, los portas se colocaron sobre rejillas especiales y se realizó la inmunotinción de manera automática en el equipo AutostainerLink 48 (DAKO, Glostrup, Dinamarca). Se utilizaron los anticuerpos monoclonales frente CKIT (A4502, DAKO, Dinamarca), PDGFR alfa (C-20, Santa Cruz Biotechnology, Inc, California) y DOG1 (PA0219, Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle-Upton-Tyne, UK) (tabla 1) utilizando FLEX+, Mouse, High Ph,(Link)(Cod K8002, DAKO) como kit de revelado.

La Dra. Clara Caballero, del servicio de Anatomía Patológica del HUMV, fue la encargada de llevar a cabo la evaluación histopatológica de las muestras así como la cuantificación de las técnicas inmunohistoquímicas. Se consideró como positivo para ambos anticuerpos la presencia de inmunotinción en al menos un 10% de las células tumorales.

Tabla 1: Anticuerpos utilizados en la validación inmunohistoquímica.

Anticuerpo	Clon	Dilución	Casa Comercial
DOG-1	K9	1/100	Novocasta Laboratories Ltd
CD117	A4502	1/100	DAKO
PDGFR- α	C-20	1/400	Santa Cruz Biotechnology, Inc

3.3. Extracción y purificación de DNA

Con el fin de determinar el procedimiento de extracción que nos ofreciera un mayor rendimiento y una mayor pureza, se realizó un ensayo piloto con 10 muestras que habían sido fijadas y procesadas en las mismas condiciones que las del estudio extraídas bajo tres procedimientos distintos. Para todos ellos se realizaron entre 15 y 20 secciones de cinco micras de grosor de cada bloque en el ensayo y se incluyeron por triplicado.

3.2.1. Extracción con QIAamp® DNA mini kit (QIAGEN, Cat. No. 51306)

1. Se añadieron 1200µL de xilol y mezclamos en agitación hasta la completa disolución. Centrifugamos a máxima potencia (12.000 rpm) y temperatura ambiente durante cinco minutos. Eliminamos el xilol con cuidado de no arrastrar el sedimento.
2. Añadimos 1200µL de etanol absoluto sobre el sedimento y mezclamos en agitación. Centrifugamos a máxima potencia (12.000 rpm) y temperatura ambiente durante cinco minutos. Descartamos el etanol con cuidado de no arrastrar el sedimento. Este paso se repitió dos veces
3. Incubamos a 37°C durante 15 minutos para eliminar los restos de etanol.
4. Añadimos 180µL de buffer ATL y 20µL de Proteinasa K. Mezclamos en agitación durante 15 segundos e incubamos a 56 °C en agitación durante 80 min hasta alcanzar la lisis completa de los tejidos.
5. Damos un pulso de centrifuga, añadimos 200µL de buffer AL y mezclamos por agitación durante 15 segundos. Incubamos a 70°C durante 10 minutos.
6. Damos un pulso de centrifuga. Añadimos 200µL de etanol absoluto y mezclamos en agitación. Filtramos la mezcla obtenida a través de una columna de purificación (QIAamp mini spin). Centrifugamos a 8000 g durante un minuto.
7. Pasamos la columna a un tubo Eppendorff limpio y desechamos el tubo con el etanol filtrado. Añadimos sobre la columna 500µL de buffer AW1. Centrifugamos a 8000 g y desechamos el líquido filtrado.
8. Añadimos 500µL de buffer AW2. Centrifugamos a 8000g durante tres minutos. Descartamos el líquido filtrado y centrifugamos de nuevo durante 1 minuto.
9. Colocamos la columna sobre un nuevo tubo Eppendorf con tapa debidamente rotulado. Añadimos 100µL de buffer AE e incubamos durante un minuto a temperatura ambiente para centrifugar a 8000g. durante un minuto.

10. Añadimos 50µL de buffer AE sobre la columna. Incubamos un minuto a temperatura ambiente y centrifugamos en las mismas condiciones que el paso 9.
11. Medimos la concentración del DNA obtenido mediante el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific. USA).

3.2.2. Extracción con DNA sample preparation kit, (COBAS, ROCHE Diagnostic, Ref. P/N: 05985536190)

1. Depositamos las cinco secciones seleccionadas de cinco micras de tejido en un tubo Eppendorf rotulado con 500µl de xileno. Mezclamos en agitación durante 10 segundos. Incubamos a temperatura ambiente durante cinco minutos.
2. Añadimos 500µl de etanol absoluto y mezclamos por agitación durante 10 segundos. Incubamos a temperatura ambiente durante cinco minutos.
3. Centrifugamos a 16.000g durante tres minutos y descartamos el sobrenadante sin tocar el sedimento. En el caso que apareciera tejido en suspensión repetimos la centrifugación durante un minuto.
4. Añadimos un ml de etanol absoluto y mezclamos en agitación durante 10 segundos. Centrifugamos a 16.000g durante dos minutos y descartamos el sobrenadante sin tocar el sedimento.
5. Secamos el sedimento en un termobloque precalentado a 56°C al menos durante 10 minutos, con los tubos abiertos, para que se evapore el etanol.
6. Resuspendemos en 180µl de DNA Tissue Lysis Buffer (DNA TLB) y 70 µl de proteinasa K (PK). Agitamos cada tubo con tejido y TLB/PK durante 30 segundos. Verificamos que el tejido estuviera sumergido en el líquido.
7. Incubamos a 56°C durante 2 horas.
8. Agitamos el tubo durante 10 segundos e incubamos a 90°C durante 1 hora.
9. Durante esta incubación, preparamos el número necesario de tubos con filtro junto con sus tubos de desecho, y los rotulamos con la identidad de la muestra en el tapón del tubo con filtro. Rotulamos adicionalmente un tubo Eppendorf de 1,5ml por cada muestra para recoger el extraído final.
10. Retiramos los tubos del termobloque a 90°C, y atemperamos durante cinco minutos.

11. Realizamos un pulso de centrifuga durante tres segundos. Añadimos 200µl de DNA Paraffin Binding Buffer (DNA PBB) y homogeneizamos mediante pipeteo. Nos aseguramos visualmente que la solución fuera homogénea. Incubamos a temperatura ambiente durante 10 minutos.
12. Añadimos 100µl de isopropanol y homogeneizamos mediante pipeteo. Transferimos todo el líquido del tubo mediante pipeteo a la columna.
13. Centrifugamos a 8.000g durante un minuto. Descartamos el tubo de desecho.
14. Añadimos 500µl de Wash Buffer I a la columna. Centrifugamos a 8.000g durante un minuto.
15. Añadimos 500µl de Wash Buffer II a la columna. Centrifugamos a 8.000g durante un minuto.
16. Centrifugamos a 16.000g durante un minuto. Descartamos el tubo de desecho y colocamos la columna sobre el tubo Eppendorf rotulado.
17. Añadimos 50µl de DNA Elution Buffer (DNA EB) en el centro del filtro, sin tocarlo. Incubamos a temperatura ambiente durante cinco minutos. Centrifugamos a 8.000g durante un minuto para recoger el DNA extraído en el tubo Eppendorf.
18. Repetimos el paso 17 en caso de requerir más volumen de eluido.

3.2.3. Extracción con Kit de purificación de DNA (Genomica, Madrid, Ref: BK-0295-050-01):

1. Colocamos de dos a cinco secciones de cinco micras de tejido parafinado en un eppendorf de dos mL previamente rotulado.
2. Añadimos 1200µL de xilol y mezclamos en agitación hasta completar la disolución. Centrifugamos a máxima potencia (12.000 rpm) y temperatura ambiente durante cinco minutos. Eliminamos el xilol con cuidado de no arrastrar el sedimento.
3. Añadimos 1200µL de etanol absoluto sobre el sedimento y mezclamos en agitación. Centrifugamos a máxima potencia durante cinco minutos y eliminamos el etanol con cuidado de no arrastrar el sedimento. Este paso fue repetido en dos ocasiones

4. Incubamos a 37°C durante 15 minutos para que los restos de etanol se evaporasen.
5. Añadimos 50µL de solución de digestión y 50µL de proteinasa K. Mezclamos mediante agitación e incubamos durante 3h a 56°C.
6. Hervimos al baño maría durante 10 minutos y centrifugamos a máxima velocidad cinco minutos. Recogimos el sobrenadante en un tubo Eppendorf nuevo convenientemente rotulado.
7. Añadimos 500µL de resina de purificación. Mezclamos mediante inversión del tubo e incubamos cinco minutos a temperatura ambiente.
8. Mientras tanto, fijamos al extremo de una jeringa de dos mL una columna de purificación correctamente identificada.
9. Añadimos el contenido del tubo Eppendorf a la jeringuilla e hicimos pasar lentamente el líquido a través de la columna presionando el émbolo. Una vez filtrada la muestra, quitamos la columna del extremo, sacamos el émbolo de la jeringuilla y fijamos de nuevo la columna al extremo de la jeringuilla.
10. Añadimos dos mL de solución de lavado a la jeringuilla e hicimos presión con el émbolo. Una vez pasada toda la solución de lavado, desechamos la jeringuilla. Colocamos la columna en un tubo Eppendorf y centrifugamos durante dos minutos a 16000g para eliminar los posibles restos de solución de lavado.
11. Pasamos la columna a un tubo Eppendorf limpio y correctamente marcado. Añadimos 50µL de solución de dilución (SD) y dejamos incubar durante cinco minutos
12. Eluimos el DNA por centrifugación durante 20 segundos a máxima potencia.

3.2.4. Comparación entre los métodos de extracción de DNA y elección de concentración de trabajo.

Una vez realizadas las extracciones DNA por los distintos métodos se procedió a su cuantificación y evaluación de pureza a través de la medida espectrofotométrica con el NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Delaware; USA). Los ratios utilizados con dicho

fin fueron: A260 para la cuantificación y A260/A280 y A260/A230 para la evaluación de la pureza.

Para que todas las muestras pudieran ser comparables entre si y establecerse la concentración de trabajo, se procedió a realizar diluciones con agua ultra-estéril para inyectables Braun (B. Braun Medical S.A., Rubí, Barcelona). Las concentraciones a evaluar fueron: 40, 30, 20 y 4 ng/ μ l.

La evaluación de los distintos métodos de extracción se llevó a cabo comparando los siguientes parámetros:

- El rendimiento medio obtenido en cada muestra, según la concentración.
- La pureza obtenida en las mediciones.
- Comportamiento durante la PCR a tiempo real realizada con cebadores dirigidos frente al exón 11 de CKIT, de 267pb.

Para evaluar la concentración óptima de trabajo para la PCR y el HRM se contemplaron los siguientes parámetros: Cp, homogeneidad de amplificación, máxima fluorescencia alcanzada y ciclos requeridos para amplificación completa.

3.3. PCR a tiempo real y HRM

Los cebadores necesarios para la amplificación de los genes en estudio fueron escogidos por su uso previo en la literatura científica (Wallander ML *et al* 2010) y fueron sintetizados por TIB MOLBIOL (Syntheselabor GmbH, Berlín, Alemania). Las secuencias, y tamaños de los fragmentos obtenidos se detallan en la tabla 2.

Tabla 2: análisis molecular de KIT y PDGFRA

		Cebadores de C-KIT y PDGFRA		
		Cebador	Secuencia	Tamaño Fragmento
C-KIT Exon 9	Forward	5'-CTTCCCTTTAGATGCTCTGCTTCTG-3'		249 pb
	Reverse	5'-CAGAGCCTAAACATCCCCTTAAATTGG-3'		
C-KIT Exon 11	Forward	5'-CTCTCTCCAGAGTGCTCTAATGAC-3'		267 pb
	Reverse	5'-GTTCTTAAAGTCACTGTTATGTGTACC-3'		
C-KIT Exon 13	Forward	5'-GACATCAGTTTGCCAGTTGTGC-3'		261 pb
	Reverse	5'-CCAAGCAGTTTATAATCTAGCATTGCC-3'		
C-KIT Exon 17	Forward	5'-AAATGGTTTTCTTTTCTCCTCCAACC-3'		192 pb
	Reverse	5'-TCCTTTGCAAGGACTGTCAAGC-3'		
PDGFRA Exon 12	Forward	5'-CTGGTGCCTGGGACTTTGGTAAT-3'		235 pb
	Reverse	5'-GTGTGCAAGGAAAAGGGAGTCT-3'		
PDGFRA Exon 18	Forward	5'-GGGTGATGCTATTCAGCTACAGATGG-3'		267 pb
	Reverse	5'-CCGAATCTCTAGAAGCAACACCTGAC-3'		

Secuencias de cebadores de los exones 9, 11, 13 y 17 correspondientes al gen KIT y de los cebadores de los exones 12 y 18 correspondientes al gen PDGFRA; utilizados en PCR, HRMA, y secuenciación de las muestras.

Para la reacción de amplificación se utilizó un termociclador LightCycler[®] 480 II (Roche). Para cada fragmento a amplificar se utilizaron 3,6µl de agua, 2,4µl de MgCl₂, 1µl de cebador forward, 1µl de cebador reverse, 10µl de MasterMix y 2µl de DNA, todos los reactivos utilizados provienen del kit LightCycler[®] 480 High Resolution Melting Master (Ref: 04909631001, Roche) y se cargaron en placas de 0.3ml AD-plateCobas[®] (Ref: 05232724001, Roche). Tanto los protocolos de la amplificación como los del HRM para cada exón se recogen en la tabla 3.

Tabla 3: Protocolos de amplificación y HRM

	Exones 11, 9, 17 de c-kit y 12, 18 de PDGFRA					
	Ciclos	Temperatura (°C)	Modo de seguimiento	Tiempo (hh:mm:ss)	Rampa (°C/s)	Seguimiento (por °C)
Activación	1	95	ninguno	0:10:00	4.4	
Amplificación	45	95	ninguno	0:00:10	4.4	
		59	ninguno	0:00:10	2.2	
		72	simple	0:00:13	4.4	
HRM	1	95	ninguno	0:01:00		
		40	ninguno	0:01:00		
		60	ninguno	0:00:01		
		95	continuo			25
Enfriamiento	1	40	ninguno	0:00:30	2.2	

	Exon 13 c-kit					
	Ciclos	Temperatura (°C)	Modo de seguimiento	Tiempo (hh:mm:ss)	Rampa (°C/s)	Seguimiento (por °C)
Activación	1	95	ninguno	0:10:00	4.4	
Amplificación	45	95	ninguno	0:00:10	4.4	
		58	ninguno	0:00:10	2.2	
		72	simple	0:00:13	4.4	
HRM	1	95	ninguno	0:01:00		
		40	ninguno	0:01:00		
		60	ninguno	0:00:01		
		95	continuo			25
Enfriamiento	1	40	ninguno	0:00:30	2.2	

Para el análisis de las curvas de fusión de alta resolución se utilizó el software comercial LightCycler® 480 Software release 1.5 SP3 (Roche). Se utilizó el apartado de *Gen Scanning* siguiendo un protocolo de tres etapas:

1. *Normalization*: Estandarización de las curvas, de manera que se ajustasen al 100% las fluorescencias iniciales y al 0% las fluorescencias remanentes tras la disociación completa del ADN (Figura 16a).
2. *Temperature Shift*: ajuste de la temperatura de las curvas para que coincida con el punto en el cual todo el ADN de doble hebra esté completamente desnaturalizado (Figura 16 b).
3. *Difference Plot*: análisis de las diferencias entre las distintas formas de las curvas de fusión obtenidas para cada muestra, al compararlas con la curva obtenida para el control negativo, que se establece como curva base. De este modo, se establecen distintos grupos basados en un cálculo automático del software (Figura 16 c).

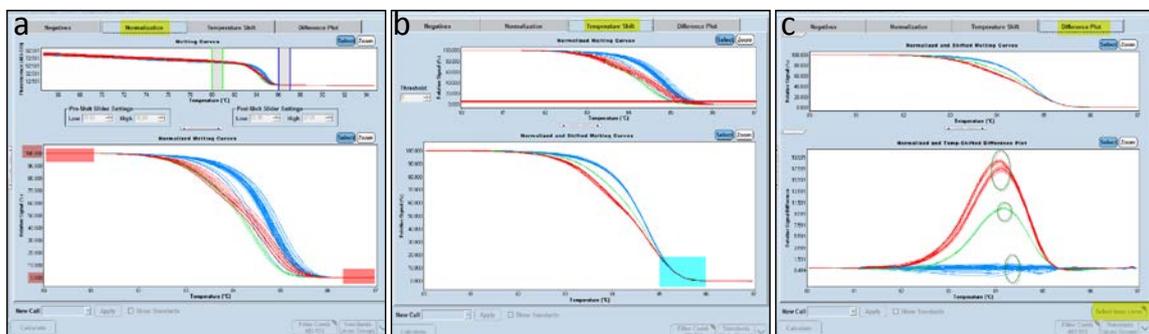


Fig. 16: Graficas del análisis de curvas de fusión. a) Normalización de la fluorescencia, b) *Temperature Shift*, c) Gráfico de las diferencias del patrón de las curvas

Tomando en consideración los artículos publicados por de Juan I *et al* 2009 y Laurie AD *et al* 2007, para discriminar la diferencia de las distintas curvas como muestras mutadas y libres de mutación, se estableció la diferencia mínima entre los picos máximos de señal entre la muestra control y la analizada en 4 o superior, por tener en consideración que las muestras procedían de tejido parafinado.

3.4. Secuenciación

Con el fin de poder interpretar los resultados obtenidos del análisis de las curvas de fusión y para tener una segunda técnica para comparación de resultados, se decidió secuenciar todas las muestras como control específico de mutaciones. La secuenciación se realizó en colaboración con el Dr. Ignacio Varela en el Servicio de Secuenciación Masiva del Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTEC).

La secuenciación se realizó de manera automática y en masa utilizando el equipo GS Junior 454 (Life Sciences, Roche). Se realizó un doble diseño de cebadores, por un lado los utilizados para la amplificación de toda la secuencia los exones 11, 9, 13 y 17 de KIT y los exones 12 y 18 de PDGFRA (tabla 4). Por otro lado otro se sintetizó otros cebadores para una segunda PCR a los que se les añadió una secuencia de unión codificadora específica para cada muestra, (Tabla 5) de manera que se pudiera identificar cada paciente tras su secuenciación. Todos los fragmentos obtenidos fueron purificados mediante Agencourt AMPure XP Kit(BeckmanCoulter). Ambas reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando Phusion High Fidelity polymerase (New England Biolabs) siguiendo las instrucciones del fabricante. La temperatura de hibridación se ajustó a 62°C para ambas reacciones

Tabla 4: Cebadores de la primera PCR

Primera PCR	
Nombre	Secuencia
Junior-Kit_E11A_Fw	GATCTGGCGTTTCTTCCAGAAAGGTGATCTATTTTTCCCTTTCTCC
Junior-Kit_E9_Fw	GATCTGGCGTTTCTTCCAGACTTCCCTTTAGATGCTCTGCTTCTG
Junior-Kit_E13_Fw	GATCTGGCGTTTCTTCCAGAGACATCAGTTTGCCAGTTGTGC
Junior-Kit_E17_Fw	GATCTGGCGTTTCTTCCAGAAAATGGTTTTCTTTCTCCTCCAACC
Junior-PDGFRA_E12_Fw	GATCTGGCGTTTCTTCCAGACTGGTGCCTGGGACTTTGGTAAT
Junior-PDGFRA_E18_Fw	GATCTGGCGTTTCTTCCAGAGGGTGATGCTATTACAGCTACAGATGG
Junior-PDGFRA_E18_Rev	AGACAACAGTTTCGGGTTTGCCGAATCTCTAGAAGCAACACCTGAC
Junior-Kit_E11A_Rev	AGACAACAGTTTCGGGTTTGAAGGGCGCAATTTACACAGA
Junior-Kit_E9_Rev	AGACAACAGTTTCGGGTTTGCAGAGCCTAAACATCCCCTTAAATTGG
Junior-Kit_E17_Rev	AGACAACAGTTTCGGGTTTGTCTTTGCAGGACTGTCAAGC
Junior-PDGFRA_E12_Rev	AGACAACAGTTTCGGGTTTGGTGTGCAAGGGAAAAGGGAGTCT
Junior-Kit-E13_Rev	AGACAACAGTTTCGGGTTTGCCAAGCAGTTTATAATCTAGCATTGCC

Secuencias de cebadores para los exones 11, 9, 13 y 17 de CKIT y 12 y 18 de PDGFRA. Utilizados en la PCR de secuenciación. Fw: del inglés *forward*, cebador directo. Rev: del inglés *reverse*, cebador reverso.

Tabla 5: Cebadores con los códigos de muestras para la segunda PC

Segunda PCR	
Nombre	Secuencia
Lib-A-Junior-MID1-Fwd	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGAGTGCCTGATCTGGCGTTTCTTCCAGA
Lib-A-Junior-MID2-Fwd	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGACGCTCGACAGATCTGGCGTTTCTTCCAGA
Lib-A-Junior-MID3-Fwd	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGAGACGCACTCGATCTGGCGTTTCTTCCAGA
Lib-A-Junior-MID4-Fwd	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGAGCACTGTAGGATCTGGCGTTTCTTCCAGA
Lib-A-Junior-MID5-Fwd	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGATCAGACACGGATCTGGCGTTTCTTCCAGA
Lib-A-Junior-MID6-Fwd	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGATATCGCGAGGATCTGGCGTTTCTTCCAGA
Lib-A-Junior-MID7-Fwd	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGCGTGTCTTAGATCTGGCGTTTCTTCCAGA
Lib-A-Junior-MID8-Fwd	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGTCTCGCGTGTCTAGATCTGGCGTTTCTTCCAGA
Lib-A-Junior-MID9-Fwd	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGTAGTATCAGCGATCTGGCGTTTCTTCCAGA
Lib-A-Junior-MID10-Fwd	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGTCTCTATGCGGATCTGGCGTTTCTTCCAGA
Lib-A-Junior-MID11-Fwd	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGTGATACGCTAGATCTGGCGTTTCTTCCAGA
Lib-A-Junior-MID12-Fwd	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGTACTGAGCTAGATCTGGCGTTTCTTCCAGA
Lib-A-Junior-MID13-Fwd	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGCATAGTAGTGGATCTGGCGTTTCTTCCAGA
Lib-A-Junior-MID14-Fwd	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGCGAGAGATACGATCTGGCGTTTCTTCCAGA
Lib-A-Junior-MID1-Rv	CTATGCGCCTTGCCAGCCCCTCAGACGAGTGCCTAGACAACAGGTTTCGGGTTTG
Lib-A-Junior-MID2-Rv	CTATGCGCCTTGCCAGCCCCTCAGACGCTCGACAAGACAACAGGTTTCGGGTTTG
Lib-A-Junior-MID3-Rv	CTATGCGCCTTGCCAGCCCCTCAGAGACGCACTCAGACAACAGGTTTCGGGTTTG
Lib-A-Junior-MID4-Rv	CTATGCGCCTTGCCAGCCCCTCAGAGCACTGTAGAGACAACAGGTTTCGGGTTTG
Lib-A-Junior-MID5-Rv	CTATGCGCCTTGCCAGCCCCTCAGATCAGACACGAGACAACAGGTTTCGGGTTTG
Lib-A-Junior-MID6-Rv	CTATGCGCCTTGCCAGCCCCTCAGATATCGCGAGAGACAACAGGTTTCGGGTTTG
Lib-A-Junior-MID7-Rv	CTATGCGCCTTGCCAGCCCCTCAGCGTGTCTTAAGACAACAGGTTTCGGGTTTG
Lib-A-Junior-MID8-Rv	CTATGCGCCTTGCCAGCCCCTCAGTCTCGCGTGTCTAGACAACAGGTTTCGGGTTTG
Lib-A-Junior-MID9-Rv	CTATGCGCCTTGCCAGCCCCTCAGTAGTATCAGCAGACAACAGGTTTCGGGTTTG
Lib-A-Junior-MID10-Rv	CTATGCGCCTTGCCAGCCCCTCAGTCTCTATGCGAGACAACAGGTTTCGGGTTTG
Lib-A-Junior-MID11-Rv	CTATGCGCCTTGCCAGCCCCTCAGTACTGAGCTAAGACAACAGGTTTCGGGTTTG
Lib-A-Junior-MID12-Rv	CTATGCGCCTTGCCAGCCCCTCAGTACTGAGCTAAGACAACAGGTTTCGGGTTTG
Lib-A-Junior-MID13-Rv	CTATGCGCCTTGCCAGCCCCTCAGCATAGTAGTGGATCTGGCGTTTCTTCCAGA
Lib-A-Junior-MID14-Rv	CTATGCGCCTTGCCAGCCCCTCAGCGAGAGATACAGACAACAGGTTTCGGGTTTG

Secuencias de cebadores junto a los códigos de muestras para la segunda PCR. Fdw: del inglés *forward*, cebador directo. Rv: del inglés *reverse*, cebador indirecto.

Todos los productos de la segunda PCR se agruparon y secuenciaron en una sola reacción de secuenciación en el Junior 454. Se ajustó el tamaño de filtrado (lecturas > 100pb) y se obtuvieron un total de 73741 lecturas con un tamaño medio de 400 pares de bases.

Los datos codificados por el equipo se integraron en una matriz de análisis de producción propia con el fin de separar las distintas secuencias generadas en ítems individuales mediante su código de muestra. Tras su filtrado se obtuvieron datos convertidos en el formato estándar fastq. Estos archivos se alinearon con el genoma humano de referencia (hg19) utilizando el algoritmo BWA MEM y los nuevos archivos generados se corrigieron utilizando *SAMtools*(<http://samtools.sourceforge.net/>). Por último, dichos archivos se analizaron mediante una matriz propia establecida diseñada para identificar las posiciones que contuviesen un potencial de mutaciones siguiendo los siguientes criterios:

- Cobertura mínima de 20 lecturas en cada muestra tumoral.
- Mínimo de 5 lecturas que informasen de un segundo alelo diferente al de referencia en la muestra del tumor y que dichas lecturas se correspondiesen con al menos el 5% del número total de lecturas en dicha posición.
- Menos de 1% de lecturas que informasen de un tercer alelo en esa posición. Este criterio se refiere a regiones con mucha dificultad para ser alineadas y que contienen un alto potencial de alineado erróneo.
- En el caso de inserciones y deleciones, debido a la alta tasa de falsos positivos, se requirió que un mínimo de 20% de las lecturas informasen de la misma variante.

3.5. Evaluación de resultados

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante test de Wilcoxon, en el caso de que las variables fueran cualitativas y apareadas, o el análisis *t*-test, si se trataba de comparar variables cualitativas y cuantitativas. El nivel de significación estadística se estableció en $p < 0,05$.

Se realizó un análisis comparativo entre las alteraciones moleculares identificadas por el análisis de curvas de fusión de alta resolución (HRMA) y las halladas por el método de secuenciación.

IV. RESULTADOS

En el siguiente apartado pasamos a exponer los resultados más relevantes obtenidos del estudio de mutaciones. Además se presentarán los datos clínico-patológicos más relevantes de la serie de pacientes utilizada. Por último se realizará un análisis estadístico de los distintos datos generados.

4.1. Descripción general de la población en estudio

Se reclutaron un total de 50 pacientes con un diagnóstico clínico-patológico de tumor del estroma gastrointestinal. Del total de muestras obtenidas, sólo en 46 casos fue posible la realización del espectro completo de técnicas proyectadas, debido a problemas con el tamaño y calidad de las muestras y a la escasa cantidad de ADN obtenida de las mismas. Tras la reevaluación de los casos por los patólogos asociados al proyecto, nueve casos (de los 46 finales) fueron excluidos del análisis estadístico por considerar que no cumplían todos los criterios para ser diagnosticados de tumores del estroma gastrointestinal según las normas de clasificación vigentes actualmente, por lo que no fueron incluidos en el análisis estadístico junto al resto de los casos., Sin embargo, a esos nueve casos se les realizaron todas las técnicas y sus resultados y peculiaridades se comentarán en un apartado propio.

Con la intención de estandarizar al máximo los resultados estadísticos conforme a las normas de clasificación vigentes en el momento de la redacción de la tesis (agosto de 2014), los datos que se presentan a continuación se llevaron a cabo únicamente con aquellos casos en los que se realizó el estudio completo.

En cuanto a la distribución por sexos de la población en estudio, 19 tumores de los 37 analizados se detectaron en varones (51,35%) y los restantes en mujeres (48,65%).

Por rango de edad, los pacientes reclutados tenían entre 24 y 84 años, con una media de $60,4 \pm 15,9$ años y una mediana de 60 años. (Figura 17). Nuestra población presentó una mayor frecuencia en el intervalo comprendido entre los 60 y los 81 años.

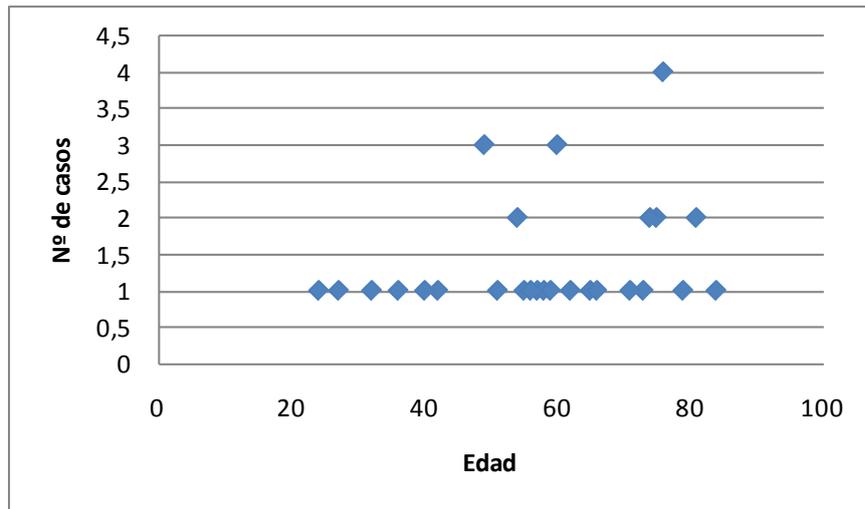


Figura 17: Diagrama de dispersión de las edades de los pacientes de nuestra serie.

En cuanto a la localización anatómica de los tumores analizados, nuestra serie se desvía un poco de los datos publicados. De los 37 GIST analizados, 17 de ellos se localizaron en el estómago, otros 18 en intestino delgado y 2 casos se hallaron en localización extragastrointestinal: epiplón e hígado. (Figura 18-1).

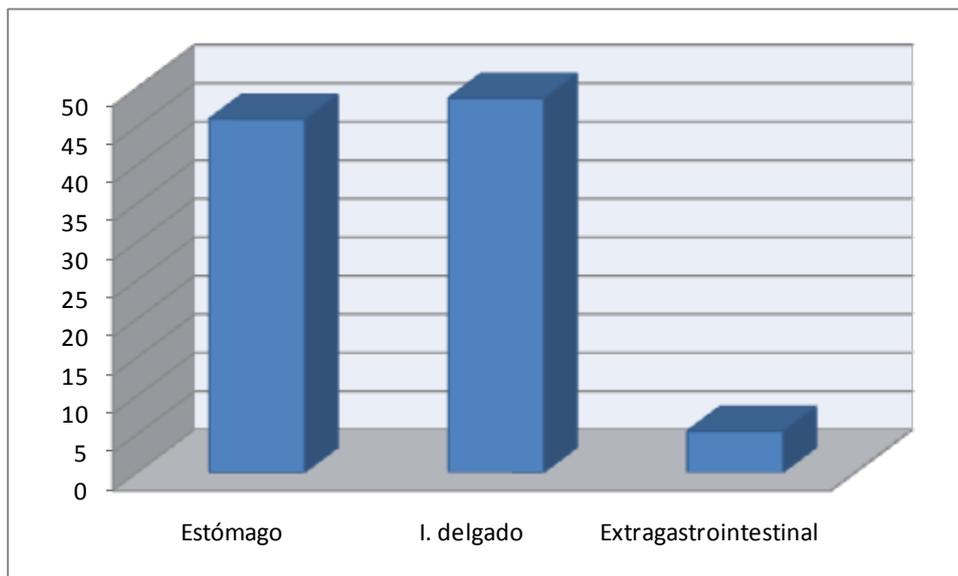


Figura 18: Distribución de la localización tumoral.

4.2. Perfil inmunohistoquímico de los GIST

Para el correcto diagnóstico de GIST es necesario (en la actualidad) la realización de al menos una técnica inmunohistoquímica contra las principales proteínas implicada en el proceso carcinogénico de este tipo tumoral, CKIT o DOG 1.

Con el fin de homogeneizar los datos para el estudio, se decidió repetir las técnicas inmunohistoquímicas a todas las muestras, independientemente de que en el momento del diagnóstico inicial se hubieran realizado. De hecho numerosos casos no habían sido valorados respecto a la expresión de DOG al tratarse de un anticuerpo de uso reciente. Los controles internos y externos asociados a cada técnica mostraron un patrón de positividad o negatividad según lo esperado, indicando la correcta optimización de las técnicas y de los anticuerpos utilizados.

Las técnicas inmunohistoquímicas de CKIT, PDGFRA y DOG-1 se consideraron positivas cuando existía tinción clara citoplasmática y/o de membrana en las células tumorales. Se realizó una evaluación cualitativa de las muestras, siendo clasificadas como positivas o negativas sin ningún criterio de intensidad. Según el inmunomarcaje para CKIT, se encontraron casos con patrón tanto de membrana, como citoplasmático o tipo Golgi. Frecuentemente se observaron de forma combinada, aunque también se presentaron de forma aislada. El porcentaje total de expresión de CKIT en nuestra serie fue del 97,3%. El estudio inmunohistoquímico de DOG-1 demostró un porcentaje de positividad del 86.5% con un patrón de marcaje similar al de CKIT sin diferencias significativas, mientras que PDGFRA se diferenció significativamente y presentó un porcentaje de marcaje muy inferior al resto, del solo 54,1%. (Tabla 6)

Tabla 6: Resultados del estudio inmunohistoquímico de CD117, PDGFRA y de DOG-1 en las 37 muestras de la serie con diagnóstico de GIST.

<i>ID</i>	<i>CD117</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>DOG-1</i>		<i>ID</i>	<i>CD117</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>DOG-1</i>
1	Post	Neg	Post		26	Post	Post	Post
2	Post	Neg	Post		28	Post	Post	Post
3	Post	Neg	Post		30	Post	Post	Post
5	Post	Post	Post		34	Post	Post	Post
6	Post	Post	Post		35	Post	Post	Post
7	Post	Post	Neg		37	Post	Post	Post
9	Post	Post	Post		40	Post	Post	Post
10	Post	Post	Post		41	Post	Neg	Neg
11	Post	Neg	Neg		42	Post	Neg	Post
12	Post	Neg	Post		43	Post	Post	Post
13	Post	Neg	Post		44	Post	Post	Post
17	Post	Post	Neg		45	Post	Post	Post
18	Post	Neg	Post		46	Post	Neg	Post
19	Post	Neg	Post		47	Post	Post	Post
20	Post	Post	Post		50	Post	Neg	Post
21	NV	Post	Post		52	Post	Neg	Post
22	Post	Neg	Post		54	Post	Neg	Post
23	Post	Neg	Post		55	Post	Neg	Neg
25	Post	Post	Post					

Post= positivo, Neg= negativo, NV= no valorable

4.3. Optimización de la técnica de HRM

Debido a la sensibilidad de la técnica para el análisis de las curvas de fusión, se requiere una PCR con alta especificidad y reproducibilidad. Es por ello que se decidió llevar a cabo un estudio previo para determinar la metodología óptima de extracción del DNA, teniendo en cuenta 3 aspectos principales; la calidad y pureza, la cantidad de DNA extraído y por último la reproducibilidad de la PCR. Todo ello resulta aún más crítico al tratarse de muestras fijadas en formol e incluidas en parafina de diferentes años, con antigüedad diversa y diferentes tiempos de fijación e inclusión. Para ello se llevó a cabo un estudio de extracción del DNA utilizando tres kits comerciales distintos de extracción manual, no robotizada (ROCHE, QIAGEN y GENOMICA). Posteriormente se realizó la amplificación de los distintos exones con las muestras extraídas con los

distintos métodos En el siguiente apartado se presentan los datos más significativos de este estudio.

4.3.1. Análisis de la extracción de ADN

Debido a la limitación del material de estudio, al tratarse de muestras conservadas en parafina, se decidió comparar únicamente 10 muestras representativas de la serie correspondientes a diferentes etapas temporales para asegurar la representatividad del ensayo. En la tabla 7 y en la figura 19 se recogen los datos correspondientes a las extracciones llevadas a cabo por los tres métodos.

Tabla 7: Comparación entre los tres métodos de extracción evaluados en relación a la concentración y pureza obtenida.

	QIAGEN		ROCHE		GENOMICA	
	Conc.(ng/μl)	P (A 260/280)	Conc.(ng/μl)	P (A 260/280)	Conc.(ng/μl)	P (A 260/280)
MEDIA	68,9	2,03	34,3	1,73	60,5	1,52
DS	23,0	0,08	25,1	0,35	30,9	0,1
MEDIANA	72,2	2,05	21,8	1,9	53,6	1,54

Conc.= concentración, P= pureza.

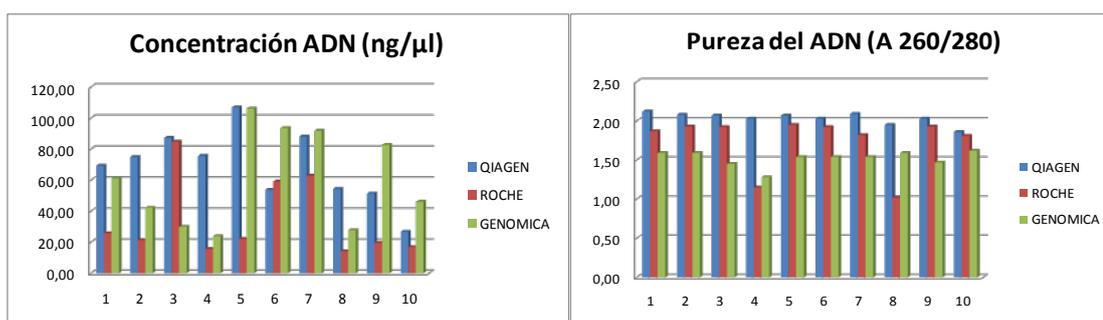


Figura 19: Representación de las concentraciones y las purezas comparando los 3 métodos evaluados.

Se determinó un aumento significativo ($p=0,009$) en la cantidad de ADN extraído con el kit de Qiagen frente a la extracción de Roche. No obstante, ambas metodologías

presentaron un rango de concentraciones medias por encima del ADN necesario para llevar a cabo los análisis previstos. (Figura 20)

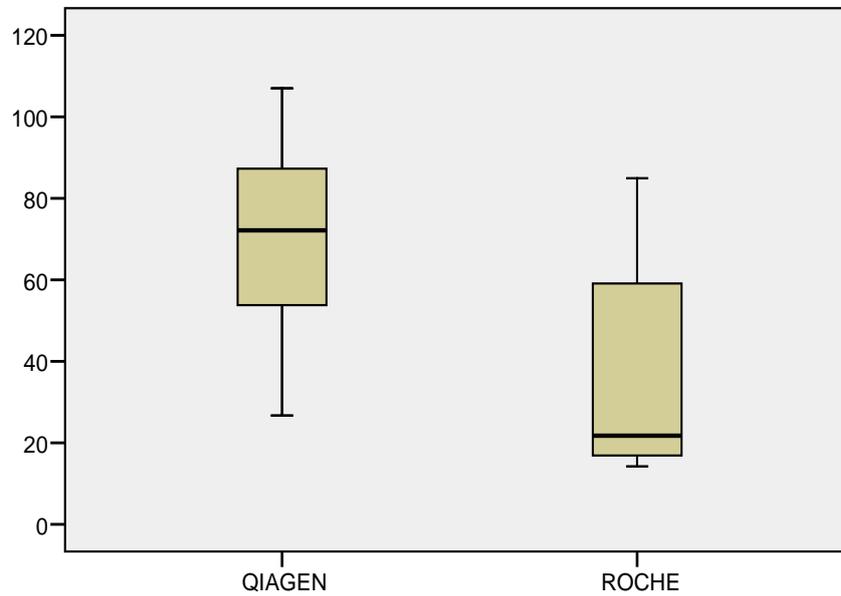


Figura 20: dispersión de las concentraciones obtenidas por los dos métodos de extracción: QIAGEN y ROCHE.

El estudio de pureza determinó que la extracción realizada con el kit de Genomica no ofrecía una pureza admisible para la realización de la amplificación, mientras que la diferencia entre las purezas del kit de QIAGEN y el kit de Roche no resultó significativa (Fig. 21).

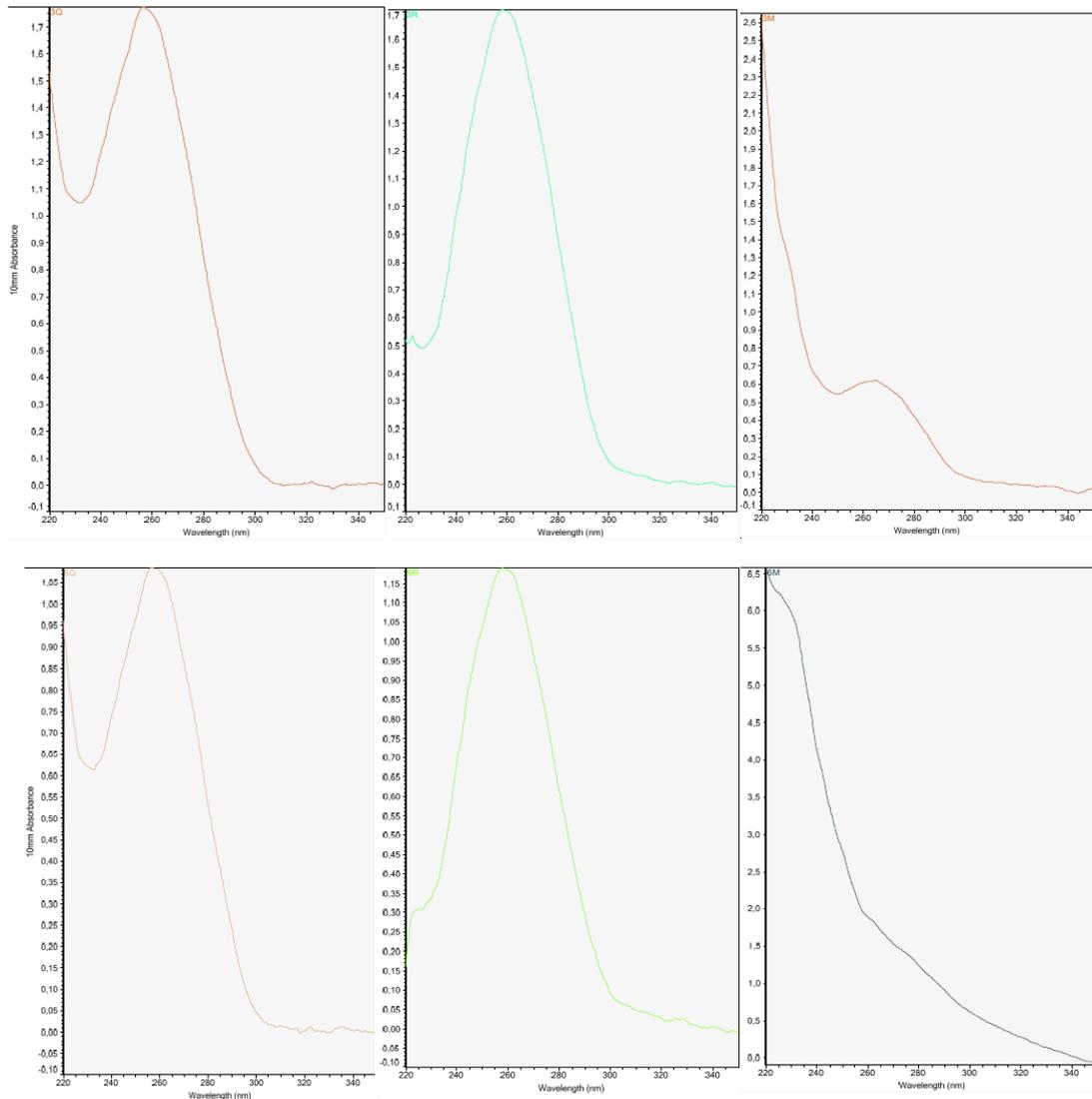


Figura 21: Gráficas de las medidas de concentración y pureza del ADN extraído de tres muestras de la serie (3 y 6). De izquierda a derecha arriba: muestra 3 con extracción de QIAGEN, Roche y Genomica. En la fila inferior; misma disposición de los métodos de extracción para la muestra 6. Se representa la absorbancia frente a la longitud de onda.

Tras el análisis de los datos obtenidos de la extracción de DNA, se decidió no continuar los experimentos con la extracción de Genomica ya que esta metodología no ofrecía una pureza asumible para la sensibilidad de la técnica a aplicar.

Se procedió por tanto al estudio mediante HRM de las 10 muestras, para evaluar el comportamiento general según cada metodología de extracción (Qiagen y Roche). El criterio de evaluación fue la reproducibilidad del proceso de amplificación medido por

la uniformidad de las Cp (crossing point) en un ensayo por triplicado de cada una de las muestras (Tabla 8, Figura 22).

Tabla 8: Datos de la Cp de las muestras por los tres métodos evaluados.

Sample ID	QUIAGEN			ROCHE		
	Cp1	Cp2	Cp	Cp1	Cp2	RCp3
1	36,91	37,32	37,05	32,60	32,83	33,05
2	39,28	37,83	38,27	32,79	32,80	32,71
3	34,78	34,95	34,65	31,63	31,61	31,44
4	38,82	39,45	41,29			
5	40,20	39,88	47,83	35,16	35,14	35,23
6	41,11	39,40	40,12	38,60	38,23	38,15
7	36,88	36,40	36,13	33,99	33,92	33,89
8	39,18	47,59	39,26			
9	39,33	43,06	40,89	39,07	39,75	38,97
10	40,15	41,56	0,00	41,18	43,98	41,33

Se observan los datos por triplicado. Las muestras #4 y #8 no se procesaron por haber establecido la concentración mínima de la prueba en 20ng/μl.

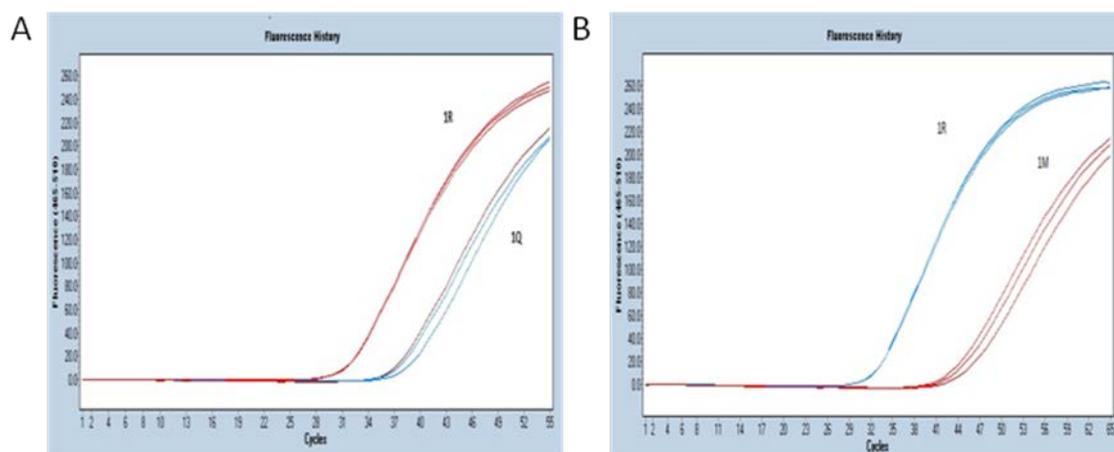


Figura 22: curvas de amplificación de la PCR-RT.

De izquierda a derecha, A) muestra 1 extraída con el método de Roche y el de Qiagen, B) muestra 1 comparando el método de Roche y el de Qiagen.

El análisis estadístico (Figura 23) demostró una homogeneidad intramuestral mayor en el análisis de la muestras extraídas con el kit de Roche así como un inicio de la amplificación más temprano, al compararla con sus homólogas extraídas con el kit de Qiagen. Aunque estadísticamente no existe una diferencia significativa ($p=0,069$, test de Wilcoxon), asumimos que la clara tendencia diferencial entre los dos métodos era válida debido al limitado número muestral.

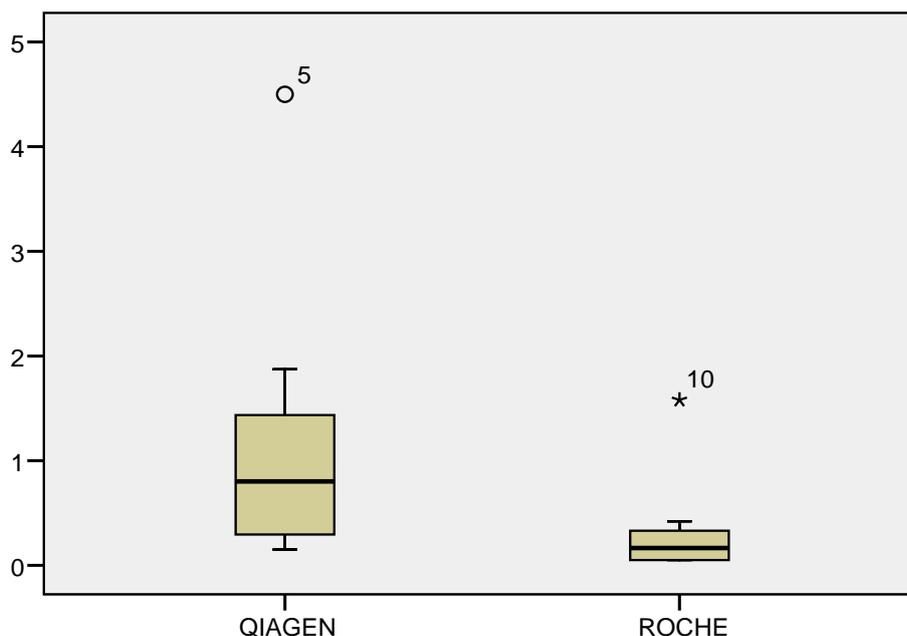


Figura 23: representación de la variabilidad intramuestral observada durante la fase de amplificación de la PCR-RT.de las muestras obtenidas mediante las dos técnicas de extracción

Considerando los resultados anteriores, y considerando que la homogeneidad intramuestral de la amplificación debía tener un mayor valor (asumiendo el hecho de que con ambas técnicas de extracción se superaba la concentración necesaria para los análisis posteriores, 4ng/μl), se concluyó que el uso del kit COBAS de Roche para la extracción era el más adecuado.

4.4. Análisis de las Curvas de Fusión del Alta Resolución

En el siguiente apartado se procede a analizar los resultados obtenidos del estudio por HRM de los exones 9, 11,13 y 17 de *CKIT* y 12 y 18 de *PDGFRA*. Aunque se realizó el análisis de todos los exones para cada una de los pacientes, debido a problemas en la amplificación, hubo casos (exones concretos de pacientes concretos) que no pudieron ser analizados en el estudio. No pudo realizarse una repetición de dichos casos ya que el material disponible era escaso.

Al igual que se presenta en la literatura científica, el exón 11 de *CKIT*, presentó una mayor frecuencia de mutaciones (44,8%), con un total de 13 muestras mutadas de 37 casos. Tras el exón 11, el análisis del exón 9 mostró un porcentaje de muestras mutadas

del 25%, el exón 13 un 18,8% de mutaciones mientras que para el exón 17 sólo se observó mutaciones en un 11,1% de las muestras analizadas (Figura 24).

Respecto *PDGFRA*, se encontraron mutaciones del exón 12 en el 26,5% de las muestras. El exón 18, por su parte presentó una tasa de mutaciones del 21,4% (Figura 24).

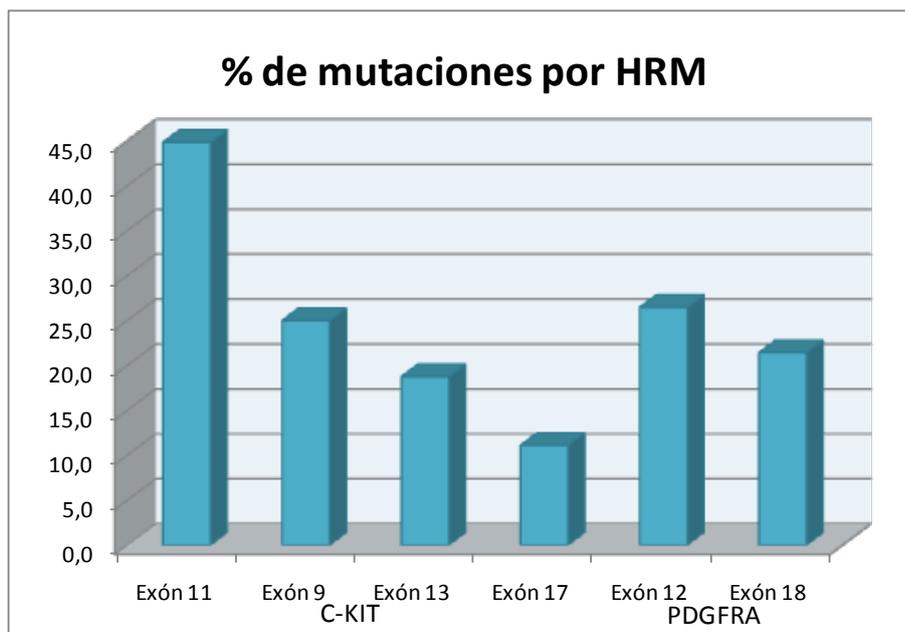


Figura 24: Distribución de las mutaciones según el exón analizado.

Del total de muestras analizadas, el estudio de las curvas de fusión de alta resolución reveló que 13 casos presentaban mutaciones en dos o más exones. Además, un 61% de las muestras que presentaban dobles mutaciones (8 casos) se encontraban en los dos genes en estudio, *CKIT* y *PDGFRA*. Los datos obtenidos de análisis de HRM para cada muestra se recogen en la tabla 9.

Tabla 9: Distribución de las mutaciones en CKIT y PDGFRA por muestra.

Análisis por HRM						
Id	KIT				PDGFRA	
	Exon 11	Exon 9	Exon 13	Exon 17	Exon 12	Exon 18
1	MUT					
2	MUT			MUT		
3						
5						
6						
7						
9	MUT	MUT			MUT	
10	MUT	MUT				
11		MUT		MUT	MUT	
12	MUT		MUT		MUT	
13		MUT		MUT		
17					MUT	
18	MUT		MUT			
19	MUT	MUT				
20						
21						
22		MUT				
23					MUT	
25						
26				MUT	MUT	
28			MUT		MUT	
30						
34	MUT					
35						MUT
37						
40						
41	MUT	MUT			MUT	
42					MUT	
43	MUT					MUT
44						
45						MUT
46						
47						
50	MUT					
52	MUT	MUT				
54						
55	MUT					

4.5. Estudio de secuenciación masiva

Con el fin de validar los datos obtenidos del análisis mediante HRM, se realizó un estudio de secuenciación masiva, A diferencia de los datos obtenidos por HRM, se obtuvieron datos valorables en todos los exones analizados en cada una de las muestras.

Debido a que la secuenciación permite un análisis más detallado del tipo de alteraciones moleculares encontradas, se observó en la serie una gran presencia de polimorfismos de nucleótido simple silenciosos (SNPs). El 81,08% de los pacientes presentó mutación en *CKIT* o *PDGFRA* (30/37), de las cuales el 43,24% fueron mutaciones activas (considerándose activa aquellas mutaciones que implican un cambio en la funcionalidad de la proteína) y el 37,84% correspondió a pacientes con SNPs, es por ello, que sólo consideraremos las mutaciones activas como pacientes mutados.. El 18,92% restante de los pacientes no presentaron alteración alguna (WT).

Al igual que en el análisis por HRM la secuenciación masiva resultó en un mayor porcentaje de casos mutados en el exón 11 de *CKIT* con 8 de las 16 muestras que presentaron mutación activa (50%). El exón 18 de *PDGFRA* con 4 casos (10,8%) fue el segundo fragmento más alterado. El exón 9 de *CKIT* presentó 3 casos (18,75%) y el exón 12 de *PDGFRA* 2 casos (12,55%). No se encontraron mutaciones activas en los exones 13 y 17 de *CKIT*. La suma total de los porcentajes de mutaciones por exones es superior al 100% debido a que un paciente presentó mutación activa tanto en el exón 12 como en el exón 18 de *PDGFRA*.

Tabla 10: distribución de las mutaciones en CKIT y PDGFRA por casos.

Id	Análisis por secuenciación					
	KIT				PDGFRA	
	Exon 11	Exon 9	Exon 13	Exon 17	Exon 12	Exon 18
1						
2		MUT				
3		MUT				
5						MUT
6	MUT					
7						MUT
9		MUT				
10	MUT INT					
11	MUT INT					
12	MUT					
13	MUT					
17						
18						
19	MUT					
20						
21						
22						
23						
25						
26						
28						
30						
34						
35						
37						MUT
40	MUT					
41						
42	MUT					
43						
44						
45					MUT	MUT
46						
47	MUT					
50	MUT					
52						
54					MUT	
55						

Estos datos presentados para la secuenciación están basados en el análisis de casos con mutaciones activas, no obstante al considerar conjuntamente los SNPs silenciosos

con las mutaciones activas los resultados del análisis varían considerablemente. En este contexto, el exón 12 de *PDGFRA* pasa a ser el más alterado seguido del exón 18. (Figura 25). La comparación del análisis teniendo en cuenta los SNPs con el análisis considerando sólo las mutaciones activas muestra una clara diferencia en el cómputo global de mutaciones entre *CKIT* y *PDGFRA* siendo el 43,2% al contar sólo mutaciones activas y 81,1% valorando tanto SNPs como mutaciones silenciosas.

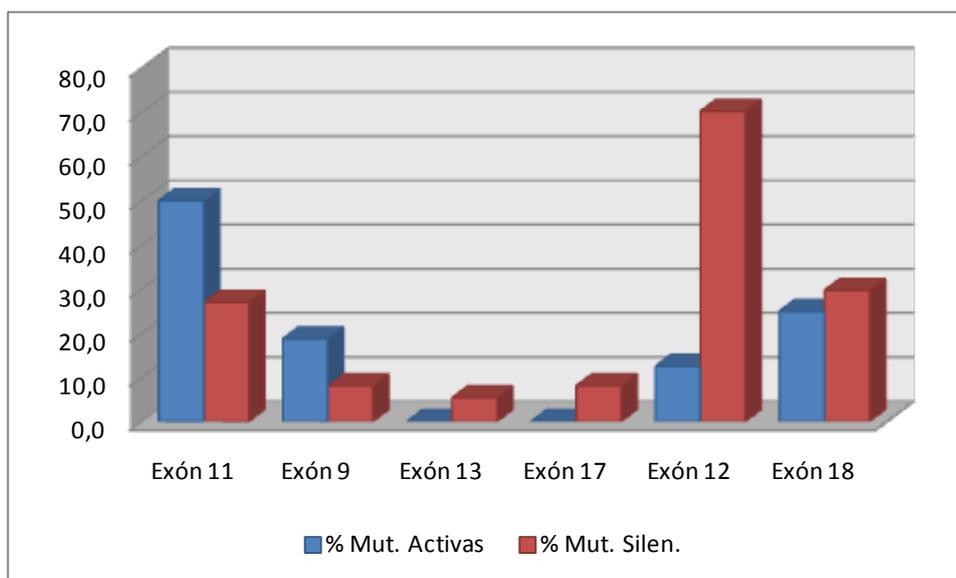


Figura 25: Distribución de las mutaciones según el exón afectado.

Considerando únicamente las mutaciones activas, se observó un mayor porcentaje de alteraciones de tipo puntual (60%) frente a deleciones/inserciones (INDEL, 40%). En ninguna muestra se encontraron duplicaciones, ni tampoco mutaciones de tipo translocación/inversión. La tabla 11 recoge los datos de los diferentes tipos de mutaciones encontradas en cada exón.

Tabla 11: Distribución de los diferentes tipos de mutaciones por exones.

Tipo de mutación	Exón	Nº mut.
Delecion-insercion (indel)	11 de C-KIT	5
	9 de C-KIT	3
Puntual	11 de C-KIT	6
	12 de PDGFRA	2
	18 de PDGFRA	4

Las 11 mutaciones halladas en el exón 11 de *CKIT* corresponden a ocho muestras, dos de localización gástrica y las seis restantes de localización intestinal. Una de las muestras, la número 42, presentó cuatro mutaciones diferentes, una indel en el codón 550 y tres sustituciones en los codones 556 y 557. El exón 11, presentó además alteraciones en otros codones: 551 (indel), 556 (indel), 557 (puntual), 560 (puntual), 563 (indel) y el 567 (indel) en las muestras 13, 19, 6, 12 y 40, 50 y 47 respectivamente. Únicamente se observaron tres mutaciones en el exón 9 de *CKIT*, dos de las muestras de localización intestinal y la tercera de origen gástrico. En los tres casos el codón afectado fue el 501.

Las dos mutaciones descritas para exón 12 de *PDGFRA* se hallaron en casos de localización intestinal y gástrico. En ambos casos se trató de una mutación puntual que afectó al codón 576. En el exón 18 del mismo gen se hallaron cuatro mutaciones puntuales en el codón 842. Todas ellas en casos de tumores de origen gástrico. La muestra número 45, que presentaba una mutación en el exón 12 también tenía una mutación puntual en el exón 18 de *PDGFRA*.

Lo más destacable del estudio de secuenciación masiva fue el alto índice de mutaciones silenciosas encontradas. Se describieron 88 SNPs silenciosos en los diferentes exones estudiados de *CKIT* y *PDGFRA* (Tabla 12). Treinta muestras del total analizadas presentaron una o más sustituciones silenciosas (81,1%). Varias de esas muestras, presentaron a su vez coincidencia con mutaciones activas. (Tabla suplementaria 13, Anexos)

Tabla 12: Distribución de las mutaciones silenciosas por exones y codones.

	Exón	Nº de SNP	Codón				
			555	560			
KIT	11	2	555	560			
	13	1	641				
	17	3	798	805			
PDGFRA	12	71	558	567	569	576	579
	18	11	817	824	834		

Dentro de las mutaciones silenciosas se encontró un mayor porcentaje de sustituciones en el gen *PDGFRA* (93,18% de mutaciones) y concretamente en el exón 12 (80,68% de mutaciones). Cabe destacar la presencia de una alteración repetitiva presente en los codones 569 y 579 (exón 12, c.1707A>G/c.1737G>A) que se observó en el 54 % de las muestras (20 de 37) de la que no consta referencia ni por tanto frecuencia de aparición por no haberse descrito previamente. De las 14 mutaciones silenciosas encontradas en la serie sólo tres se habían descrito con anterioridad (1000 Genomas¹) (tabla 14).

Tabla 14: Descripción de las sustituciones silenciosas halladas en el análisis según el exón en el que se localizó.

c. Annot	p. Annot	Exón	Referencia	Frecuencia
c.1665A>T	p.V555V	11		
c.1680T>G	p.V560V	11		
c.1680T>A	p.V560V	11		
c.1923C>A	p.L641L	13		
c.2394C>T	p.I798I	17	rs55789615	0,013
c.2412G>A	p.R804R	17		
c.1674C>T	p.R558R	12		
c.1701A>G	p.P567P	12	rs1873778	0,96
c.1707A>G	p.G569G	12		
c.1737G>A	p.Q579Q	12		
c.2451T>A	p.R817R	18		
c.2472C>T	p.V824V	18	rs2228230	0,212
c.2502C>T	p.I834I	18		

Para terminar, el análisis de mutaciones por secuenciación masiva determinó cuatro mutaciones intrónicas de tipo INDEL de significado desconocido. Dos sustituciones en el exón 11 de *CKIT*, otra en el 13 del mismo gen y la última en el exón 12 de *PDGFRA*.

¹ El Proyecto 1000 Genomas es una colaboración internacional para generar un catálogo público de las variaciones genéticas humanas, incluyendo SNPs y variantes estructurales y sus contextos de haplotipos. Los resultados del estudio son libres y enteramente disponibles a los investigadores de todo el mundo.

4.6. Tumores de dudoso diagnóstico

A los nueve tumores que tuvieron que retirarse de la serie por considerarse (con los criterios actuales) tumores del tracto digestivo no GIST se realizó, no obstante el análisis inmunohistoquímico y molecular, con el fin de determinar la funcionalidad de estos análisis y el correcto diagnóstico de dicho tipo tumoral..

Estos nueve casos correspondían a tumores de localización variada: estomacal (3), íleon (1), intestino grueso (2), hígado (1), presacro (1) y nervio ciático (1). Las características tanto moleculares como inmunohistoquímicas de estos nueve tumores se recogen en la tabla 15.

Tabla 15: características halladas en las tumores no GIST.

ID	SNP		Exón	Mutación activa/Exón	CD117	PDGFRA	DOG-1	HRM +/-	Exón
4	c.1701A>G	p.P567P	12		POST	NEG	NEG	POST	12
	c.2394C>T	p.I798I	17						
14	c.1701A>G	p.P567P	12		NEG	NEG	NEG	POST	9
15	c.1680T>G	p.V560V	11		NEG	NEG	NEG	POST	9
	c.1701A>G	p.P567P	12						
	c.1707A>G	p.G569G	12						
	c.1737G>A	p.Q579Q	12						
16	c.1701A>G	p.P567P	12		NEG	NEG	NEG	POST	11 y 9 y 17 y 12
	c.1707A>G	p.G569G	12						
	c.1737G>A	p.Q579Q	12						
29	c.1701A>G	p.P567P	12		NEG	NEG	NEG	POST	13
	c.1707A>G	p.G569G	12						
	c.1737G>A	p.Q579Q	12						
36	c.1701A>G	p.P567P	12		NEG	NEG	NEG	NEG	
	c.1737G>A	p.Q579Q	12						
38	c.1701A>G	p.P567P	12		NEG	NEG	NEG	NEG	
	c.1707A>G	p.G569G	12						
	c.1737G>A	p.Q579Q	12						
51	c.2472C>T	p.V824V	18		NEG	NEG	NEG	POST	18
53	c.1701A>G	p.P567P	12		NEG	POST	NEG	NEG	
	c.1707A>G	p.G569G	12						
	c.1737G>A	p.Q579Q	12						

En todas las muestras se hallaron polimorfismos, al igual que ocurrió en las muestras de la serie en estudio, pero sin embargo, ningún caso presentó mutaciones activas.

4.7. Análisis comparativo de HRM, secuenciación e inmunohistoquímica.

En el siguiente apartado pasaremos a realizar una comparativa entre los distintos métodos de análisis de mutaciones descritos en los apartados anteriores. Como control estándar de la técnica, y basándonos en la bibliografía existente, se cotejaron los resultados obtenidos de los distintos análisis de mutaciones con la inmunohistoquímica para CKIT. Se buscó la concordancia estadística existente entre los distintos métodos para el diagnóstico certero de los GIST. En un primer análisis estadístico se estudiaron los resultados obtenidos únicamente para el análisis de las mutaciones activas, mientras que en una segunda comparativa se incorporaran los polimorfismos silenciosos. Los resultados obtenidos de los dos análisis se recogen en la tabla 16.

Tabla 16: características estadísticas de las técnicas utilizadas durante el estudio.

	SE(%)	ES(%)	VP+(%)	VP-(%)
PDGFRA	51,4	0	54,5	45,9
DOG1	83,8	0	86,5	13,5
HRM	63,9	100	62,2	37,8
SEC.	44,4	100	43,2	56,8
SEC. +SNP	83,3	100	81,1	18,9

Considerando la inmunotinción para CKIT como Gold Stándar para la comparativa.

Teniendo en cuenta el bajo número muestras con la que se ha llevado a cabo el estudio, la aplicación de la prueba no paramétrica de Chi cuadrado debería desestimarse. Sin embargo, se utilizó para evaluar la tendencia de modo cualitativo. Sólo se apreció una concordancia significativa entre el diagnóstico basado en las pruebas inmunohistoquímicas de CKIT y DOG1. El análisis de secuenciación masiva teniendo en cuenta la mutaciones silenciosas también resulto equivalente a la prueba inmunohistoquímica para CKIT.

El porcentaje global de concordancia entra el HRM y la secuenciación, sin embargo, no presentó una correspondencia estadística, ya que valorando tanto las mutaciones activas y como las mutaciones silenciosas (Tabla 17) sólo se encontró una equivalencia máxima del 60%.

Tabla 17: concordancia global entre técnicas moleculares de análisis de mutaciones:

	Secuenc.	Secuenc. + SNP
HRM	37,80%	59,50%

V. DISCUSIÓN

5.1. Parámetros clínicos

Los tumores del estroma gastrointestinal son considerados un tipo raro de cáncer. No existen datos sobre la prevalencia a nivel mundial pues durante décadas han sido clasificados como leiomiomas, leiomiomasarcomas, leiomioblastomas o schwannomas. Se cree, no obstante que representan entre un 1% y un 3% de los tumores malignos gastrointestinales y se está comprobando que la prevalencia real es superior a lo que en un principio se pensaba (68-70). En España, su incidencia se estima en 457 nuevos casos al año, es decir, 11,1 casos por cada millón de habitantes [www.seom.org]. En otros países se describen incidencias similares a la española, por ejemplo Islandia con 11 u Holanda con 12,7 nuevos casos anuales por cada millón de habitantes(14). Estudios recientes describen ratios de incidencia de entre 10-20, 7-15 y 14 casos nuevos por millón de habitantes al año en Estados Unidos, Europa y Taiwán, respectivamente(71). La variación que se presenta en la estadística entre distintos países y continentes puede ser debida a una incorrecta o deficitaria recogida de datos, por lo que se pone de manifiesto la necesidad de un “censo” universal para este tipo de tumor que permita llevar a cabo una estadística de incidencia y prevalencia a nivel mundial, al igual que ya existe para otras neoplasias. Esta herramienta permitirá valorar de forma más fiable las diferencias entre países o continentes y posibilitará la asociación a posibles factores de riesgo para el desarrollo de esta enfermedad.

No existe consenso en las revisiones bibliográficas en cuanto a la distribución por sexos de esta enfermedad, aunque la prevalencia de un sexo sobre otro no suele ser llamativa(12, 13, 72). En nuestra serie, coincidiendo con los datos publicados, se halló paridad en la distribución de los GIST por sexos. Coincidiendo con lo descrito en estudios de series más largas, estos tumores se diagnosticaron con mayor frecuencia en pacientes con edades comprendidas entre los 41 y 80 años, con una edad media de 60,4 años. No se registró ningún caso en menores de 20 años.

En cuanto a la localización tumoral, la mayoría de las series describen el estómago como la localización más frecuente en la aparición de tumores GIST (60-70%). Tras el estómago se encuentran el intestino delgado (20-30%), intestino grueso (5%) y esófago (5%) (8, 73, 74). En raras ocasiones, los GIST se pueden desarrollar fuera del tracto gastrointestinal, como el mesenterio, omento o retroperitoneo, aunque principalmente se consideran extensiones del tumor primario o metástasis(9, 75). De manera muy puntual

se han dado casos en los que se observó presencia de GIST en el apéndice, páncreas, útero, vagina o vesícula biliar(76-79). La distribución anatómica es un parámetro de valor pronóstico, independiente del tamaño, del número de mitosis y de la edad del paciente. En concreto, los tumores localizados en intestino delgado se asocian con una mayor malignidad mientras que aquéllos de localización esofágica tienden a mostrar un comportamiento más benigno(5, 8, 74, 80, 81). En este aspecto, la serie que hemos analizado difiere con los datos generales de la literatura, puesto que se observó una distribución similar en intestino delgado (48,65%) y estómago (45,95%).

La serie utilizada para este trabajo de tesis recogió los casos de GIST diagnosticados en el HUMV durante ocho años. En nuestra comunidad, Cantabria, con una población de aproximadamente 500.000 habitantes, durante dicho periodo 50 pacientes fueron diagnosticados de tumor del estroma gastrointestinal según los archivos del servicio de Anatomía Patológica. Teniendo en cuenta que existen dos hospitales comarcales en nuestra comunidad en los que pudieron diagnosticar algún otro caso, la incidencia de nuestra comunidad se puede estimar en 1,25 casos por 100.000 habitantes. Estos datos se correlacionan con los publicados por la SEOM, que consideran la incidencia en nuestro país en 1,11 casos por 100.000 habitantes.

El tamaño muestral de los estudios presentados en la literatura es muy heterogéneo, con estudios que comprenden desde 29 pacientes(2) hasta 96 (4). De la misma manera, existe un amplio rango de variabilidad en la incidencia de las mutaciones observadas por genes y exones, que oscilan entre un 56 y un 92% de pacientes con mutación en CKIT y entre un 5 al 21% para PDGFRA(2, 3, 68, 82) (Tabla 18). Teniendo en cuenta que no todos los estudios publicados se llevan a cabo sobre los dos genes, la gran variabilidad metodológica descrita en los distintos análisis y la falta de consenso en su interpretación, dificulta aún más la valoración de estas.

Tabla 18: Resumen de estudios anteriormente publicados. Número de pacientes y porcentaje de mutaciones encontradas para cada exón.

Country	Gene	Number of studies/ total sample number	Mutated exons (%)					
			<i>KIT</i>				<i>PDGFRα</i>	
			11	9	13	17	18	12
Taiwan	<i>KIT</i>	2/188	66.1	14.2	0.0	0.0	-	-
	<i>PDGFRα</i>	1/134	-	-	-	-	0.0	0.8
Japan	<i>KIT</i>	2/118	58.7	7.0	0.0	NP	-	-
	<i>PDGFRα</i>	1/70	-	-	-	-	4.3	2.9
China	<i>KIT</i>	1/165	63.0	6.6	1.3	0.6	-	-
	<i>PDGFRα</i>	1/165	-	-	-	-	3.0	0.0
Brazil	<i>KIT</i>	1/55	69.0	3.6	0.0	0.0	-	-
	<i>PDGFRα</i>	1/55	-	-	-	-	1.8	5.5
Spain	<i>KIT</i>	1/166	47.5	2.4	0.6	1.6	-	-
	<i>PDGFRα</i>	1/166	-	-	-	-	4.0	4.0
USA	<i>KIT</i>	4/818	56.5	8.9	0.4	0.6	-	-
	<i>PDGFRα</i>	3/693	-	-	-	-	8.1	0.7
Europe	<i>KIT</i>	3/591	62.6	9.9	1.4	0.45	-	-
	<i>PDGFRα</i>	3/579	-	-	-	-	3.9	0.8
South Africa	<i>KIT</i>	1/46	69.6	2.8	0.0	0.0	-	-
	<i>PDGFRα</i>	1/46	-	-	-	-	6.5	0.0

NP, not performed.

Tabla adaptada de Gillian Baker *et al*, Molecular characterization of gastrointestinal stromal tumors in a South African population, *Oncology Letters* 5:155-160, 2013.(83)

5.2. Inmunohistoquímica en GIST

En los últimos años, se han experimentado importantes avances en el diagnóstico y tratamiento de los sarcomas y en particular de los GIST, gracias al mejor conocimiento de su patogénesis. Como en otros campos de la patología, las técnicas inmunohistoquímica han resultado ser una herramienta poderosa para el diagnóstico certero de los GIST(84). Debido a que la mayoría de los GIST expresan CKIT, y a que dicha expresión fue considerada un requisito imprescindible en los primeros ensayos con imatinib, se ha realizado un exhaustivo estudio de este marcador tanto en la literatura biomédica como en su uso para el diagnóstico, llegando a considerarse como el criterio de referencia en el diagnóstico de los GIST. Sin embargo, hay ciertas consideraciones que se deben tener en cuenta a la hora de interpretar esta técnica. La bibliografía presenta casos diagnosticados por su morfología como GIST que resultaron negativos para la inmunohistoquímica contra CKIT (5%) (14, 22, 24). Además, es importante tener presente que la expresión de este marcador, aunque posee una alta

sensibilidad (95%), no es del todo específica de los GIST, ya que puede expresarse en otros tipos tumorales como melanoma metastásico, angiosarcoma (50%), seminomas, Carcinomas pulmonares de células pequeñas, sarcoma de Ewing (50%), neuroblastomas infantiles (30%) y tumores mieloides extramedulares(85). Por tanto, se considera que una adecuada estandarización de la técnica es fundamental para evitar dar lugar a diagnósticos tumorales erróneos y para evaluar de forma unánime la alta variabilidad en intensidad y distribución de este marcador (127).

La batería de marcadores inmunohistoquímicos realizada para el diagnóstico de los GIST ha ido variando en consonancia al mayor conocimiento sobre estos tumores. Aunque el marcador por excelencia sigue siendo el CKIT, Heinrich *et al* en 2003(21) describieron que alrededor del 30% de los tumores GIST con mutación en CKIT también expresaban fuertemente PDGFRA, una oncoproteína implicada en la patogénesis tumoral. Algunos estudios, posteriormente, señalaron el patrón característico de PDGFRA en los GIST y su papel coadyuvante en los casos CKIT negativo(86), aún así el uso de rutina de este marcador no está recomendado. El descubrimiento de DOG-1 como un marcador más sensible y específico, (al ser negativo en el sarcoma de Ewing, en melanoma y en los tumores mieloides extramedulares), ha supuesto una herramienta muy útil para el diagnóstico de GIST, especialmente en aquellos casos donde la expresión de CKIT o PDGFRA es dudosa o ausente (127). Además, este marcador, tiene la ventaja de presentar expresión por inmunohistoquímica independientemente del tipo de mutación(31, 32).

En presente estudio se realizaron técnicas inmunohistoquímicas tanto para CKIT como PDGFRA y DOG-1. La intención fue la de evaluar la concordancia de la expresión de los tres marcadores con los resultados del análisis de mutaciones. En el caso de PDGFRA resultó especialmente interesante debido a la alta variabilidad observada en el análisis de mutaciones. La correlación entre el CKIT y el nuevo marcador descrito DOG-1, fue de 86,1%. Otros grupos, han descrito tasas ligeramente superiores(33, 34, 87); Miettinen *et al*(88) en un estudio en el que compraron el clon K9 de DOG-1 con la expresión de CKIT, obtuvieron una sensibilidad prácticamente idéntica (94,4% y 94,7% respectivamente). Nuestra correlación, no obstante, no se diferencia en gran medida con lo publicado hasta la fecha. En cuanto a PDGFRA, algunos estudios describen una sensibilidad y especificidad similar a CKIT para el diagnóstico certero de los GIST(89), sin embargo los resultados derivados de nuestro trabajo se muestran contradictorios con lo expuesto en la literatura científica hasta el

momento, ya que se obtuvimos tasas de concordancia muy bajas entre CKIT y PDGFRA.

Se puede concluir de estos datos que el marcador que mayor valor ofrece (en nuestra serie) para el diagnóstico de los tumores del estroma gastrointestinal sigue siendo el CKIT. DOG-1 se propone como un marcador de apoyo en aquellos casos de diagnóstico dudosos mediante inmunohistoquímica para CKIT y en aquellos en los que exista controversia fenotípica, complementando la información aportada por el análisis de CKIT. Basándonos en los resultados obtenidos no recomendamos el uso de PDGFRA para el diagnóstico primario de estos tumores, al igual que las agencias ESMO y la NCCN, pues no aporta información alguna como marcador inmunohistoquímico diferencial(46)126)

5.3. Método de extracción

La práctica habitual de trabajo en los laboratorios de anatomía patológica es la utilización de tejido fijado en formol e incluido en parafina, puesto que es muy complicado disponer de tejido congelado. Es por esto que los análisis moleculares que deban llevarse a cabo para el diagnóstico requieran estar optimizados para el manejo de este material. La integridad y estabilidad del ADN en las muestras incluidas en parafina es un factor limitante para llevar a cabo análisis genéticos(90). Múltiples variables tales como el fijador (naturaleza, concentración, temperatura, pH), el tiempo de fijación, la temperatura, el tamaño del tejido fijado y la edad del bloque, inciden en la calidad y cantidad de ADN extraíble de las muestras parafinadas(90-92). Gracias a la implantación por parte de los laboratorios de anatomía patológica del formol comercial tamponado, y dado que las muestras evaluadas en esta serie comprenden los años entre 1993 y 2011, estimamos que éstas no deberían haber sufrido una degradación muy sustancial del material genético durante el proceso de fijación.

Sin embargo, consideramos interesante evaluar diferentes métodos comerciales de extracción de ADN, por ser, tanto la calidad como la cantidad del material genético extraído, un factor limitante en los ensayos moleculares a realizar. Conjuntamente con la eficiencia de la extracción, se valoró el comportamiento de las muestras al realizar las técnicas para el análisis del estatus mutacional. Aunque la cantidad y calidad del ADN extraído refleja una mínima diferencia entre los distintos métodos, la amplificación posterior mediante PCR puede llegar a presentar desviaciones fundamentales en la

homogeneidad de las repeticiones. Siendo este parámetro fundamental a la hora de realizar la normalización de las curvas de fusión en un análisis por HRM. En las muestras del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla se encontró un mayor rendimiento de extracción con el método de QIAGEN al compararse con el de Roche ($p < 0,009$). Sin embargo, en el estudio de uniformidad intramuestral se encontró una mayor homogeneidad con el ADN obtenido de la extracción con el sistema de Roche como se mostró en la figura 23. El ensayo de homogeneidad aunque no es significativo por haberse realizado con tan sólo 10 muestras, sí que mostró una clara tendencia estadística ($p = 0,069$). Así, los datos derivados de este análisis sugieren la necesidad de una correcta puesta a punto y estandarización en la extracción del ADN, en cada hospital, para el posterior análisis genético, teniendo en cuenta estos factores cantidad y calidad del ADN, y homogeneidad intramuestral en la técnica de amplificación. Estos datos resultan de aplicación clínica inmediata ya que incluso en muestras sometidas al mismo procesamiento existe una ligera variabilidad que en técnicas que presentan una sensibilidad extrema como las basadas en secuenciación masiva puede proporcionar problemas de interpretación.

Otro factor a considerar es la conveniencia o no de realizar microdissección previa para el enriquecimiento en células tumorales de la muestra. En los diversos estudios publicados sobre el tema se barajan ambas opciones, algunos autores respaldan la microdissección como técnica convencional para el diagnóstico(2, 4, 93-95) mientras que otros no consideran esta técnica necesaria (83, 96-98). En nuestro caso, teniendo en cuenta la robustez y sensibilidad de las técnicas utilizada y valorando el porcentaje de células tumorales presentes en las muestras, se decidió no realizar microdissección previa a la extracción del ADN. La necesidad de realizar una microdissección previa a la extracción del ADN se sustenta en aumentar al máximo la población tumoral en estudio, de manera que facilite posteriormente la interpretación de los electroferogramas de la secuenciación tipo Sanger(95). Este “beneficio” no resulta necesario al realizarse técnicas de secuenciación de nueva generación, en la que se obtienen profundidades de 400 lecturas por amplicón. Si bien pudiera ser necesaria en biopsias con poblaciones muy escasas a estudio o donde la necrosis fuera un componente mayoritario.

5.4. Hallazgos moleculares

Las muestras fueron seleccionadas según su diagnóstico previo y posteriormente se reevaluaron por otros dos patólogos siguiendo las nuevas recomendaciones acerca de estos tumores a fin de homogeneizar los diagnósticos y rechazar aquellos casos que no se ajustaban a los nuevos criterios. De este modo, todos los tumores que se incluyeron en el estudio se trataban de casos de GIST según las guías vigentes en este momento, y por tanto, se esperaba obtener datos que pudieran ser comparados con los resultados de otras series bibliográficas. También se realizó el estudio molecular de los casos de diagnóstico no confirmado, pues se consideró interesante llevar a cabo una comparación molecular (cuyas conclusiones comentaremos más adelante) con los casos que no presentaban estas dudas diagnósticas.

Los porcentajes de mutaciones descritos en el presente estudio difieren de las series publicadas con anterioridad en la bibliografía, el 81,08% de los pacientes de esta serie presentó mutación en los genes estudiados, siendo sólo el 43,24% correspondieron a mutaciones activas y el 37,84% restante a variaciones genómicas silenciosas. La frecuencia de mutaciones en CKIT y PDGFRA en GIST sigue sujeta a debate debido a la alta variabilidad descrita en la bibliografía. Recientemente se han publicado dos estudios en los que se encuentran diferencias de hasta cuatro veces en las mutaciones en el gen de CKIT (97, 99). Cuando comparamos el ratio de mutaciones activas por genes, los resultados obtenidos discrepan con lo descrito hasta la fecha. En CKIT los resultados fueron inferiores a los publicados (29,73% frente al 52-92% bibliográfico) y superiores en los tumores wild type (56,75% frente al 10-15% bibliográfico). Tan sólo los datos extraídos de PDGFRA podrían englobarse en los márgenes descritos en la bibliografía (13,51% frente al 5-21% bibliográfico). Por otro lado, cuando la valoración se centra en la comparativa de las mutaciones activas por exones, los resultados obtenidos presentaron claras diferencias con los datos divulgados en las distintas publicaciones (tabla 18). Tanto los exones 11, 13 y 17 de CKIT, presentaron valores concordantes con los recogidos en la bibliografía (50% frente al 47-70% bibliográfico para el exón 11, 0% frente al 0-1,4% y 0% frente al 0-1,6% para el exón 13 y 17, respectivamente). Mientras que en el resto de exones, tanto de CKIT como de PDGFRA, los valores obtenidos fueron muy superiores a lo descrito en la bibliografía. El exón 9 de CKIT presentó un 18,75% del total de mutaciones activas halladas durante el análisis, frente al 2,4-14,2% recogido en la bibliografía y en la tabla 18. Del mismo

modo ocurrió con los exones de PDGFRA (25% frente al 0-8,1% para el exón 18 y 12,5% hallado en el estudio frente al 0-55% bibliográfico en el exón 12). Esta diferencia habría que valorarla con absoluta cautela pues creemos que podría deberse al bajo número muestral y el escaso número de muestras con mutaciones activas en el cómputo global.

Para la comparación de todos estos datos hay que tener muy en cuenta la diferencia metodológica en la que se ha realizado la secuenciación. Todos los valores de nuestro estudio, y que hemos discutido hasta ahora, corresponden a resultados de secuenciación de nueva generación, mientras que todos los artículos publicados hasta la fecha, y con los que se han comparado los resultados han utilizado un análisis mediante secuenciación tipo Sanger. Si bien, en un primer momento se valoró como posible causa de los bajos hallazgos mutacionales las particularidades intrínsecas de la técnica utilizada, ya que la metodología de pirosecuenciación en la que se basa el Junior 454 presenta limitaciones al detectar deleciones (siendo este tipo de mutación la más frecuentemente descrita y por el contrario, la menor en el estudio que se presenta), esta hipótesis fue descartada dado que las deleciones descritas en CKIT son de unas pocas bases, mientras que la tecnología utilizada sólo muestra problemas a la hora de detectar grandes deleciones.

Como objetivo principal del estudio se planteó la evaluación del HRM como método de diagnóstico y seguimiento para los GIST por tratarse de un método sencillo, rápido, robusto y que ya muchos grupos han descrito su utilidad en el diagnóstico de estos tumores(2, 4, 62, 98, 100).

El HRM se ha descrito conceptualmente como una herramienta simple para el genotipado, el análisis de mutaciones, la identificación de especies, y el análisis de la metilación del ADN. Son muchos los grupos que han utilizado esta herramienta tanto en laboratorios de biología molecular como de microbiología, por las ventajas que presenta en cuanto a rapidez y facilidad.

A lo largo de este trabajo pudimos comprobar que efectivamente se trata de una técnica de fácil manejo, que no requiere calibraciones previas y que la optimización es la propia de una PCR-RT. Genera los resultados en muy poco tiempo y es una herramienta muy interesante para un laboratorio de biología molecular por la gran variedad de patologías a las que se puede aplicar un análisis de melting de alta resolución.(101-109) Sin embargo, en cuanto a su aplicación en el análisis de

mutaciones de los genes CKIT y PDGFRA, la conclusión que establecemos tras este estudio, es que no es una técnica válida para el screening mutacional, en contraposición a lo descrito por otros grupos.(2, 62, 98, 100, 110). Los resultados obtenidos al evaluar la concordancia entre el análisis de curvas de fusión de alta resolución y la secuenciación (37,8%) difieren considerablemente con lo descrito con anterioridad en las publicaciones científicas (92-100%) (2, 4, 98). Consideramos, sin embargo, que este ratio no es real ya que se refieren indistintamente (sin discriminar entre mutaciones activas y variaciones silenciosas) a todas las mutaciones encontradas en los análisis. En nuestro trabajo existe una mayor correlación entre la secuenciación y el HRM si comparamos los resultados de ambas técnicas incluyendo los polimorfismos silenciosos descritos por la secuenciación, llegando a alcanzar cerca del 60% de paridad entre ambas técnicas. Aún así, este dato queda lejos del 92-100 % descrito en la literatura sobre el tema, pero hay que tener en cuenta que no se pudieron obtener los datos correspondientes al análisis de HRM de todas los exones de todas las muestras, por lo que nuestras conclusiones han de ser valorado con cautela.

Otra de las razones que nos llevan a la conclusión de no aconsejar esta técnica como herramienta para el diagnóstico habitual de los GIST es el coste económico añadido que conlleva la necesidad de realizar una secuenciación confirmatoria de las muestras analizadas por HRM. En este tipo de tumores, en concreto, el gasto sería enormemente elevado pues como se ha comentado existe una alta frecuencia de mutaciones silenciosas presentes en los GIST que habría que confirmar. Del mismo modo, la ventaja que ofrece el análisis de curvas de fusión en cuanto a la rapidez, se ve del todo mermada por la comentada necesidad de realizar una secuenciación confirmatoria posterior, para un diagnóstico molecular que, por el momento, no tiene transcendencia clínica.

Uno de los hallazgos más llamativo durante la evaluación de los resultados obtenidos, fue la alta proporción de SNP en la serie. Son pocos los grupos que han descrito la variabilidad genética no activadora existente en estos tumores. Este hecho nos resultó sorprendente, ya que tras analizar nuestros resultados 30 de los 37 pacientes presentaron este tipo de variaciones. En la revisión bibliográfica llevada a cabo, se encontraron escasas referencias a dichas mutaciones silenciosas (3, 4, 83, 94) y en la mayoría de las publicaciones, no existe referencia alguna a este tipo de mutaciones silenciosas. Los SNP constituyen hasta el 90% de las variaciones genómicas humanas, y

en la actualidad son muchos los trabajos que describen que variaciones de este tipo en la secuencia del ADN pueden afectar a diversos factores como la respuesta frente a enfermedades, bacterias, virus, fármacos...etc. El estudio de los polimorfismos silenciosos está siendo de gran utilidad en la investigación médica para el desarrollo de nuevos fármacos, así como para establecer riesgo a padecer distintas enfermedades como el Parkinson, la diabetes, algunos trastornos bipolares y distintos tipos de cánceres (pulmón, colon, mama o próstata)(111-119).

Aunque aún no se han descrito estudios que demuestren la relación entre los SNP y un mayor riesgo de padecer GIST o con la resistencia al tratamiento, con los resultados obtenidos en este trabajo podemos plantear la hipótesis de si estas alteraciones silenciosas podrían considerarse un factor de riesgo para el desarrollo de los GIST. Algunos grupos han planteado la hipótesis de que mutaciones silenciosas podrían, bajo ciertas circunstancias, influir en correcto funcionamiento de las proteínas. Las mutaciones silenciosas que se producen en tripletes de nucleótidos rara vez usados pueden ralentizar la síntesis de proteínas. El plegamiento de las proteínas es en parte velocidad dependiente y al ralentizar la síntesis se puede provocar que la proteína adquiera una forma final alterada. Las células pueden ser capaces de compensar una mutación silenciosa, pero no múltiples mutaciones silenciosas.(120-122). En concreto, consideramos que la presencia de varios SNPs con alta penetrancia en nuestra población, pero aún no descritos previamente (exón 12 de PDGFRAc.1707A>G y c.1737G>A presentes en el 54% de los tumores) podría asociarse a una mayor predisposición a desarrollar un GIST. Aunque de acuerdo a su naturaleza esta mutación no ocasiona cambios en la secuencia aminoacídica, sería muy interesante analizar la relación con esta neoplasia en la población general.

Curiosamente los tumores que fueron considerados como neoplasias no GIST tras la revisión histopatológica de los casos, también presentaron mutaciones no activadoras. A pesar de los avances en el conocimiento de este tipo de sarcoma y la gran cantidad de estudios y artículos publicados en relación a los mismos, este subgrupo de tumores incluidos en el estudio pero eliminados de la estadística han supuesto un reto. Por todo ello, a fin de comprender mejor estos casos, se decidió revisar nuevamente las historias clínicas y evaluar la evolución de los pacientes tras los tratamientos recibidos. Con los nuevos datos que obtuvimos y tras la asistencia a diferentes debates sobre estos tumores y una nueva búsqueda bibliográfica(120-124), concluimos que a pesar de su extraña

localización(en algunos casos) y sus complicadas características histológicas, se podrían considerar tumores del estroma gastrointestinal. El hecho de haber hallado en estos casos las mismas mutaciones silenciosas que presentaban los GIST del estudio fue determinante para replantear la nueva revisión y su correspondiente diagnóstico.

El estudio molecular se ha convertido en una herramienta no sólo recomendable para la confirmación diagnóstica de tumores CKIT negativos o con histología complicada, sino también a la hora de abordar el tratamiento más adecuado a cada paciente. Tras la aprobación en 2002, por parte de la FDA, del uso de imatinib para el tratamiento de pacientes con tumores CKIT positivos inoperables o metastásicos, los ensayos clínicos randomizados, demostraron que pacientes con mutaciones en el exón 11 de CKIT mostraban mejores tasas de respuesta, tiempo hasta progresión (THP) y supervivencia global (SG) más elevadas al compáralos con aquellos que presentaban mutación en el exón 9 de CKIT o bien no presentaban mutación en CKIT ni en PDGFRA (tabla 19).

Tabla 19: Relación entre el genotipo de CKIT y PDGFRA y la respuesta a Imatinib en los estudios clínicos publicados.

Gene	Exon	U.S.-Finnish B2222 Phase II Trial (n = 127) ¹⁷			EORTC-62005 Phase III Trial (n = 377) ¹⁸			SWOGS0033/CALGB150105 Phase III Trial (n = 428) ¹⁹		
		Objective Response*	Stable Disease	Progressive Disease	Objective Response*	Stable Disease	Progressive Disease	Objective Response*	Stable Disease	Progressive Disease
KIT	9	48%	26%	17%	34%	46.5%	17%	37%	37.5%	9%
	11	83.5%	8%	5%	68%	25%	3%	63%	19%	6%
	13	100%	0	0	67%	33%	NR	40%	20%	20%
	17	50%	0	50%	67%	33%	NR	25%	50%	25%
PDGFRA	12	67%	0	33%	30%	30%	40%	100%	NR	NR
	18	0	0	67%	30%	30%	40%	25%	50%	25%
WT-GIST		0	33%	56%	23%	50%	19%	37%	28%	18%

Abreviaturas: CALGB, cáncer y leucemia grupo B; GIST, tumor estromal gastrointestinal; NR, no respondedor; PDGFRA, factor e crecimiento derivado de plaquetas del receptor alfa; RECIST, criterio de evaluación de respuesta para tumores sólidos; SWOG, grupo oncológico del sureste; WT, no mutado ni en KIT ni en PDGFRA.

Son muchos los estudios que han demostrado la importancia de conocer tanto el gen mutado, como el exón en el que se produce (1, 14, 125). Los primeros estudios basados en el establecimiento de dosis adecuada ya pusieron de manifiesto la diferencia existente entre los pacientes cuyo tumor estaba provocado por una mutación en el exón

11 o en el exón 9 de CKIT, ya que para el tratamiento de estos últimos se requería doblar la dosis de fármaco administrado. Los ensayos posteriores han corroborado esta primera observación y han aportado nuevos datos de cómo se debe proceder farmacológicamente según la mutación que presente el tumor. Otra de las mutaciones que suscita un gran interés a la hora de establecer tratamiento para el paciente es la localizada en el exón 18 de PDGFRA, D842V, dado que no responde a Imatinib en primera línea y por tanto, estos pacientes deben ser tratados directamente con Sunitinib. Además de la respuesta al tratamiento, las distintas alteraciones genéticas presentes en los GIST se han asociado a distintos comportamientos tumorales. Son muchos los autores que han descrito que las deleciones en el exón 11 de CKIT generan tumores más agresivos que otros GIST que presentan sustituciones en ese mismo exón(126).

Los datos derivados de este trabajo no se corresponden con la extensa literatura científica sobre este tema. No encontramos una explicación al bajo número de mutaciones activas encontradas, comparadas con lo descrito en trabajos anteriores. Sin embargo, debido a la gran variedad de técnicas de análisis y el gran abanico de resultados publicados hasta el momento, creemos que posiblemente en unos años, nuestros datos coincidirán con los nuevos estudios que se realicen (utilizando técnicas de mayor sensibilidad como las llevadas a cabo en esta tesis doctoral) y además podremos determinar la implicación de las mutaciones silenciosas que han sido descritas en el presente trabajo.

Aunque las nuevas guías establecen que el diagnóstico de estos tumores debe realizarse mediante histología y análisis inmunohistoquímico, consideramos que existen suficientes evidencias que justifican la necesidad de un análisis para discriminar el estado mutacional de estos tumores. Así mismo, abogando por una estandarización de los diferentes resultados para su mejor comprensión, creemos que aún queda mucho camino por recorrer en el conocimiento molecular de los GIST.

VI. CONCLUSIONES

- 1) Recomendamos la realización de un panel inmunohistoquímico con DOG-1 y CKIT como herramienta para el diagnóstico de los GISTs. El uso de PDGFRA, no resulta fiable para el diagnóstico certero de los GIST.
- 2) Aunque con un menor rendimiento en la extracción, el método de extracción DNA Sample Preparation Kit de ROCHE presenta una mayor homogeneidad y reproducibilidad en muestras fijadas en formol e incluidas en parafina.
- 3) Hemos hallado menor porcentaje de mutaciones en *CKIT* que lo descrito en la bibliografía. En el 81,08% de los tumores estudiados se hallaron mutaciones, de las cuales el 43,24% correspondieron a mutaciones activas y el 37,84% restante a variaciones silenciosas.
- 4) Describimos dos SNPs repetitivos en el exón 12 de *PDGFRA* en un 54% de los pacientes que no han sido descritos previamente.
- 5) La concordancia obtenida entre el HRM y la secuenciación masiva fue del 37,08% y aumentó hasta un 60% al tomar en consideración los SNPs.
- 6) El alto porcentaje de variaciones silenciosas crea la necesidad de utilizar otra técnica distinta al HRM para el análisis del perfil mutacional de los GIST, ya que esta tecnología no permite discriminar entre mutaciones activas y variación silenciosa.
- 7) El análisis de mutaciones por HRM no demostró una concordancia aceptable al compararla con las técnicas inmunohistoquímicas de CKIT y DOG-1. El análisis por secuenciación masiva resultó equivalente a la inmunohistoquímica de CKIT al compararlo teniendo en cuenta las mutaciones silenciosas.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Martín-Broto J, Rubio L, Alemany R, López-Guerrero JA. Clinical implications of KIT and PDGFRA genotyping in GIST. *Clin Transl Oncol*. 2010;12(10):670-6.
2. Willmore C, Holden JA, Zhou L, Tripp S, Wittwer CT, Layfield LJ. Detection of c-kit-activating mutations in gastrointestinal stromal tumors by high-resolution amplicon melting analysis. *Am J Clin Pathol*. 2004;122(2):206-16.
3. Holden JA, Willmore-Payne C, Layfield LJ. Tyrosine kinase activating mutations in human malignancies: implications for diagnostic pathology. *Exp Mol Pathol*. 2008;85(1):68-75.
4. Holden JA, Willmore-Payne C, Coppola D, Garrett CR, Layfield LJ. High-resolution melting amplicon analysis as a method to detect c-kit and platelet-derived growth factor receptor alpha activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Am J Clin Pathol*. 2007;128(2):230-8.
5. Hassan HT. c-Kit expression in human normal and malignant stem cells prognostic and therapeutic implications. *Leuk Res*. 2009;33(1):5-10.
6. Mazur MT, Clark HB. Gastric stromal tumors. Reappraisal of histogenesis. *Am J Surg Pathol*. 1983;7(6):507-19.
7. 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(5):1259-69.
8. Fletcher CD, Fletcher JA. Testing for KIT (CD117) in gastrointestinal stromal tumors: another HerceptTest? *Am J Clin Pathol*. 2002;118(2):163-4.
9. Fulop E, Marcu S, Milutin D, Borda A. Gastrointestinal stromal tumors: review on morphology, diagnosis and management. *Rom J Morphol Embryol*. 2009;50(3):319-26.
10. Blay JY, von Mehren M, Blackstein ME. Perspective on updated treatment guidelines for patients with gastrointestinal stromal tumors. *Cancer*. 2010;116(22):5126-37.
11. Janeway KA, Weldon CB. Pediatric gastrointestinal stromal tumor. *Semin Pediatr Surg*. 2012;21(1):31-43.
12. Folgado Alberto S, Sanchez P, Oliveira M, Cuesta L, Gomes F, Figueiredo A, et al. [Gastrointestinal stromal tumors - a retrospective study of 43 cases]. *Rev Esp Enferm Dig*. 2008;100(11):696-700.
13. Padilla D, Menendez P, Garcia M, Villarejo P, Cubo T, Gambi D, et al. [Immunohistochemical expression of epidermal growth factor and its prognostic value for gastrointestinal stromal tumors]. *Rev Esp Enferm Dig*. 2008;100(12):752-7.
14. Joensuu H. Gastrointestinal stromal tumor (GIST). *Ann Oncol*. 2006;17 Suppl 10:x280-6.
15. Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors (GISTs): definition, occurrence, pathology, differential diagnosis and molecular genetics. *Pol J Pathol*. 2003;54(1):3-24.
16. Miettinen M, Lasota J. KIT (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2005;13(3):205-20.
17. Min KW. GIST or GANT? *Int J Surg Pathol*. 2003;11(4):357-8.
18. Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: pathology and prognosis at different sites. *Semin Diagn Pathol*. 2006;23(2):70-83.
19. Yantiss RK, Rosenberg AE, Selig MK, Nielsen GP. Gastrointestinal stromal tumors: an ultrastructural study. *Int J Surg Pathol*. 2002;10(2):101-13.
20. Krypuy M, Newnham GM, Thomas DM, Conron M, Dobrovic A. High resolution melting analysis for the rapid and sensitive detection of mutations in clinical samples: KRAS codon 12 and 13 mutations in non-small cell lung cancer. *BMC cancer*. 2006;6(1):295.
21. 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(8):728-34.
22. Medeiros F, Corless CL, Duensing A, Hornick JL, Oliveira AM, Heinrich MC, et al. KIT-negative gastrointestinal stromal tumors: proof of concept and therapeutic implications. *Am J Surg Pathol*. 2004;28(7):889-94.

23. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem.* 1997;245(2):154-60.
24. Eizaguirre Zarza B, Burgos Bretones JJ. Tumores GIST. Revisión de la literatura. *Rev Esp Patol.* 2006;39(4):209-18.
25. Pauls K, Merkelbach-Bruse S, Thal D, Buttner R, Wardelmann E. PDGFRalpha- and c-kit-mutated gastrointestinal stromal tumours (GISTs) are characterized by distinctive histological and immunohistochemical features. *Histol.* 2005;46(2):166-75.
26. Jaramillo S, Rios-Moreno MJ, Hernandez A, Amerigo J, Trigo-Sanchez I, Gonzalez-Campora R. Gastrointestinal stromal tumors (GISTs): role of CD 117 and PDGFRA Golgi-like staining pattern in the recognition of mutational status. *Rev Esp Enferm Dig* 2012;104(3):128-33.
27. Diaz-Delgado M, Hernandez-Amate A, Sanchez-Leon M, Pereira-Gallardo S, Prieto-Sanchez E, Jimenez-Saenz M, et al. Multiple non-metastatic gastrointestinal stromal tumors. Differential features. *Rev Esp Enferm Dig.* 2010;102(8):489-97.
28. Miselli F, Millefanti C, Conca E, Negri T, Piacenza C, Pierotti MA, et al. PDGFRA immunostaining can help in the diagnosis of gastrointestinal stromal tumors. *Am J Surg Pathol.* 2008;32(5):738-43.
29. Rossi G, Valli R, Bertolini F, Marchioni A, Cavazza A, Mucciarini C, et al. PDGFR expression in differential diagnosis between KIT-negative gastrointestinal stromal tumours and other primary soft-tissue tumours of the gastrointestinal tract. *Histol.* 2005;46(5):522-31.
30. Ardeleanu C, Arsene D, Hinescu M, Andrei F, Gutu D, Luca L, et al. Pancreatic expression of DOG1: a novel gastrointestinal stromal tumor (GIST) biomarker. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2009;17(5):413-8.
31. West RB, Corless CL, Chen X, Rubin BP, Subramanian S, Montgomery K, et al. The novel marker, DOG1, is expressed ubiquitously in gastrointestinal stromal tumors irrespective of KIT or PDGFRA mutation status. *Am J Pathol.* 2004;165(1):107-13.
32. Espinosa I, Lee CH, Kim MK, Rouse BT, Subramanian S, Montgomery K, et al. A novel monoclonal antibody against DOG1 is a sensitive and specific marker for gastrointestinal stromal tumors. *Am J Surg Pathol.* 2008;32(2):210-8.
33. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74(12):5463-7.
34. Hwang DG, Qian X, Hornick JL. DOG1 antibody is a highly sensitive and specific marker for gastrointestinal stromal tumors in cytology cell blocks. *Am J Clin Pathol.* 2011;135(3):448-53.
35. 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(3):437-46.
36. Zamo A, Bertolaso A, Franceschetti I, Weirich G, Capelli P, Pecori S, et al. Microfluidic deletion/insertion analysis for rapid screening of KIT and PDGFRA mutations in CD117-positive gastrointestinal stromal tumors: diagnostic applications and report of a new KIT mutation. *J Mol Diagn.* 2007;9(2):151-7.
37. Bayraktar UD, Bayraktar S, Rocha-Lima CM. Molecular basis and management of gastrointestinal stromal tumors. *World J Gastroenterol.* 2010;16(22):2726-34.
38. 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(6):1692-703.
39. Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, McGreevey L, Chen CJ, Joseph N, et al. PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science.* 2003;299(5607):708-10.
40. Rothberg JM, Leamon JH. The development and impact of 454 sequencing. *Nat. Biotechnol.* 2008;26(10):1117-24.
41. Loughrey MB, Mitchell C, Mann GB, Michael M, Waring PM. Gastrointestinal stromal tumour treated with neoadjuvant imatinib. *J Clin Pathol.* 2005;58(7):779-81.

42. Rubin BP, Singer S, Tsao C, Duensing A, Lux ML, Ruiz R, et al. KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res.* 2001;61(22):8118-21.
43. Rammohan A, Sathyanesan J, Rajendran K, Pitchaimuthu A, Perumal SK, Srinivasan U, et al. A gist of gastrointestinal stromal tumors: A review. *World J Gastrointest Oncol.* 2013;5(6):102-12.
44. Maleddu A, Pantaleo MA, Nannini M, Di Battista M, Saponara M, Lolli C, et al. Mechanisms of secondary resistance to tyrosine kinase inhibitors in gastrointestinal stromal tumours (Review). *Oncol Rep.* 2009;21(6):1359-66.
45. Heinrich MC, Corless CL, Blanke CD, Demetri GD, Joensuu H, Roberts PJ, et al. Molecular correlates of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol.* 2006;24(29):4764-74.
46. Demetri GD, van Oosterom AT, Garrett CR, Blackstein ME, Shah MH, Verweij J, et al. Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2006;368(9544):1329-38.
47. Reed GH, Kent JO, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics J.* 2007;8(6):597-608.
48. Dimitrov RA, Zuker M. Prediction of hybridization and melting for double-stranded nucleic acids. *Biophys. J.* 2004;87(1):215-26.
49. Krypuy M, Newnham GM, Thomas DM, Conron M, Dobrovic A. High resolution melting analysis for the rapid and sensitive detection of mutations in clinical samples: KRAS codon 12 and 13 mutations in non-small cell lung cancer. *BMC cancer.* 2006;6:295.
50. Reed GH, Wittwer CT. Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis. *Clin. Chem.* 2004;50(10):1748-54.
51. Vossen RH, Aten E, Roos A, den Dunnen JT. High-resolution melting analysis (HRMA): more than just sequence variant screening. *Hum. Mutat.* 2009;30(6):860-6.
52. Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin. Chem.* 2003;49(6 Pt 1):853-60.
53. Kramer D, Thunnissen FB, Gallegos-Ruiz MI, Smit EF, Postmus PE, Meijer CJ, et al. A fast, sensitive and accurate high resolution melting (HRM) technology-based assay to screen for common K-ras mutations. *Cell. Oncol.* 2009;31(3):161-7.
54. Smith GD, Chadwick BE, Willmore-Payne C, Bentz JS. Detection of epidermal growth factor receptor gene mutations in cytology specimens from patients with non-small cell lung cancer utilising high-resolution melting amplicon analysis. *J Clin Pathol.* 2008;61(4):487-93.
55. Takano T, Ohe Y, Tsuta K, Fukui T, Sakamoto H, Yoshida T, et al. Epidermal growth factor receptor mutation detection using high-resolution melting analysis predicts outcomes in patients with advanced non small cell lung cancer treated with gefitinib. *Clin Cancer Res.* 2007;13(18 Pt 1):5385-90.
56. Nomoto K, Tsuta K, Takano T, Fukui T, Yokozawa K, et al. Detection of EGFR mutations in archived cytologic specimens of non-small cell lung cancer using high-resolution melting analysis. *Am J Clin Pathol.* 2006;126(4):608-15.
57. Kwong A, Ng EK, Wong CL, Law FB, Au T, Wong HN, et al. Identification of BRCA1/2 founder mutations in Southern Chinese breast cancer patients using gene sequencing and high resolution DNA melting analysis. *PLoS one.* 2012;7(9):e43994.
58. Jimenez Ide J, Esteban Cardenosa E, Palanca Suela S, Gonzalez EB, Bolufer Gilabert P, Group of Cancer Genetic Counselling Program of Valencia C. Advantages of the high resolution melting in the detection of BRCA1 or BRCA2 mutation carriers. *Clin Biochem.* 2009;42(15):1572-6.
59. Fadhil W, Ibrahim S, Seth R, Ilyas M. Quick-multiplex-consensus (QMC)-PCR followed by high-resolution melting: a simple and robust method for mutation detection in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *J Clin Pathol.* 2010;63(2):134-40.

60. Hill CE, Duncan A, Wirth D, Nolte FS. Detection and identification of cytochrome P-450 2C9 alleles *1, *2, and *3 by high-resolution melting curve analysis of PCR amplicons. *Am J Clin Pathol.* 2006;125(4):584-91.
61. Liew M, Nelson L, Margraf R, Mitchell S, Erali M, Mao R, et al. Genotyping of human platelet antigens 1 to 6 and 15 by high-resolution amplicon melting and conventional hybridization probes. *J Mol Diagn.* 2006;8(1):97-104.
62. Wallander ML, Willmore-Payne C, Layfield LJ. C-KIT and PDGFRA zygosity in gastrointestinal stromal tumors: Correlation with tumor site, tumor size, exon, and CD117 immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2011;19(1):21-7.
63. Zhang C, Shao Y, Zhang W, Wu Q, Yang H, Zhong Q, et al. High-resolution melting analysis of ADAMTS9 methylation levels in gastric, colorectal, and pancreatic cancers. *Cancer Genet Cytogenet.* 2010;196(1):38-44.
64. Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. 1977. *Biotechnology.* 1992;24:99-103.
65. Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connell CR, et al. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature.* 1986;321(6071):674-9.
66. Zimmermann J, Wiemann S, Voss H, Schwager C, Ansorge W. Improved fluorescent cycle sequencing protocol allows reading nearly 1000 bases. *BioTechniques.* 1994;17(2):302, 4, 6 passim.
67. Ansorge W, Zimmermann J, Schwager C, Stegemann J, Erfle H, Voss H. One label, one tube, Sanger DNA sequencing in one and two lanes on a gel. *Nucleic Acids Res.* 1990;18(11):3419-20.
68. Grignol VP, Termuhlen PM. Gastrointestinal stromal tumor surgery and adjuvant therapy. *Surg Clin North Am.* 2011;91(5):1079-87.
69. Pardo Martinez C, Mayol Martinez J, Hernandez Perez C, Alvarez Fernandez-Represa J. Gastric stromal tumors: clinical presentation and surgical options. *Rev Esp Enferm Dig.* 2004;96(8):578-81; 81-3.
70. Ortega Medina L, Saiz-Pardo Sanz M. Cambio conceptual de los tumores del estroma gastrointestinal (GISTs) y criterios de malignidad. *Oncología (Barc.).* 2004;27:109-13.
71. Pornsuksiri K, Chewatanakornkul S, Kanngurn S, Maneechay W, Chaiyapan W, Sangkhathat S. Clinical outcomes of gastrointestinal stromal tumor in southern Thailand. *World J Gastrointest Oncol.* 2012;4(11):216-22.
72. Ahmed I, Welch NT, Parsons SL. Gastrointestinal stromal tumours (GIST) - 17 years experience from Mid Trent Region (United Kingdom). *Eur J Surg Oncol.* 2008;34(4):445-9.
73. Mucciarini C, Rossi G, Bertolini F, Valli R, Cirilli C, Rashid I, et al. Incidence and clinicopathologic features of gastrointestinal stromal tumors. A population-based study. *BMC Cancer.* 2007;7:230.
74. Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors--definition, clinical, histological, immunohistochemical, and molecular genetic features and differential diagnosis. *Virchows Arch.* 2001;438(1):1-12.
75. Miettinen M, Sarlomo-Rikala M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: recent advances in understanding of their biology. *Hum Pathol.* 1999;30(10):1213-20.
76. Akbulut S, Yavuz R, Otan E, Hatipoglu S. Pancreatic extragastrointestinal stromal tumor: A case report and comprehensive literature review. *World J Gastrointest Surg.* 2014;6(9):175-82.
77. Beltrame V, Gruppo M, Pastorelli D, Pizzi S, Merigliano S, Sperti C. Extra-gastrointestinal stromal tumor of the pancreas: case report and review of the literature. *World J Surg Oncol.* 2014;12:105.
78. Munoz M, Echeverri C, Ramirez PT, Echeverri L, Pareja LR. Extragastrointestinal stromal tumor in the rectovaginal septum in an adolescent. *Gynecol Oncol Case Rep.* 2013;5:67-9.
79. Song W, Yang JR, Wang YH, Liang QC. Primary extragastrointestinal stromal tumor of the seminal vesicles. *Urology.* 2012;79(3):e36-7.

80. Corless CL, Heinrich MC. Molecular pathobiology of gastrointestinal stromal sarcomas. *Annu Rev Pathol.* 2008;3:557-86.
81. Hassan I, You YN, Shyyan R, Dozois EJ, Smyrk TC, Okuno SH, et al. Surgically managed gastrointestinal stromal tumors: a comparative and prognostic analysis. *Ann Surg Oncol.* 2008;15(1):52-9.
82. Gomes AL, Bardales RH, Milanezi F, Reis RM, Schmitt F. Molecular analysis of c-Kit and PDGFRA in GISTs diagnosed by EUS. *American journal of clinical pathology.* 2007;127(1):89-96.
83. Baker G, Babb C, Schnugh D, Nayler S, Louw M, Goedhals J, et al. Molecular characterisation of gastrointestinal stromal tumours in a South African population. *Oncol Lett.* 2013;5(1):155-60.
84. Fresno Forcelledo MF. Determinación inmunohistoquímica de CD117/c-kit en el GIST (tumor estromal gastrointestinal). *Oncología (Barc.).* 2004;27:114-7.
85. 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(1):52-68.
86. Agaimy A, Otto C, Braun A, Geddert H, Schaefer IM, Haller F. Value of epithelioid morphology and PDGFRA immunostaining pattern for prediction of PDGFRA mutated genotype in gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *Int J Clin Exp Pathol.* 2013;6(9):1839-46.
87. Lopes LF, West RB, Bacchi LM, van de Rijn M, Bacchi CE. DOG1 for the diagnosis of gastrointestinal stromal tumor (GIST): Comparison between 2 different antibodies. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2010;18(4):333-7.
88. Miettinen M, Wang ZF, Lasota J. DOG1 antibody in the differential diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: a study of 1840 cases. *Am J Surg Pathol.* 2009;33(9):1401-8.
89. Kim KH, Nelson SD, Kim DH, Choi KU, Kim SJ, Min KW, et al. Diagnostic relevance of overexpressions of PKC-theta and DOG-1 and KIT/PDGFR gene mutations in extragastrointestinal stromal tumors: a Korean six-centers study of 28 cases. *Anticancer Res.* 2012;32(3):923-37.
90. Merkelbach-Bruse S, Dietmaier W, Fuzesi L, Gaumann A, Haller F, Kitz J, et al. Pitfalls in mutational testing and reporting of common KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors. *BMC Med Genet.* 2010;11:106.
91. Sato Y, Sugie R, Tsuchiya B, Kameya T, Natori M, Mukai K. Comparison of the DNA extraction methods for polymerase chain reaction amplification from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Am J Surg Pathol.* 2001;10(4):265-71.
92. Arce GJ, Quesada MJV, Montero EJ, Platero WP. Determinación de la efectividad de cinco protocolos de extracción de ADN a partir de material parafinado para estudios moleculares. *Rev Med Univ Costa Rica.* 2007.
93. Wardelmann E, Merkelbach-Bruse S, Pauls K, Thomas N, Schildhaus HU, Heinicke T, et al. Polyclonal evolution of multiple secondary KIT mutations in gastrointestinal stromal tumors under treatment with imatinib mesylate. *Clin Cancer Res.* 2006;12(6):1743-9.
94. Gomes AL, Gouveia A, Capelinha AF, de la Cruz D, Silva P, Reis RM, et al. Molecular alterations of KIT and PDGFRA in GISTs: evaluation of a Portuguese series. *J Clin Pathol.* 2008;61(2):203-8.
95. Palmirotta R, De Marchis ML, Ludovici G, Leone B, Covello R, Conti S, et al. Mutational analysis of gastrointestinal stromal tumors (GISTs): procedural approach for diagnostic purposes. *Cancer Genomics Proteomics.* 2013;10(3):115-23.
96. Antonescu CR, Romeo S, Zhang L, Nafa K, Hornick JL, Nielsen GP, et al. Dedifferentiation in gastrointestinal stromal tumor to an anaplastic KIT-negative phenotype: a diagnostic pitfall: morphologic and molecular characterization of 8 cases occurring either de novo or after imatinib therapy. *Am J Surg Pathol.* 2013;37(3):385-92.
97. Soreide K, Sandvik OM, Soreide JA, Gudlaugsson E, Mangseth K, Haugland HK. Tyrosine-kinase mutations in c-KIT and PDGFR-alpha genes of imatinib naive adult patients with

- gastrointestinal stromal tumours (GISTs) of the stomach and small intestine: relation to tumour-biological risk-profile and long-term outcome. *Clin Transl Oncol.* 2012;14(8):619-29.
98. Kunstlinger H, Huss S, Merkelbach-Bruse S, Binot E, Kleine MA, Loeser H, et al. Gastrointestinal stromal tumors with KIT exon 9 mutations: Update on genotype-phenotype correlation and validation of a high-resolution melting assay for mutational testing. *Am J Surg Pathol.* 2013;37(11):1648-59.
99. Braggio E, Braggio DDA, Small IA, Lopes LF, Valadao M, Gouveia ME, et al. Prognostic relevance of KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Anticancer Res.* 2010;30(6):2407-14.
100. Willmore-Payne C, Layfield LJ, Holden JA. c-KIT mutation analysis for diagnosis of gastrointestinal stromal tumors in fine needle aspiration specimens. *Cancer.* 2005;105(3):165-70.
101. Chen HH, Yang JL, Lu HF, Zhou WJ, Yao F, Deng L. High resolution melting analysis for detecting of JAK2V617F mutation in patients with myeloproliferative neoplasms. *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi .* 2014;22(1):112-6.
102. Ihle MA, Fassunke J, Konig K, Grunewald I, Schlaak M, Kreuzberg N, et al. Comparison of high resolution melting analysis, pyrosequencing, next generation sequencing and immunohistochemistry to conventional Sanger sequencing for the detection of p.V600E and non-p.V600E BRAF mutations. *BMC Cancer.* 2014;14:13.
103. Guedes JG, Veiga I, Rocha P, Pinto P, Pinto C, Pinheiro M, et al. High resolution melting analysis of KRAS, BRAF and PIK3CA in KRAS exon 2 wild-type metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer.* 2013;13:169.
104. Vaclavikova R, Ehrlichova M, Hlavata I, Pecha V, Kozevnikovova R, Trnkova M, et al. Detection of frequent ABCB1 polymorphisms by high-resolution melting curve analysis and their effect on breast carcinoma prognosis. *Clin Chem Lab Med.* 2012;50(11):1999-2007.
105. Amornpisutt R, Sriraksa R, Limpiboon T. Validation of methylation-sensitive high resolution melting for the detection of DNA methylation in cholangiocarcinoma. *Clin Biochem.* 2012;45(13-14):1092-4.
106. Aihara M, Yamamoto S, Nishioka H, Inoue Y, Hamano K, Oka M, et al. Optimizing high-resolution melting analysis for the detection of mutations of GPR30/GPER-1 in breast cancer. *Gene.* 2012;501(2):118-26.
107. Patel KP, Barkoh BA, Chen Z, Ma D, Reddy N, Medeiros LJ, et al. Diagnostic testing for IDH1 and IDH2 variants in acute myeloid leukemia an algorithmic approach using high-resolution melting curve analysis. *J Mol Diagn.* 2011;13(6):678-86.
108. Zhao J, Peng QX, Yang BH, Lu DR. High-resolution melting analysis for the detection of EGFR mutations in circulating DNA of lung cancer patients. *Zhonghua yi xue za zhi.* 2011;91(10):674-8.
109. Fassina A, Gazziero A, Zardo D, Corradin M, Aldighieri E, Rossi GP. Detection of EGFR and KRAS mutations on trans-thoracic needle aspiration of lung nodules by high resolution melting analysis. *J Clin Pathol.* 2009;62(12):1096-102.
110. Kunstlinger H, Binot E, Merkelbach-Bruse S, Huss S, Wardelmann E, Buettner R, et al. High-resolution melting analysis is a sensitive diagnostic tool to detect imatinib-resistant and imatinib-sensitive PDGFRA exon 18 mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Hum pathol.* 2014;45(3):573-82.
111. Allen AS, Satten GA. SNPs in CAST are associated with Parkinson disease: a confirmation study. *Am J Med Genet A.* 2010;153B(4):973-9.
112. Milne RL, Burwinkel B, Michailidou K, Arias-Perez JI, Zamora MP, Menendez-Rodriguez P, et al. Common non-synonymous SNPs associated with breast cancer susceptibility: findings from the Breast Cancer Association Consortium. *Hum Mol Genet.* 2014;23(22):6096-111.
113. Ciccacci C, Morganti R, Di Fusco D, D'Amato C, Cacciotti L, Greco C, et al. Common polymorphisms in MIR146a, MIR128a and MIR27a genes contribute to neuropathy susceptibility in type 2 diabetes. *Acta Diabetol.* 2014;51(4):663-71.

114. Spitz MR, Amos CI, Land S, Wu X, Dong Q, Wenzlaff AS, et al. Role of selected genetic variants in lung cancer risk in African Americans. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2013;8(4):391-7.
115. Martinez-Herrero S, Martinez A. Cancer protection elicited by a single nucleotide polymorphism close to the adrenomedullin gene. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(4):E807-10.
116. Feng IJ, Radivoyevitch T. SNP-SNP interactions between dNTP supply enzymes and mismatch DNA repair in breast cancer. *Proc Ohio Collab Conf Bioinform*. 2009;2009:123-8.
117. Monteleone P, Bifulco M, Maina G, Tortorella A, Gazzerro P, Proto MC, et al. Investigation of CNR1 and FAAH endocannabinoid gene polymorphisms in bipolar disorder and major depression. *Pharmacol Res*. 2010;61(5):400-4.
118. Chang BL, Zheng SL, Isaacs SD, Wiley KE, Turner A, Li G, et al. A polymorphism in the CDKN1B gene is associated with increased risk of hereditary prostate cancer. *Clin. Cancer Res*. 2004;64(6):1997-9.
119. Kraft P, Pharoah P, Chanock SJ, Albanes D, Kolonel LN, Hayes RB, et al. Genetic variation in the HSD17B1 gene and risk of prostate cancer. *PLoS Genet*. 2005;1(5):e68.
120. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV, et al. A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science*. 2007;315(5811):525-8.
121. Xue L, Qiu T, Song Y, Shan L, Liu X, Guo L, et al. Long segmental hyperplasia of interstitial cells of Cajal with giant diverticulum formation. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013;6(12):2989-96.
122. Kartha RV, Sundram UN. Silent mutations in KIT and PDGFRA and coexpression of receptors with SCF and PDGFA in Merkel cell carcinoma: implications for tyrosine kinase-based tumorigenesis. *Mod Pathol*. 2008;21(2):96-104.
123. Tu H, Li Q, Cai J, Chen Z, Yang H, Jiang H, et al. Extragastrointestinal stromal tumor in a kidney transplant recipient. *Clinical and experimental nephrology*. 2012;16(2):350-3.
124. Deshpande A, Nelson D, Corless CL, Deshpande V, O'Brien MJ. Leiomyoma of the gastrointestinal tract with interstitial cells of Cajal: a mimic of gastrointestinal stromal tumor. *Am J Surg Pathol*. 2014;38(1):72-7.
125. Downs-Kelly E, Rubin BP. Gastrointestinal stromal tumors: molecular mechanisms and targeted therapies. *Patholog Res Int*. 2011;2011:708596.
126. Wozniak A, Rutkowski P, Piskorz A, Ciwoniuk M, Osuch C, Bylina E, et al. Prognostic value of KIT/PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumours (GIST): Polish Clinical GIST Registry experience. *Ann Oncol*. 2012;23(2):353-60.

ANEXOS

Tabla 13: Distribución de los polimorfismos y mutaciones en s casos.

ID	SNP		Exón	Mutación activa/Exón
1	c.1701A>G	p.P567P	12	
2	c.1701A>G	p.P567P	12	missense p.S501S>SAY Ex.9
	c.2394C>T	p.I798I	17	
3	c.1701A>G	p.P567P	12	missense p.S501S>SAY Ex.9
5	c.1701A>G	p.P567P	12	missense p.D842V Ex.18
6	c.1701A>G	p.P567P	12	missense p.W557R Ex.11
	c.2472C>T	p.V824V	18	
7	c.1701A>G	p.P567P	12	missense p.D842V Ex.18
9	c.1701A>G	p.P567P	12	missense p.S501S>SAY Ex.9
10	c.2451T>A	p.R817R	18	mutación intrónoca Ex.11
11	c.1923	p.L641L	13	mutación intrónoca Ex.12
12	c.1680T>G	p.V560V	11	missense p.V560D Ex.11
	c.1701A>G	p.P567P	12	
	c.2451T>A	p.R817R	18	
	c.2502C>T	p.I834I	18	
13	c.1701A>G	p.P567P	12	missense p.P550PMYEV>P Ex.11
	c.1665A>T	p.V555V	11	
17	c.1701A>G	p.P567P	12	
	c.1707A>G	p.G569G	12	
	c.1737G>A	p.Q579Q	12	
18	c.1701A>G	p.P567P	12	
	c.1707A>G	p.G569G	12	
	c.1737G>A	p.Q579Q	12	
19	c.1701A>G	p.P567P	12	missense p.Q556QWK>Q Ex. 11
	c.1707A>G	p.G569G	12	
	c.1737G>A	p.Q579Q	12	
20	c.1701A>G	p.P567P	12	
	c.1707A>G	p.G569G	12	
	c.1737G>A	p.Q579Q	12	
21				
22	c.1701A>G	p.P567P	12	
	c.1707A>G	p.G569G	12	
	c.1737G>A	p.Q579Q	12	
23	c.1701A>G	p.P567P	12	
	c.1707A>G	p.G569G	12	
	c.1737G>A	p.Q579Q	12	
25	c.2415C>T	p.I805I	17	
	c.1701A>G	p.P567P	12	
	c.1707A>G	p.G569G	12	
	c.1737G>A	p.Q579Q	12	
	c.2451T>A	p.R817R	18	
	c.2472C>T	p.V824V	18	
26	c.1707A>G	p.G569G	12	
	c.1701A>G	p.P567P	12	
	c.1707A>G	p.G569G	12	
	c.1737G>A	p.Q579Q	12	
	c.2451T>A	p.R817R	18	
	c.2502C>T	p.I834I	18	
28	c.1701A>G	p.P567P	12	
	c.1707A>G	p.G569G	12	
	c.1737G>A	p.Q579Q	12	

ID	SNP		Exón	Mutación activa/Exón
30				
34				
35				
37	c.1701A>G	p.P567P	12	missense p.D842V Ex.18
	c.1707A>G	p.G569G	12	
	c.1737G>A	p.Q579Q	12	
40	c.1701A>G	p.P567P	12	missense p.V560D Ex.11
	c.1707A>G	p.G569G	12	
	c.1737G>A	p.Q579Q	12	
41	c.1707A>G	p.G569G	12	
	c.1701A>G	p.P567P	12	
	c.1737G>A	p.Q579Q	12	
42	c.1701A>G	p.P567P	12	missense Ex.11
	c.1707A>G	p.G569G	12	p.Q556L - p. K550KPMYEVQ>K
	c.1737G>A	p.Q579Q	12	p. W557G - p.W557C
43	c.1701A>G	p.P567P	12	
	c.1707A>G	p.G569G	12	
	c.1737G>A	p.Q579Q	12	
44				
45	c.1701A>G	p.P567P	12	missense p.D576N Ex.12
	c.1707A>G	p.G569G	12	
	c.1737G>A	p.Q579Q	12	
46	c.1674C>T	p.R558R	12	
	c.1701A>G	p.P567P	12	
	c.1707A>G	p.G569G	12	
	c.2472C>T	p.V824V	18	
	c.1737G>A	p.Q579Q	12	
47	c.1701A>G	p.P567P	12	missense p.N567NYVYIDPTQL>N Ex.11
	c.1707A>G	p.G569G	12	
	c.1737G>A	p.Q579Q	12	
50	c.1701A>G	p.P567P	12	missense p.I563Del(INGNNYVYIDPTQL) Ex.11
	c.1707A>G	p.G569G	12	
	c.2472C>T	p.V824V	18	
	c.1737G>A	p.Q579Q	12	
52				
54	c.1701A>G	p.P567P	12	missense p.D576N Ex.12
	c.1707A>G	p.G569G	12	
	c.1737G>A	p.Q579Q	12	
55	c.1707A>G	p.G569G	12	
	c.1701A>G	p.P567P	12	
	c.2394C>T	p.I798I	17	
	c.1737G>A	p.Q579Q	12	