



**UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA
FACULTAD DE MEDICINA**

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA Y CIENCIAS FORENSES

**TUMORES ESTROMALES GASTROINTESTINALES. ESTUDIO
CLÍNICO-PATOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO MEDIANTE
*TISSUE MICROARRAYS***

Tesis presentada para la obtención del Grado de Doctor por

Joaquín González – Carreró Fojón

Santiago de Compostela, 2005



D. **Jerónimo Forteza Vila**, Doctor en Medicina y Catedrático de la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela, y D. **Máximo Fraga Rodríguez**, Doctor en Medicina y Profesor Titular de la Facultad de Medicina de La Universidad de Santiago de Compostela:

CERTIFICAN QUE: El presente trabajo titulado "**Tumores estromales gastrointestinales. Estudio clínico-patológico e inmunohistoquímico mediante *tissue microarrays***", que presenta para obtener el Grado de Doctor en Medicina D. **Joaquín González – Carreró Fojón**, ha sido realizado en el Servicio de Anatomía Patológica del Complejo Hospitalario Universitario de Vigo bajo nuestra dirección y que, hallándose concluido, autorizamos su presentación a fin de que pueda ser juzgado por el Tribunal correspondiente.

Santiago de Compostela, diciembre de 2004

Fdo: **Jerónimo Forteza Vila**

Fdo: **Máximo Fraga Rodríguez**

A Reyes, por su paciencia y comprensión,... y por todo lo demás.

A Joaquín y Juan, por ser tan estimulantes.

A Homobono González Carrero (1921-2002), *in memoriam*.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar deseo expresar mi más profundo agradecimiento a D. Javier Pérez Villanueva. Yo, como otros muchos patólogos gallegos, lo considero mi verdadero maestro en esta difícil ciencia – que tiene mucho de arte – que es el diagnóstico anatomopatológico.

Este trabajo no habría comenzado – y mucho menos culminado – sin el estímulo del Profesor Dr. Jerónimo Forteza Vila. Tuve la fortuna de contar con su Dirección, sus consejos y su permanente confianza lograron vencer mi indolencia.

La labor de Dirección del Profesor Dr. Máximo Fraga Rodríguez, con su lectura minuciosa y crítica de los sucesivos borradores, y detectando con agudeza aquello que debía ser corregido, fue decisiva para llegar a la meta. Todo ello realizado, además, con su proverbial amabilidad.

Nunca podría haber culminado este trabajo sin realizar un estudio estadístico exigente, y esto habría sido imposible sin la ayuda de D. Enrique Fluiters Casado. Su colaboración me permitió, además, asomarme al mundo apasionante de la ciencia estadística.

Toda la parte experimental del estudio se llevó a cabo en el Servicio de Patología del Complejo Hospitalario Universitario de Vigo, donde conté con la colaboración desinteresada y constante de mis compañeras patólogas: la Dra. Mercedes Butrón, M^a Carmen Campo, Rosa Cunqueiro, Paz Santiago, Concha Fiaño, Ana González Piñeiro y Rocío Fernández Martín. A esta última le estoy especialmente agradecido pues, desde sus funciones de responsable del área de inmunohistoquímica del Servicio, posibilitó que las numerosas inmunotinciones realizadas en este trabajo sean de una calidad excelente.

El personal no facultativo del Servicio contribuyó tanto o más que los anteriores a que este trabajo sea ya un hecho. No puedo mencionar aquí a todos, pero es imprescindible recordar a Malena, nuestra Supervisora, totalmente comprometida en la buena marcha y el progreso del Servicio; a Rosa, una técnico excepcional que se convirtió en pocos días en la reina del *Tissue Microarray*; a Maika, que domina como nadie los entresijos de la tinción inmunohistoquímica; y a los celadores – Enrique y Patxi – que tuvieron que ir con frecuencia a las catacumbas en busca de preparaciones y bloques de parafina añejos.

Tengo la suerte de trabajar en un Hospital docente y, en consecuencia, muchos

jóvenes médicos residentes se transformaron en Patólogos en nuestro Servicio. A todos ellos les estoy muy agradecido pues no hay mejor forma de aprender que cuando se tiene que enseñar.

INDICE

	<u>Página</u>
GLOSARIO DE ABREVIATURAS	5
NOTA	6
I. INTRODUCCIÓN	7
I.1 TUMOR ESTROMAL GASTROINTESTINAL (GIST)	12
I.1.1 Esbozo histórico	12
I.1.2 Definición de GIST	14
I.1.3 Características clínico–patológicas	16
I.1.3.1 Clínica	16
I.1.3.2 Procedimientos diagnósticos	17
I.1.3.3 Localización	18
I.1.3.4 Histopatología	19
I.1.3.5 Inmunohistoquímica	21
I.1.3.6 Microscopía electrónica	23
I.1.3.7 Diagnóstico diferencial	24
I.1.3.8 Histogénesis	27
I.1.4 Patología molecular del GIST	29
I.1.4.1 El proto-oncogén <i>c-kit</i> y la proteína KIT	29
I.1.4.2 Mecanismo de acción de KIT	31
I.1.4.3 Otros eventos genético-moleculares	32
I.1.5 Valoración pronóstica del GIST	34
I.1.5.1 Factores morfológicos	34
I.1.5.2 Inmunohistoquímica y pronóstico	38
I.1.5.3 Mutaciones y pronóstico	38
I.1.5.4 Una rápida revisión del ciclo celular. Proteínas del ciclo celular y pronóstico del GIST	40
I.1.6 Tratamiento	44
I.1.6.1 Cirugía	44
I.1.6.2 Quimioterapia convencional	45
I.1.6.3 Radioterapia	45
I.1.6.4 Imatinib (Glivec)	45
I.2 MICROMATRICES DE TEJIDOS – TISSUE MICROARRAYS (TMAs)	48
I.2.1 Definición y características de los TMAs	48
I.2.2 Aplicaciones de los TMAs	49

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	51
II.1 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	53
II.2 OBJETIVOS	55
III. MATERIAL Y MÉTODOS	57
III.1 PACIENTES	59
III.2 REVISIÓN PATOLÓGICA	61
III.3 CONSTRUCCIÓN DE LOS TMA_s	62
III.4 INMUNOHISTOQUÍMICA	63
III.5 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	66
III.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	66
III.7 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	67
IV. RESULTADOS	69
IV.1 HALLAZGOS CLÍNICOS Y MACROSCÓPICOS	71
IV.2 HALLAZGOS HISTOLÓGICOS	74
IV.3 HALLAZGOS INMUNOHISTOQUÍMICOS	78
IV.4 HALLAZGOS ULTRAESTRUCTURALES	86
IV.5 ANÁLISIS PRONÓSTICO	86
IV.5.1 Comparación de medias de variables cuantitativas	87
IV.5.2 Correlaciones	87
IV.5.3 Análisis de supervivencia. Modelo de Kaplan-Meier	90
IV.5.4 Análisis de supervivencia. Modelo de regresión de Cox	93
V. DISCUSIÓN	97
V.1 DATOS CLÍNICOS	101
V.2 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	102
V.3 INMUNOHISTOQUÍMICA Y DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL	105
V.4 VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROLIFERATIVA	109
V.5 MARCADORES DEL CICLO CELULAR Y DE LA APOPTOSIS	112
VI. CONCLUSIONES	117

VII. ANEXOS	121
VII.1 ANEXO 1. DATOS CLÍNICOS	123
VII.2 ANEXO 2. DATOS MORFOLÓGICOS	125
VII.3 ANEXO 3. DATOS INMUNOHISTOQUÍMICOS	127
VIII. BIBLIOGRAFÍA	129

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

AME: actina músculo-específica

CGA: campo de gran aumento

CIC: célula intersticial de Cajal

DES: desmina

GANT: gastrointestinal autonomic nerve tumor (tumor gastrointestinal del sistema nervioso autónomo)

GFAP: glial fibrillary acidic protein

GIPACT: gastrointestinal pacemaker cell tumor (tumor de la célula marcapasos gastrointestinal)

GIST: gastrointestinal stromal tumor (tumor estromal gastrointestinal)

IHQ: inmunohistoquímica

LMC: leucemia mieloide crónica

MIT: mitosis

MMT: micromatriz de tejidos (véase TMA)

PDGFRA: platelet derived growth factor receptor α

PET: positron emission tomography

TC: tomografía computerizada

TGF- β : Transforming Growth Factor β

TMA: tissue microarray (véase MMT)

TQ: tirosín-quinasa

VIM: vimentina

NOTA: Emplearemos siempre cursivas cuando nos refiramos a la denominación de los genes y tipografía ordinaria si nos referimos a las proteínas codificadas por esos genes. También recurriremos a las letras cursivas cuando transcribamos palabras no españolas.

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

La mayor parte de las terapias anticancerosas desarrolladas en los últimos cincuenta años son básicamente inespecíficas, es decir, no dirigen su acción de manera exclusiva sobre una diana celular o molecular concreta, logrando de este modo la detención del crecimiento tumoral, sino que su mecanismo de acción es menos preciso. Los agentes quimioterápicos citotóxicos actúan habitualmente interfiriendo la maquinaria celular común a los tejidos neoplásicos y a los no neoplásicos. De este modo, la quimioterapia convencional no es selectiva, lo que invariablemente se traduce en una toxicidad importante y un índice terapéutico estrecho; todo ello sin perjuicio de los incuestionables avances experimentados en estos años en el tratamiento oncológico (DeMatteo *et al.*, 2002).

En su obra magna *La estructura de las revoluciones científicas*, Kuhn explica cómo los grandes avances en la Ciencia acontecen a través de cambios en lo que denomina el "paradigma", cambios que suponen la construcción de un nuevo armazón en el que asienta la disciplina, estableciendo las normas que la rigen, determinando los futuros retos y marcando sus límites (Kuhn, 1962). Pues bien, en los años 90 del pasado siglo tuvo lugar un cambio trascendental en el paradigma hasta entonces vigente en la terapia anticancerosa, como consecuencia directa de las extraordinarias aportaciones de la investigación básica a la comprensión de los mecanismos genéticos y moleculares que subyacen en la oncogénesis. Así, como un beneficio inmediato de la traslación biotecnológica de estos hallazgos básicos a la investigación aplicada, la industria farmacéutica comenzó a diseñar nuevos fármacos dirigidos a corregir de manera específica las alteraciones descritas por la investigación básica. Esto es especialmente eficaz en el caso de las neoplasias en las que un único acontecimiento molecular es crucial o central en su desarrollo, convirtiéndose en una condición necesaria y casi suficiente, a diferencia de lo que ocurre en otros muchos tumores, que sólo aparecen tras una cascada o acumulación de numerosos sucesos moleculares de igual valor.

Un ejemplo bien conocido de estos acontecimientos genéticos singulares es la translocación cromosómica t(9; 22) que, en la leucemia mieloide crónica (LMC), da lugar a la síntesis de una proteína quimérica de fusión denominada BCR-ABL, a partir del nombre dado a los genes yuxtapuestos en la translocación. Esta proteína anómala tiene una actividad tirosín-quinasa (TQ) incontrolada o constitutiva, que repercute en numerosas funciones

celulares tales como la adhesión, la apoptosis, la proliferación celular y la diferenciación, e induce al desarrollo de la LMC (Druker *et al.*, 1996). A pesar del escepticismo inicial en torno a la eficacia real de un agente bloqueador de la actividad quinasa de BCR-ABL, derivado sobre todo de la dificultad de diseñar *ex profeso* un fármaco que bloquee el "bolsillo" (*pocket*) de unión del ATP sólo en la quinasa patológica y no en todas las quinasas intracelulares, con consecuencias potencialmente letales, pudo sintetizarse una pequeña molécula que bloqueaba *in vitro* la actividad quinasa de ABL (Druker *et al.*, 1996). Este hallazgo preclínico fue publicado el año 1996, y al fármaco se le dio originalmente el nombre en clave de STI-571. Tan solo cinco años después, en 2001, la *Food and Drug Administration* (FDA) de los Estados Unidos aprobó la terapia con STI-571 – ya denominado mesilato de imatinib (Glivec®) - en los pacientes con LMC, tras comprobarse que es un tratamiento seguro y eficaz, con una tasa de remisión completa del 90% en la fase crónica de la LMC, y con mínimos efectos secundarios (Druker *et al.*, 2001).

En 1998, Hirota y colaboradores (Hirota *et al.*, 1998) publican su observación de la presencia de mutaciones en el proto-oncogén *c-kit* en cinco casos de tumor estromal gastrointestinal, conocidos universalmente como GIST por las iniciales en inglés de su denominación (*Gastrointestinal Stromal Tumor*), siglas que emplearemos de manera preferente en lo sucesivo. Estas mutaciones, localizadas todas ellas en el exón 11, que codifica el dominio yuxtamembrana de la proteína sintetizada a partir del gen denominada KIT, se traducían en un aumento en la función de esta proteína, que actúa también como una enzima tirosín-quinasa. Pronto se propuso la hipótesis de que estas mutaciones, que comportaban la activación constitutiva de KIT, podían ser un paso decisivo en la patogénesis del GIST, al igual que sucede con la t(9; 22) en la LMC. Simultáneamente, se comprobó que STI-571 no era un inhibidor completamente específico de la proteína de fusión BCR-ABL, pues también bloqueaba la actividad enzimática de, al menos, otras dos proteínas transmembrana: *Platelet-Derived Growth Factor Receptor* α (PDGFRA) y la mencionada KIT. El primer intento de tratamiento de un caso de GIST con STI-571, en una mujer con enfermedad ampliamente diseminada en la que ya habían fracasado las terapias convencionales, fue abordado en Finlandia en el año 2000 (Joensuu *et al.*, 2001). A las pocas semanas de comenzar la administración oral de 400 mg diarios de STI-571, se registró una respuesta clínica objetiva contundente, que se mantuvo más de 18 meses. Actualmente, el mesilato de imatinib se ha convertido en el tratamiento de elección del GIST maligno recidivante o metastático, una enfermedad que en esencia era completamente resistente a cualquier terapia sistémica antes del descubrimiento del Glivec (Berthet *et al.*, 1999; Dagher

et al., 2002; Demetri *et al.*, 2002; Van Oosterom *et al.*, 2001).

Toda esta serie de acontecimientos, extraordinariamente rápida, condujo a una explosión de interés renovado por el GIST, una neoplasia relegada y casi ignorada hasta hace poco tiempo en la literatura médica, con la posible excepción de las publicaciones anatomopatológicas, quizás no tanto por su aparente infrecuencia como por la carencia de opciones terapéuticas eficaces. Una demostración muy expresiva de este redescubrimiento del GIST por parte de la investigación biomédica es el número de publicaciones que incluyen en su título cada año los términos *gastrointestinal stromal tumor*, con datos recogidos de la página web PubMed y reflejados en la **Figura 1**.

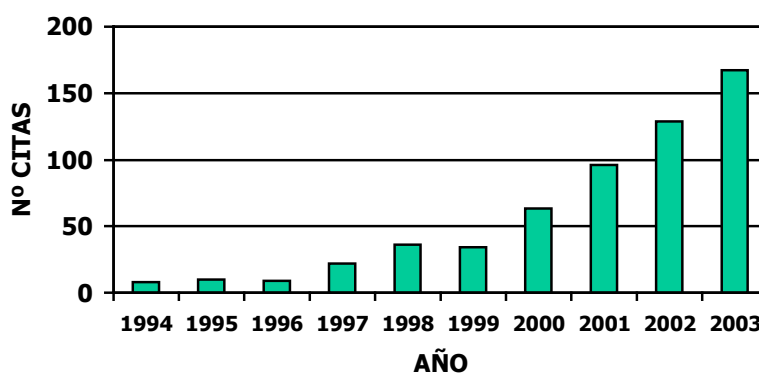


FIGURA 1. Número de artículos, por año de publicación, que incluyen en su título los términos *gastrointestinal stromal tumor*, según Pub Med (<http://www.ncbi.nlm.gov/entrez/query.fcgi>).

El presente estudio pretende inscribirse en este renacimiento del interés de la comunidad científica y médica por el GIST, explorando la rentabilidad de las matrices de tejidos (*tissue microarrays*) en su valoración diagnóstica y pronóstica.

I.1 TUMOR ESTROMAL GASTROINTESTINAL (GIST)

I.1.1 ESBOZO HISTÓRICO

Las primeras descripciones sistemáticas de los tumores mesenquimales surgidos a partir del tracto gastrointestinal datan de la quinta década del pasado siglo (Stout, 1962). Desde estos trabajos pioneros, y durante muchos años, se mantuvo la creencia de que todos estos tumores eran neoplasias originadas en el músculo liso o, al menos, su diferenciación era en el sentido de adquirir, en mayor o menor medida, rasgos morfológicos del músculo liso. En consecuencia, la terminología empleada reflejaba esta suposición y fueron designados como leiomiomas o leiomiosarcomas cuando estaban compuestos por células fusiformes; y leiomioblastomas benignos o malignos (o leiomiomas y leiomiosarcomas epitelioides) cuando la población celular era mayoritariamente epitelioides.

La aplicación sistemática de la microscopía electrónica al estudio de las neoplasias humanas en los primeros años setenta demostró que las evidencias ultraestructurales de diferenciación muscular lisa no eran convincentes, o eran incompletas, en la gran mayoría de los tumores mesenquimales del tracto gastrointestinal (Appelman y Helwig, 1977). Esta impresión fue confirmada con la difusión de la inmunohistoquímica en los primeros años de la década siguiente. Estos estudios mostraron que las células neoplásicas en muchos de estos tumores carecían de un inmunofenotipo compatible con un origen muscular. Los nuevos datos acumulados condujeron a Mazur y Clark en el año 1983 a proponer la denominación genérica, y menos comprometida con la histogénesis, de "tumor estromal" (Mazur y Clark, 1983). En una publicación algo posterior, referida a los tumores mesenquimales del tubo digestivo en la neurofibromatosis de Von Recklinghausen, ya se emplea la denominación completa que haría fortuna de "tumor estromal gastrointestinal" (*gastrointestinal stromal tumor*), y sus siglas inglesas GIST (Schaldenbrand y Appelman, 1984). Estos mismos autores, y otros de manera casi simultánea, también percibieron que una porción no desdeñable de los tumores estromales del tracto gastrointestinal mostraban rasgos ultraestructurales de diferenciación schwanniana o neural, con expresión de antígenos de la cresta neural tales como la proteína S-100 o la enolasa neuro-específica. En un pequeño grupo de tumores estos rasgos ultraestructurales eran tan destacados que sus

componentes remodelaban las células neurales del plexo mientérico autónomo, y fueron designados con el nombre de plexosarcomas por Herrera y colaboradores (Herrera *et al.*, 1984; Herrera *et al.*, 1989). Posteriormente, estas lesiones se conocieron más ampliamente como tumores gastrointestinales de los nervios autonómicos, GANTs a partir de sus siglas inglesas (*gastrointestinal autonomic nerve tumors*) (Donner, 1997; Lauwers *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 2001; Schmid y Wegmann, 2000).

En los primeros años noventa la confusión derivada de estas incertidumbres histogenéticas era considerable. Uno de los principales textos de Patología Quirúrgica de esos años (Rosai, 1996) dividía a los tumores estromales, ya conocidos universalmente como GISTs, en cuatro categorías en función de su diferenciación o fenotipo juzgado a partir del estudio por inmunohistoquímica y/o microscopía electrónica, y adaptando una clasificación publicada previamente (Erlandson *et al.*, 1996):

1. Tumores con diferenciación hacia célula de músculo liso.
2. Tumores con diferenciación a elementos neurales (GANTs).
3. Tumores con diferenciación dual, muscular lisa / neural.
4. Tumores que carecen de rasgos de diferenciación.

Todas las lesiones situadas en las categorías 2, 3 y 4 antes mencionadas se debían considerar malignas o, al menos, potencialmente malignas. A los tumores que mostraban diferenciación muscular se les debía aplicar una valoración pronóstica parecida a la de los tumores de músculo liso de otras localizaciones, como el cuerpo uterino, en el que aparecen con mucha frecuencia. Así, se podían identificar lesiones benignas, *borderline* o malignas en función de criterios morfológicos tales como el número de mitosis y el tamaño, fundamentalmente.

Aquí debemos reseñar que la última y muy reciente edición de este mismo tratado de Patología Quirúrgica (Rosai, 2004) mantiene la división de los GISTs en estas cuatro categorías basadas en los rasgos fenotípicos - inmunohistoquímicos y ultraestructurales - de los tumores, pero despojándolas ya de cualquier implicación pronóstica.

Un hallazgo muy relevante, que facilitó el complejo diagnóstico del GIST, fue la constatación de la frecuente expresión inmunohistoquímica del antígeno CD34 en estos tumores, comprobándose que era el mejor y más reproducible marcador en su diagnóstico (Miettinen *et al.*, 1995; Mikhael *et al.*, 1994). Sin embargo, pronto decayó el entusiasmo inicial al constatarse que la sensibilidad de este anticuerpo en el diagnóstico del GIST era

relativamente baja, pues el porcentaje de tumores que se tiñen con CD34 no supera la cifra del 70%, sin olvidarnos de los conocidos problemas de especificidad del CD34 derivados del amplio espectro de neoplasias en el que se manifiesta una inmunotinción positiva, con lo que este marcador perdió buena parte de su valor.

Así, hasta que los más recientes descubrimientos genéticos y moleculares contribuyeron a clarificar la situación, podían definirse dos aproximaciones dicotómicas a los problemas diagnósticos planteados por los GISTs. La primera escuela tendía a agrupar todos los tumores mesenquimales del tubo digestivo bajo la denominación genérica de GIST, soslayando las diferencias inmunofenotípicas entre algunos de ellos. Esta línea de pensamiento tenía el inconveniente de incluir a los verdaderos tumores de músculo liso, schwannomas y otras lesiones bajo este epígrafe. La segunda aproximación intentaba identificar un grupo de lesiones diferentes de los verdaderos tumores de músculo liso y los schwannomas. Aunque esta última interpretación parecía más certera, la gran variación de patrones microscópicos y la carencia de un marcador específico hacía que el diagnóstico de GIST fuera poco reproducible.

Precisamente, una consecuencia extremadamente importante de la investigación molecular y genética en el GIST - cuyos hitos fundamentales serán comentados más adelante - fue la posibilidad de disponer de un marcador inmunohistoquímico que identifica de manera consistente este tipo de tumores: la proteína KIT (CD117), cuyo papel es tan relevante que actualmente está en discusión si la inmunoexpresión para KIT debe entrar incluso en la propia definición de GIST.

I.1.2 DEFINICIÓN DE GIST

El debate en torno a si el uso del término "tumor estromal gastrointestinal" debe limitarse exclusivamente al grupo de neoplasias mesenquimales intraabdominales que muestren un inmunofenotipo KIT (CD117) positivo no parecía estar resuelto hasta muy recientemente. En algunas de las series publicadas, la expresión de CD117 era un requisito para la inclusión de los casos (Hasegawa *et al.*, 2002), y ésta parecía consolidarse como la tendencia de la mayoría de los grupos que trabajaban en este campo. Pero también se aceptaba que podían existir algunas excepciones - muy infrecuentes - a la norma general de

positividad para CD117 (Fletcher *et al.*, 2002^a). Estas excepciones corresponderían a los tumores con las características anatómicas e histopatológicas típicas del GIST, pero que:

1. Tengan una inexpresividad inmunohistoquímica universal, debido a artefactos de fijación, calor excesivo en el procesamiento, almacenamiento prolongado de cortes sin teñir, etc.
2. La biopsia sea realmente negativa para CD117 por error de muestreo, como puede suceder con biopsias pequeñas obtenidas con aguja.
3. El tumor haya dejado de expresar CD117 por algún tipo de evolución clonal, que puede estar relacionada con el tratamiento con imatinib.
4. Es posible que exista un pequeño porcentaje de tumores típicos que carezcan de mutaciones en *c-kit* y/o expresión de KIT. Se propuso en su momento que estas lesiones excepcionales fueran denominadas "neoplasia estromal fusocelular (o epitelioides) compatible con GIST" (Fletcher *et al.*, 2002^a).

Recientemente el abordaje de este problema se ha modificado al comprobarse la verdad de este último punto, pues realmente existe un número no despreciable de genuinos GISTs sin mutaciones en el gen *c-kit* y algunos de éstos muestran, sin embargo, mutaciones en el gen que codifica el PDGFRA (Heinrich *et al.*, 2003^b; Hirota *et al.*, 2003). Esto sucede en torno al 5% de los GISTs y estos tumores no expresan CD117 en el estudio IHQ, pero pueden responder igualmente al tratamiento con imatinib. Por ello, aunque la inmunotinción para CD117 ocupa un lugar central en el abordaje diagnóstico del GIST, ya no se considera absolutamente imprescindible para realizar tal diagnóstico. Sobre la base de estos nuevos hallazgos, se ha propuesto una definición de la entidad por la que son GISTs los "tumores no epiteliales (mesenquimales) intraabdominales que expresan la proteína KIT o que tienen una mutación activadora en un gen de un receptor tirosín-quinasa de clase III (KIT o PDGFRA)" (Joensuu y Kindblom, 2004).

Algunos expertos consideran que los rasgos clínico-patológicos de la mayoría de los GISTs están tan bien definidos que es posible el diagnóstico de estos tumores, e incluso su categorización en lesiones benignas y malignas, sin la ayuda de la inmunohistoquímica (Trupiano *et al.*, 2002). No obstante, el consenso general es que la inmunotinción para CD117 debe realizarse como elemento confirmador, que además facilitará información de interés terapéutico porque selecciona los casos potencialmente sensibles al tratamiento con

imatinib. Como sucede con todas las técnicas inmunohistoquímicas, los resultados deben valorarse en su contexto morfológico, pues se han descrito otras neoplasias que expresan KIT (Gibson y Cooper, 2002; Hornick y Fletcher, 2002; Lucas *et al.*, 2003; Miettinen *et al.*, 2000^d; Sarlomo-Rikala *et al.*, 1998).

En este trabajo hemos aplicado de manera no estricta los resultados de la inmunotinción para CD117, incorporando a la serie aquellos tumores abdominales CD117 negativos que satisfacen los criterios diagnósticos clínico-patológicos consolidados en la literatura, tras excluir las neoplasias de músculo liso y los schwannomas.

I.1.3 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO - PATOLÓGICAS

I.1.3.1 CLÍNICA. Es muy difícil dar cifras fiables de la incidencia de este tumor por la carencia de registros específicos, pero los datos más antiguos daban una horquilla que oscilaba entre 1 y 10 pacientes nuevos por 1.000.000 habitantes y año, para los casos detectados clínicamente y no encontrados por azar en el transcurso de otras intervenciones quirúrgicas (Fletcher *et al.*, 2002^a). La tasa de diagnósticos de GIST se ha incrementado en los últimos años no por un aumento real en su incidencia, sino por el uso rutinario y consolidado de un test reproducible y fiable, como es la inmunotinción para CD117, y así un estudio muy reciente (Kindblom *et al.*, 2002) da una cifra de incidencia de 14,5 casos nuevos por millón de habitantes y año, con una prevalencia de 129 pacientes portadores de un GIST por millón de habitantes. El rango de edad en el momento del diagnóstico suele situarse entre la quinta y novena década de vida, con una mediana en los 67 años (Kindblom *et al.*, 2002), aunque se han descrito casos en edad pediátrica (Cypriano *et al.*, 2004), e incluso un caso congénito (Bates *et al.*, 2000). La incidencia es levemente mayor en el varón que en la mujer (DeMatteo *et al.*, 2000) o idéntica en ambos sexos (Kindblom *et al.*, 2002; Miettinen *et al.*, 2000^a).

El espectro de posibilidades en la presentación clínica del GIST oscila desde el descubrimiento casual, en el transcurso de endoscopias o de procedimientos quirúrgicos por otros motivos, de nódulos pequeños – habitualmente benignos - situados en la pared del

tubo digestivo; hasta las grandes masas tumorales de naturaleza obviamente maligna y con clínica florida. A menudo, el tumor es clínicamente silente hasta que alcanza un tamaño suficiente para causar molestias y dolor abdominal, o puede ser detectado como una masa palpable. Entre una cuarta parte y la mitad de los casos se presenta a través de episodios de hemorragia aguda en el tracto gastrointestinal o en la cavidad peritoneal (DeMatteo *et al.*, 2000). Los GISTs pequeños se detectan más a menudo en el estómago y recto, mientras que en el intestino delgado son más frecuentes los sarcomas avanzados (Miettinen *et al.*, 2002³). En un amplio estudio poblacional reciente (Kindblom *et al.*, 2002), el 69% de los GISTs fueron sintomáticos y el 21% fueron descubiertos casualmente. El 10% restante fueron hallazgos de autopsia. Adicionalmente, este trabajo muestra la relación directa entre estos datos clínicos y el tamaño de los tumores. Así, el diámetro mayor medio de los GISTs sintomáticos es de 6 cm (1-35 cm), el de los encontrados de modo casual es de 2 cm (0,5-10 cm), y los descubiertos en necropsias es de 1,5 cm (0,5-10 cm).

La inmensa mayoría de los GISTs aparecen esporádicamente, no asociados a procesos sindrómicos hereditarios. Sin embargo, los pacientes con neurofibromatosis de Von Recklinghausen (neurofibromatosis tipo 1) tienen una mayor predisposición a padecer GISTs (Fuller y Williams, 1991; Schaldenbrand y Appelman, 1984), pero estos tumores no parecen mostrar mutaciones en el gen *c-kit* (Kinoshita *et al.*, 2002). También el GIST es uno de los elementos de la llamada tríada de Carney, junto con los condromas pulmonares y los paragangliomas extraadrenales (Carney, 1999). Más recientemente, el propio Carney ha descrito un cuadro de asociación exclusiva de paraganglioma y GISTs múltiples (Carney y Stratakis, 2002). Finalmente, en miembros de familias con mutaciones en línea germinal del gen *c-kit*, los pacientes afectados desarrollan GISTs, por lo general múltiples, a lo largo del tubo digestivo, además de mostrar alteraciones en la pigmentación cutánea o clínica de urticaria pigmentaria (Hirota *et al.*, 2000; Maeyama *et al.*, 2001; Nishida *et al.*, 1998; O'Brien *et al.*, 1999). La última aportación en este campo es la descripción de una familia con GISTs múltiples en varios de sus miembros que eran portadores de una mutación en línea germinal en el gen *PDGFRA* (Chompret *et al.*, 2004).

I.1.3.2 PROCEDIMIENTOS DIAGNÓSTICOS. La tomografía computerizada (TC) con contraste es el método de elección para etiquetar una masa abdominal, y permite evaluar su extensión y determinar si existe o no enfermedad metastática. El aspecto habitual de los GISTs en las imágenes de la TC es el de una masa sólida que se refuerza

intensamente con el contraste intravenoso. La intensificación con el contraste suele ser homogénea (Lee *et al.*, 2004). Los tumores grandes, mayores de 10 cm de diámetro, son más complejos debido a la frecuente necrosis, hemorragia, u otros cambios degenerativos (Conlon *et al.*, 1995). El origen concreto de la masa puede ser difícil de determinar, especialmente cuando el crecimiento es exofítico. La única variable que, en las imágenes de TC, se asocia de modo significativo con un comportamiento clínico agresivo en los GISTs es el tamaño tumoral. Ni la presencia de ulceración de la mucosa, de infiltración de la grasa mesentérica o de una aparente invasión directa de órganos vecinos permite identificar positivamente los GISTs malignos (Kim TW *et al.*, 2004), con la excepción lógica de la detección de metástasis hepáticas.

Por la situación relativamente profunda de los GISTs en la pared del tubo digestivo, las biopsias endoscópicas usuales no permiten obtener con frecuencia el suficiente tejido para llegar a un diagnóstico concluyente. La ecografía endoscópica es hoy uno de los procedimientos más adecuados para la categorización de las lesiones tumorales submucosas situadas en las áreas accesibles del tubo digestivo (Palazzo *et al.*, 2000). Además, mediante esta técnica pueden realizarse biopsias dirigidas de mayor tamaño o punciones citológicas con aguja fina, lo que incrementa las posibilidades de alcanzar un diagnóstico patológico prequirúrgico (Vander Noot *et al.*, 2004).

I.1.3.3 LOCALIZACIÓN. El órgano en el que, con diferencia, se encuentran más GISTs es el estómago. La gran serie poblacional de origen noruego publicada en 2002 (Kindblom *et al.*, 2002) y que incluye tan solo GISTs con un diagnóstico realizado aplicando los criterios más recientes, da las siguientes cifras: estómago - 57%, intestino delgado - 33,5%, colon / recto - 6,5%, retroperitoneo - 0,5%, epíplon / mesenterio y otros - 2,5%. Una serie muy amplia también reciente - que comprende 171 casos de una sola institución - incluía 145 tumores gástricos (84,8%), localización a la que seguían en frecuencia el intestino delgado con 18 casos (10,5%), el recto con 6 (3,5%) y, finalmente, el esófago con 2 tumores (1,2%) (Hasegawa *et al.*, 2002). Hay que tener en cuenta que esta serie procede de Japón, un país donde se realizan muchas más endoscopias altas que en Occidente a causa de la alta incidencia de cáncer gástrico en ese país. De hecho, la mayoría de estos casos de GIST (62,6%) se detectó a través de una exploración endoscópica en ausencia de síntomas, lo que supone un sesgo en relación con las cifras aportadas por los estudios europeos o americanos, en los que los GIST se diagnostican mayoritariamente tras el

desarrollo de síntomas.

Una gran serie de todos los tumores gastrointestinales calificados como musculares lisos recuperados del archivo del Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas americanas (AFIP), y que incluía una minoría de verdaderos leiomiomas o leiomiomas (Emory *et al.*, 1999), comprendía 1004 casos. De ellos, 53 eran esofágicos (5,3%), 524 tumores eran gástricos (52,1%), 252 tumores se localizaban en el intestino delgado (25,1%), 108 casos en el grueso (10,8%), y 67 tumores (6,7%) en otros puntos del abdomen (epiplon, peritoneo, mesenterio).

La serie de GISTs del Complejo Hospitalario de la Universidad de Santiago (CHUS) - publicada recientemente e incorporada a este estudio (Abdulkader *et al.*, 2002) - consta de 34 tumores, de los que 3 son esofágicos (8,8%), 19 son gástricos (55,9%), 8 son del intestino delgado (23,5%), y 4 son del intestino grueso (11,8%).

Un punto especialmente relevante, mencionado en las cifras anteriores y con repercusiones en las teorías histogenéticas aplicadas a esta neoplasia, es la aparición relativamente frecuente de GISTs en territorios intraabdominales no directamente vinculados al tubo digestivo tales como el epiplon, el mesenterio o, incluso, el retroperitoneo (Miettinen *et al.*, 1999^a; Reith *et al.*, 2000, Yamamoto *et al.*, 2004). Estos tumores son idénticos desde todos los puntos de vista – morfológico, inmunohistoquímico, genético-molecular y terapéutico – a los GISTs ordinarios (Yamamoto *et al.*, 2004).

Finalmente, se han descrito en los últimos años – casi siempre con el formato de “aportación de un caso” – ejemplos de GISTs en otros órganos, tales como el apéndice cecal (Miettinen y Sobin, 2001), la faringe (Siddiq *et al.*, 2004), la vesícula biliar (Peerlinck *et al.*, 2004), el hígado (Hu *et al.*, 2003) y el páncreas (Yamaura *et al.*, 2004).

I.1.3.4 HISTOPATOLOGÍA. El patrón microscópico de la inmensa mayoría de los GISTs encaja en alguna de estas tres categorías: tipo fusocelular (70%), tipo epitelioides (20%), o tipo mixto (10%) (Corless *et al.*, 2004, Fletcher *et al.*, 2002^a). Pueden observarse ocasionalmente algunos otros patrones, tales como tumores mixoides, lesiones con una arquitectura en nidos o cordones que recuerden a un paraganglioma o a un carcinoide, e incluso tumores compuestos por células en “anillo de sello” (Suster y Fletcher, 1996). El pleomorfismo nuclear suele ser tan solo discreto o moderado, y la existencia de una marcada

variación en tamaño y forma nuclear debe hacer pensar en otras neoplasias tales como un leiomioma (Fletcher *et al.*, 2002^a). También son habitualmente escasas las mitosis convirtiéndose en una difícil tarea su contabilidad, e incluso los GISTs obviamente malignos no superan casi nunca una cifra de 50 mitosis por 50 campos de gran aumento.

Los GISTs fusocelulares están constituidos por células bastante monomorfas agrupadas en fascículos cortos mal definidos u ovillos. No es raro ver una disposición en empalizada, de llamativo aspecto schwanniano. Los citoplasmas son siempre más pálidos que los de las células musculares lisas, aunque también son fibrilares y con límites imprecisos. Los núcleos tienden a ser monomorfos, y menos elongados que los de las células musculares lisas, con las que comparten la presencia ocasional - en alrededor del 5% de los casos - de llamativas vacuolas citoplasmáticas en posición paranuclear. La colagenización estromal suele ser escasa, pero pueden verse numerosos vasos de paredes finas y focos de hemorragia.

Los GISTs epitelioides están constituidos por células redondas o poligonales con citoplasmas claros o eosinófilos. Los núcleos también suelen ser uniformes, redondos u ovoides, aunque la atipia nuclear o la multinucleación se ven más a menudo en los GISTs epitelioides (Corless *et al.*, 2004). Estos tumores pueden confundirse más fácilmente con neoplasias epiteliales o melanocíticas a lo que contribuye, además de las características citológicas mencionadas, su habitual disposición en nidos.

En los GISTs mixtos pueden verse tanto transiciones abruptas entre los dos patrones principales, como una mezcla compleja de elementos fusocelulares y epitelioides. Otra posibilidad es que esté compuesto por células ovoides de aspecto intermedio.

El 5% de los GISTs muestran un estroma mixoide extenso y prominente, a veces acompañado de degeneración quística. En el 10-20% de los casos, con mayor incidencia en las lesiones del intestino delgado e independientemente de su patrón, se observan las llamadas fibras esquenoides (Min, 1992; Segal *et al.*, 1994), estructuras fibrilares o hialinas fuertemente eosinófilas, compuestas por ovillos nodulares de fibras de colágeno. Son PAS positivas y no tienen un significado histogenético, aunque se consideraron en el pasado un marcador de diferenciación neural.

I.1.3.5 INMUNOHISTOQUÍMICA. Como ya se mencionó anteriormente, la inmunotinción positiva para KIT se ha convertido en un verdadero test diagnóstico en el

GIST, con pocas excepciones a esta norma general (cuando nos refiramos a la tinción inmunohistoquímica, en lo sucesivo emplearemos preferentemente el término CD117, que es la denominación antigénica de la proteína KIT). Sin embargo, todavía no está plenamente establecido qué se debe entender por una inmunotinción positiva, admitiéndose de modo un tanto impreciso que la expresión citoplasmática de CD117 será fuerte, inequívoca y difusa (Fletcher *et al.*, 2002^a). La tinción es citoplasmática pero en los GISTs, a diferencia de otras neoplasias que pueden expresar CD117, debe mostrar un componente o refuerzo de membrana celular (Rosai, 2004). En alrededor de la mitad de los casos puede observarse un patrón de tinción en gota citoplasmática ("patrón Golgi"), sólo o coexistiendo con el más común patrón difuso con refuerzo membranoso. En un reducido porcentaje de los GISTs la expresión de CD117 es muy focal, con tinción del 5-20% de las células, una fuente de errores potenciales cuando se dispone sólo de biopsias pequeñas.

Dada la importancia diagnóstica e incluso terapéutica de la inmunopositividad para CD117 - que podría seleccionar los pacientes susceptibles de ser tratados con imatinib - es extremadamente importante evitar los falsos positivos y falsos negativos (Fletcher, 2001). En un análisis de la expresión de CD117 en una serie de 365 sarcomas, se encontró una inmunotinción positiva - generalmente focal - en algunos tumores; en concreto, en 2 de 20 condrosarcomas mixoides extraesqueléticos, en 4 de 20 sarcomas de Ewing / tumores neuroectodérmicos primitivos periféricos, en 3 de 5 schwannomas melanóticos, en 4 de 20 melanomas metastásicos, y en 5 de 20 angiosarcomas (Hornick y Fletcher, 2002). Los autores refieren que estos resultados son diferentes de los comunicados en otros estudios previos, lo que subraya la importancia de la elección del anticuerpo y las condiciones experimentales en que se realiza la tinción. En lo que respecta a CD117, la reproducibilidad de la tinción y la eliminación de reacciones inespecíficas es fundamental (Hornick y Fletcher, 2003). Tanto es así, que se ha llegado a proponer la estandarización plena de la técnica, como ha sucedido en parte con el Herceptest destinado a semicuantificar la amplificación de Her-2 en el carcinoma de mama, aunque esta posibilidad ha sido fuertemente criticada por Fletcher (Fletcher y Fletcher, 2002). Este autor fundamenta su crítica en cinco puntos: la existencia comprobada de GISTs carentes de mutaciones en *c-kit*, la existencia de GISTs genuinos con mutaciones en *PDGFRA*, la existencia de otros sarcomas CD117 positivos, la imposibilidad de lograr una estandarización satisfactoria de ésta o de cualquier otra inmunotinción, y la inevitable subjetividad de la interpretación de los resultados. No obstante, es evidentemente necesario lograr al menos una homogeneidad de resultados dentro de cada laboratorio y para ello los anticuerpos utilizados deben ser cuidadosamente

titulados, usando controles adecuados positivos y negativos. A pesar de todas estas precauciones, existe un pequeño porcentaje de GISTs inequívocos – en torno al 5% - que serán negativos para CD117 (Corless *et al.*, 2004).

Teniendo en cuenta la presencia no infrecuente de GISTs en los tejidos blandos del abdomen - tales como el mesenterio, epiploon, etc. - y también en el retroperitoneo, es decir, en áreas no directamente vinculadas al tubo digestivo (Miettinen *et al.*, 1999^a, Reith *et al.*, 2000, Yamamoto *et al.*, 2004), parece conveniente realizar una inmunotinción para CD117 en los tumores mesenquimales que surjan en estos territorios. Sin embargo, aplicando el criterio central que debe regir la valoración de todos los estudios inmunohistoquímicos, el resultado con éste y los demás anticuerpos utilizados debe ser evaluado juiciosamente, es decir, debe ser integrado en el conjunto de los datos clínico-patológicos disponibles y no debe contradecirlos de manera flagrante.

El primer anticuerpo que mostró cierta utilidad práctica en el diagnóstico del GIST fue el CD34 (Mikhael *et al.*, 1994, Miettinen *et al.*, 1995), el antígeno de las células progenitoras hematopoyéticas que también se expresa en las células endoteliales y en algunos fibroblastos. Pero, tras el entusiasmo inicial, se comprobó que su sensibilidad era relativamente baja pues solo se observaba inmunorreactividad en el 60-70% de los GISTs (Miettinen y Lasota, 2000), aunque en un estudio reciente el porcentaje de casos positivos con este marcador se elevó al 91,2% (Hasegawa *et al.*, 2002). Otro inconveniente es su baja especificidad pues se expresa en otros muchos tumores mesenquimales, tales como las neoplasias vasculares, el tumor fibroso solitario, etc. La expresión de CD34 varía ligeramente en función de la localización del tumor, con positividad más frecuente en los GISTs gástricos, esofágicos y rectales (Hasegawa *et al.*, 2002; Miettinen y Lasota, 2001). Es interesante reseñar que la expresión de CD34 parece guardar una relación inversa con la reactividad para actina músculo-específica (AME), es decir, los tumores positivos para AME suelen ser negativos para CD34 (Hasegawa *et al.*, 2002; Miettinen *et al.*, 2000^d).

Aunque entre el 30 y el 40% de los GISTs expresan AME - en particular los tumores localizados en el intestino delgado - la positividad para desmina, el filamento intermedio de las células musculares y que es un marcador mucho más específico de diferenciación muscular, es mucho más infrecuente (2-5% de los casos) y, cuando se detecta, su expresión es muy focal con inmunotinción de un número pequeño de células (Corless *et al.*, 2004; Fletcher *et al.*, 2002^g; Hurlimann y Gardiol, 1991; Miettinen *et al.*, 2000^g). La expresión nuclear y citoplasmática de la proteína S-100 en los GISTs verdaderos también es rara,

observándose en torno al 5% de los tumores.

El h-caldesmán es una proteína asociada al citoesqueleto, y ligada a la actina, que ha demostrado ser un buen marcador de las células musculares lisas y de las neoplasias derivadas de estos elementos. Recientemente se encontró expresión de esta proteína en el 76,6% de los casos de GIST (Hasegawa *et al.*, 2002).

I.1.3.6 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA. Los GISTs muestran características ultraestructurales híbridas entre los tumores miogénicos y los tumores con diferenciación neuronal pero, sea cual sea la línea de diferenciación predominante, ésta es siempre incompleta o abortiva. Erlandson y colaboradores (Erlandson *et al.*, 1996), en la revisión más exhaustiva de la ultraestructura del GIST, mostraron que en la mayoría de estas lesiones predominan unos rasgos morfológicos que sugieren una diferenciación muscular lisa incompleta, esto es, se identifican vesículas pinocíticas, placas densas subplasmalemmales o microfilamentos con aumentos focales de la densidad. En otros tumores, más infrecuentes que los anteriores, parecen dominar las características que implican una línea de diferenciación hacia elementos neurales, observándose procesos citoplasmáticos largos similares a axones, que entran en contacto mutuo a través de uniones celulares primitivas, microtúbulos ocasionales compatibles con neurotúbulos, y gránulos de tipo neurosecretor. Estas lesiones son las que recibieron la denominación de GANT. Habría una tercera categoría de GISTs que muestran una diferenciación dual hacia músculo liso y hacia elementos neurales, sin que se detecte un claro predominio de una sobre otra. Finalmente, un pequeño porcentaje de tumores carece por completo de cualquier evidencia ultraestructural de diferenciación.

En un interesante trabajo (Yantiss *et al.*, 2002), se describe una cierta variación en estas tendencias en función del origen del tumor. Así, en las lesiones gástricas y epiploicas es más común la diferenciación muscular; mientras que en los tumores surgidos del intestino delgado se observan procesos complejos interdigitantes y otros datos morfológicos asociados a una estirpe neuronal. Los GIST colónicos tienden a ser más indiferenciados, con rasgos incompletos de diferenciación miogénica, neuronal o fibroblástica. En conjunto, esta morfología ultraestructural es similar a la de las células intersticiales de Cajal (CIC). Algunos estudios ultraestructurales de los últimos años todavía sostienen, en contra del parecer general, la existencia del GANT como entidad diferente y distinguible del GIST (Eyden *et al.*,

2002).

I.1.3.7 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL. Del amplio espectro de cuadros histopatológicos posibles en el GIST se deduce que el diagnóstico diferencial será igualmente amplio y complejo. Como es natural, las alternativas habituales al diagnóstico de GIST - sobre todo cuando es de tipo fusocelular - son los otros dos grandes tipos de neoplasias mesenquimales que pueden asentar en el tubo digestivo: los tumores de músculo liso y los tumores de estirpe schwanniana. Los leiomiomas sólo son claramente más frecuentes que los GISTs en los dos extremos del tubo digestivo, es decir, en el esófago y entre las lesiones colorrectales dependientes de la *muscularis mucosae* (Miettinen *et al.*, 2001^b), son muy raros en el estómago y virtualmente inexistentes en el intestino delgado. Estos tumores suelen mostrar una densidad celular menor, con un patrón fasciculado mejor definido, citoplasmas fibrilares intensamente eosinófilos y núcleos elongados de extremos romos. Aunque los núcleos suelen ser bastante uniformes, no es extraño ver ejemplos con un pleomorfismo e hiper cromatismo nuclear llamativo, presente en los leiomiomas benignos denominados "bizarros". Los infrecuentes leiomiosarcomas del tubo digestivo son tumores de características morfológicas obviamente malignas, de alto grado histológico y con numerosas figuras de mitosis, rasgos poco comunes en la mayoría de los GISTs. En lo que atañe al estudio inmunohistoquímico, prácticamente todos los leiomiomas - y los leiomiosarcomas - expresan contundentemente la desmina y la AME, y son siempre negativos para CD117.

Los muy infrecuentes schwannomas surgidos a partir de la pared del tubo digestivo, descritos sobre todo en el estómago (Daimaru *et al.*, 1988; Prevot *et al.*, 1999; Sarlomo-Rikala y Miettinen, 1995) y en el colon-recto (Miettinen *et al.*, 2001^c), pueden mostrar un patrón fusocelular, epitelioido o plexiforme. Los rasgos de valor diagnóstico son la existencia en los schwannomas de un manto linfoide periférico y/o un infiltrado linfoide difuso, una mayor heterogeneidad celular que en los GISTs, una atipia nuclear focal, y un patrón microtrabecular igualmente focal. El schwannoma suele expresar la Proteína Glial Fibrilar Ácida (*Glial Fibrillary Acidic Protein*, GFAP), además de la S-100.

Otros tumores implicados en el diagnóstico diferencial son el tumor fibroso solitario, la fibromatosis, el tumor fibroide inflamatorio y el tumor glómico. El tumor fibroso solitario es susceptible de llevar a errores diagnósticos porque también suele expresar CD34; sin embargo, su colagenización intensa y frecuente patrón hemangiopericitoide deben facilitar su

identificación además de, naturalmente, su negatividad para CD117 (Shidham *et al.*, 2002). Con la fibromatosis (tumor desmoide) mesentérica los problemas pueden ser incluso mayores porque estas lesiones tienen la capacidad de infiltrar la pared del tubo digestivo, entrando en contacto con la muscular propia como sucede en el GIST, y también se tiñen con frecuencia con CD117 (Lucas *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 2004; Yantiss *et al.*, 2000). De nuevo, la abundancia relativa de colágeno, el patrón fasciculado más definido, las células más elongadas - con núcleos de extremos afilados - o bien de contornos estrellados, y el infiltrado linfocitario perivascular son características de la fibromatosis que no suelen verse en el GIST. Además, el patrón de tinción con CD117 en la fibromatosis es puramente citoplasmático y débil, mientras que en el GIST la tinción es más intensa y extensa, con un fuerte componente de membrana (Rosai, 2004). Los estudios genéticos realizados en las fibromatosis han demostrado la frecuente existencia de mutaciones en el gen *APC* - de la poliposis colónica familiar (Alman *et al.*, 1997) - o en el gen que codifica la β -catenina (Tejpar *et al.*, 1999), con la consecuencia de una acumulación de β -catenina en las células tumorales. Esta acumulación puede ser detectada por métodos inmunohistoquímicos y ya se exploró su rendimiento en el diagnóstico diferencial de las fibromatosis mesentéricas, respecto al GIST y a la mesenteritis esclerosante, comprobándose que la tinción para β -catenina, con una expresión nuclear intensa, es exclusiva de las fibromatosis (Montgomery *et al.*, 2002). El tumor fibroide inflamatorio suele presentarse como una masa polipoide submucosa en el estómago distal o en el intestino y, microscópicamente, muestran una abundante matriz mixoide con células estrelladas o fusiformes y con un infiltrado inflamatorio rico en eosinófilos. Aunque también puede expresar CD34, siempre es negativo para CD117.

Otras entidades que deben incluirse en este diagnóstico diferencial del GIST fusocelular son el tumor miofibroblástico inflamatorio, y su variante más celular y atípica denominada fibrosarcoma inflamatorio, que son lesiones fusocelulares con infiltrado linfoplasmocitario que muestran focalmente células grandes con citoplasmas amplios y núcleos con nucleolos prominentes.

El tumor gastrointestinal de nervio autonómico (GANT), que en otro tiempo se pudo considerar una alternativa en el diagnóstico diferencial del GIST, se sabe hoy que no es más que una variante ultraestructural del GIST (Lee *et al.*, 2001; Schmid y Wegmann, 2000).

Los GISTs epitelioides suscitan otros diagnósticos diferenciales, tales como el melanoma metastático que puede presentarse como una lesión polipoide submucosa o una masa transmural grande. Algunos de estos casos excepcionales sólo podrán resolverse con la

ayuda de las inmunotinciones para algunos de los marcadores característicos del melanoma: HMB-45, Melan-A, etc. También pueden confundirse con carcinomas indiferenciados o con tumores neuroendocrinos, aunque esto es más improbable por los patrones diferentes de crecimiento.

El estudio inmunohistoquímico - y en particular la disponibilidad de un marcador con la sensibilidad y especificidad del CD117 - ha resuelto parcialmente los problemas diagnósticos en el GIST. En la **Tabla 1** se expone el perfil inmunofenotípico de las principales neoplasias mesenquimales del tubo digestivo involucradas en el diagnóstico diferencial, con el panel de marcadores más ampliamente utilizados.

	KIT (CD117)	CD34	AME	DESMINA	S-100	β-CATENINA
GIST	+	+ (60-70%)	+ (30-40%)	Casi nunca	Raro (5%)	-
Tumor músculo liso	-	+ (10-15%)	+	+	Raro	-
Schwannoma	-	+ (Antoni B)	-	-	+	-
Fibromatosis	-/+	-	+ (40%)	+/-	-	+ (nuclear)

TABLA 1. Diagnóstico diferencial de los tumores fusocelulares del tracto gastrointestinal. Estudio inmunohistoquímico (modificado parcialmente a partir de Ftecher CDM et al. Hum Pathol 2002; 33: 459).

Recientemente se ha comunicado la existencia de un nuevo anticuerpo policlonal, todavía no comercializado, dirigido contra una proteína que se denomina DOG1, pretendidamente específica de los GISTs (West *et al.*, 2004). Esta proteína fue sintetizada a partir de un cADN (gen FLJ10261) expresado por todos los GISTs estudiados mediante *microarrays* de expresión. Los autores afirman que la tinción inmunohistoquímica para DOG1 fue positiva en el 97,8% de los GIST evaluados, incluidos los casos con mutaciones en *PDGFRA* y que, por tanto, eran negativos para CD117. La inmunotinción, aparte de su alta sensibilidad, fue también muy específica pues solo se detectó en 4 de 438 tumores no GIST.

Otro marcador de gran interés y potencial uso diagnóstico es la proteín-quinasa C *theta* (PKCθ), una proteína implicada en la señalización intermedia intracelular, para la que

se han obtenido anticuerpos utilizables en estudios inmunohistoquímicos (Blay *et al.*, 2004). La PKC θ está incrementada en todos los GISTs evaluados, incluidos los mutantes en *PDGFRA* y los que no expresan CD117 (Duensing *et al.*, 2004^a).

I.1.3.8 HISTOGÉNESIS. Hace ya algunos años, en 1992, se comprobó que el receptor KIT es indispensable para el desarrollo del sistema marcapasos gastrointestinal, pues los ratones carentes de esta proteína (ratones mutantes W) mostraban profundas alteraciones en la motilidad intestinal (Maeda *et al.*, 1992), pero todavía en ese momento no se conocía con certeza la célula en la que reside esta función. Posteriormente, pudo establecerse que este papel fisiológico corresponde a unas células peculiares del tubo digestivo descritas hace más de un siglo por Don Santiago Ramón y Cajal: las hoy conocidas como células intersticiales de Cajal (CIC) (Huizinga *et al.*, 1995; Sanders, 1996). Las CIC forman una red intrincada en la pared del trato gastrointestinal y se sitúan entre los elementos del sistema nervioso autónomo, en particular en el plexo mientérico, y las células musculares lisas facilitando la comunicación de señales entre uno y otro. Las CIC parecen derivar de células mesenquimales primitivas, que pueden diferenciarse en músculo liso o en CIC maduras; para que suceda esto último es imprescindible la expresión de KIT (Sanders, 1996). Como ya se dijo, la anulación funcional de KIT en ratones - por alteración genética o por medio de anticuerpos específicos - conduce a la ausencia de un compartimento de CIC en el tubo digestivo, manifestada a través de una aperistalsis, además de otras alteraciones tales como manchas amelánicas cutáneas por trastornos en el desarrollo de los melanocitos (Huizinga *et al.*, 1995; Maeda *et al.*, 1992; Sanders, 1996).

Todas las CIC expresan inmunohistoquímicamente CD117 y, al menos una subpoblación de las mismas, coexpresan CD34 (Robinson *et al.*, 2000). Por otra parte, los rasgos ultraestructurales de las CIC y de los GIST muestran claras semejanzas. Todos estos datos llevaron a Kindblom y colaboradores (Kindblom *et al.*, 1998) a sugerir que los GISTs son en realidad tumores surgidos a partir de la CIC y, en consecuencia, propusieron la nueva denominación de tumor de la célula marcapasos gastrointestinal (*gastrointestinal pacemaker cell tumor* - GIPACT) para estas lesiones. Basándose en los mismos datos, otros autores sugieren sustituir la denominación GIST por la más directa de "tumor de células intersticiales de Cajal" (Sircar *et al.*, 1999).

Pero probablemente sea un error identificar la diferenciación de una neoplasia como

un punto de partida y no como un punto de llegada, y parece más prudente asumir que la innegable similitud entre las CIC y las células neoplásicas del GIST no es la evidencia de una histogénesis. La hipótesis vigente actualmente es que los GISTs se originan a partir de células primitivas (*stem cells*) CD34 positivas que se sitúan en la pared del tubo digestivo, y que se diferencian - en un proceso mediado por la activación constitutiva de la función tirosín-quinasa de KIT - para adquirir un fenotipo de CIC (Wang L *et al.*, 2000, Sircar *et al.*, 1999). Además, en modelos experimentales animales se ha determinado que las CIC se diferencian a partir de una célula primitiva, precursor compartido con las células musculares lisas (Miettinen *et al.*, 1999^c).

Juan Rosai defiende una explicación histogenética incluso más abierta, y considera que los GISTs muestran, a nivel neoplásico, el potencial funcional y fenotípico de las células estromales primitivas normales, en el sentido de que algunas se diferencian hacia una función contráctil primaria y otras hacia una función transmisora de tipo neural (marcapasos) como la CIC. Los tumores que siguen la primera vía tendrán un sesgo de diferenciación muscular lisa, mientras que en los segundos existirá un predominio de los rasgos neurales (Rosai, 2004).

En un estudio reciente, se afirma que las CIC nunca expresan CD34 y la reactividad para este marcador reside realmente en unos fibroblastos especiales muy próximos a las CIC, pero distintos de éstas (Vanderwinden *et al.*, 1999), postulando la existencia de vínculos histogenéticos entre estas células y el GIST. Otro trabajo en el mismo sentido investiga la presencia de nestina en los GISTs y en las CIC, comprobando que se expresa en estos dos ámbitos (Tsujiura *et al.*, 2001). La nestina es un filamento intermedio propio de células inmaduras (células *stem* neuroectodérmicas, células progenitoras del músculo esquelético). También se han descrito células en el epiplon - situadas inmediatamente debajo del revestimiento mesotelial - que coexpresan CD117, CD34 y SMemb (miosina de cadena pesada del músculo liso); un fenotipo del que afirman que es idéntico al de las CIC (Sakurai *et al.*, 2001). Estas células serían uno de los posibles candidatos a ser el origen de los misteriosos GISTs no vinculados al tubo digestivo (Miettinen *et al.*, 1999^a; Reich *et al.*, 1999; Yamamoto *et al.*, 2004).

I.1.4 PATOLOGÍA MOLECULAR DEL GIST

I.1.4.1 EL PROTO-ONCOGEN *c-kit* Y LA PROTEÍNA KIT. El proto-oncogén *c-kit* se localiza en el cromosoma 4 (4q11-12) y codifica una proteína denominada KIT con función de receptor tirosín-quinasa tipo III, englobada en la familia supergenética de las inmunoglobulinas (Yarden *et al.*, 1987). KIT es una proteína transmembranosa de 135 kilodalton y 976 aminoácidos, cuyo dominio extracelular (497 aminoácidos) tiene cinco regiones tipo inmunoglobulina, el dominio transmembrana está compuesto por 23 aminoácidos, y en el dominio intracelular o citoplasmático (456 aminoácidos) reside la función tirosín-quinasa (TQ) y tiene un *pocket* para el adenosín-trifosfato (ATP). La porción receptora extracelular se combina con un ligando denominado factor de Steel, factor de crecimiento de mastocitos o *stem-cell factor* (Williams *et al.*, 1990).

La estructura de KIT es muy similar a otros receptores TQ, como el receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas α (PDGFRA). La activación de KIT tiene lugar en condiciones fisiológicas cuando dos receptores adyacentes interaccionan al unirse simultáneamente a un dímero del ligando. Este proceso, denominado homodimerización, conduce a la autofosforilación de residuos de tirosina de la porción intracelular del propio KIT, y a la fosforilación de otras proteínas, que conjuntamente intervienen en una intrincada cascada de señales celulares implicadas en funciones tales como la proliferación, adhesión, apoptosis y diferenciación (Heinrich *et al.*, 2002). La expresión de KIT es fundamental para el desarrollo de las células madre hematopoyéticas, los mastocitos, los melanocitos, las células germinales y las CIC (Gibson y Cooper, 2002).

La mayoría de los GISTs muestran una activación permanente o constitutiva de KIT, es decir, la mutación en el gen conduce a su dimerización espontánea, independiente de la unión al ligando, con la consiguiente activación de la función TQ (Hirota *et al.*, 1998). Estas mutaciones activadoras de KIT parecen jugar un papel central en la oncogénesis del GIST, y puede ser el primer acontecimiento genético en este proceso.

De hecho, se han descrito algunas familias con mutaciones en línea germinal en el gen *c-kit* que desarrollan hiperplasia de las CIC y múltiples GISTs, con o sin mastocitosis cutánea (urticaria pigmentaria) y trastornos pigmentarios cutáneos (Hirota *et al.*, 2000; Maeyama *et al.*, 2001; Nishida *et al.*, 1998, O'Brien *et al.*, 1999). En estos síndromes, los

GISTs no suelen ser clínicamente relevantes hasta la cuarta o quinta década de vida, lo que sugiere que la activación de KIT es suficiente para provocar la hiperplasia de CIC, mientras que son necesarios acontecimientos moleculares adicionales, probablemente en otros genes, para causar el verdadero crecimiento neoplásico localizado del GIST. Del mismo modo, hay numerosas pruebas de que las mutaciones en *c-kit* preceden a las demás alteraciones citogenéticas en el origen del GIST, entre ellas el hallazgo de que estas otras aberraciones cromosómicas típicas, tales como las deleciones en 14q o 22q, cuando se estudian por cariotipo o hibridación in situ por fluorescencia (FISH), afectan a una porción de las células tumorales, mientras que la mutación en *c-kit* es universal (Heinrich *et al.*, 2002).

A pesar de que existe un amplio consenso en torno al papel central jugado por la activación de KIT en el GIST, había grandes variaciones en la frecuencia de las diferentes mutaciones en *c-kit* en los primeros estudios realizados, con cifras que oscilaban desde el 21% al 92% de los GISTs evaluados, en trabajos que empleaban la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) seguida de secuenciación (Hou *et al.*, 2004; Kim TW *et al.*, 2004; Koon *et al.*, 2004; Lasota *et al.*, 1999; Rubin *et al.*, 2001; Singer *et al.*, 2002; Taniguchi *et al.*, 1999). Esta amplia gama de resultados se debía a que en algunas series (Lasota *et al.*, 1999) se secuenció tan solo un segmento del exón 11 que codifica el dominio yuxtamembranoso de KIT, y que es un verdadero *hot-spot* mutacional, pero hay al menos otros tres dominios en KIT (exones 9, 13 y 17) con un número sustancial de mutaciones activadoras. Uno de estos trabajos (Rubin *et al.*, 2001), en los que se estudiaron 48 casos de GIST por secuenciación sistemática de todo el gen *c-kit*, demostró la presencia de mutaciones en 44 de estos tumores (92%), con afectación del dominio yuxtamembrana (exón 11) en 34 casos (71%). Además, en todos ellos, incluidos los cuatro tumores sin mutación detectada, se detectó activación bioquímica de KIT.

El tipo de alteración genética en *c-kit* corresponde con mayor frecuencia a una deleción *in-frame*, siendo más rara la verdadera mutación puntual de una sola base del ADN (Lasota *et al.*, 1999). Por otra parte, parece que la mutación puntual se correlaciona con un pronóstico mejor de la neoplasia que en aquellos tumores en los que existe una alteración que, como la deleción *in-frame*, implica a muchos aminoácidos de la proteína (Singer *et al.*, 2002).

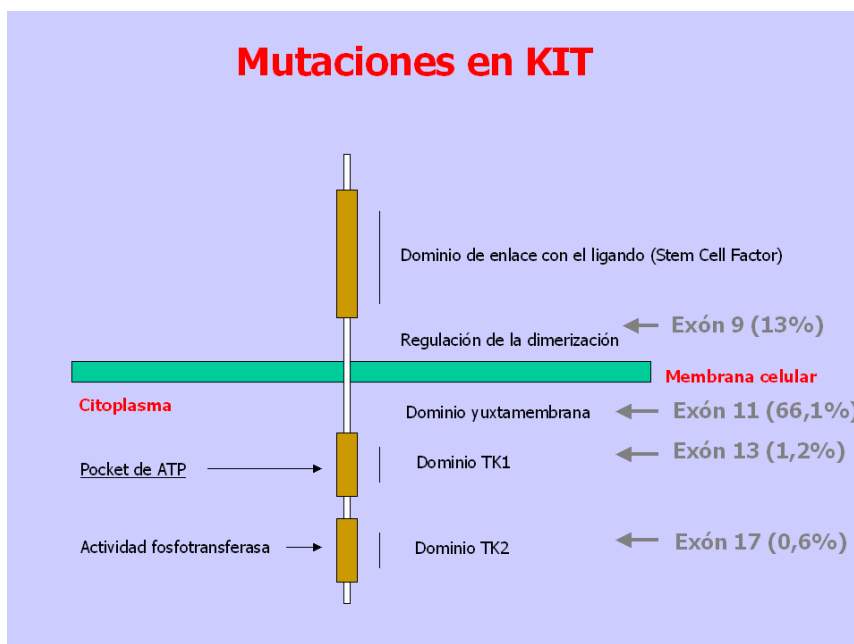


FIGURA 2. Esquema de la estructura del receptor KIT, con señalización de los puntos en los que aparecen mutaciones en los GISTs.

Con la progresiva sistematización del estudio mutacional en los GISTs, hoy ya se conocen más pormenorizadamente las alteraciones moleculares que subyacen en estos tumores (Corless *et al.*, 2004). Así, el porcentaje de tumores que muestran mutaciones en *c-kit* oscila entre el 80 y el 85% de los casos. Cuando se detecta mutación, en el 66,1% de los tumores sucede en el exón 11, el exón 9 es el afectado en el 13%, el exón 13 en el 1,2%, y el exón 17 en el 0,6% de los GISTs (**Figura 2**). Las mutaciones en otro gen que codifica una tirosín-quinasa estructuralmente muy similar, el *PDGFRA*, alternativas a las mutaciones en *c-kit* y mutuamente excluyentes, aparecen en el exón 18 de este gen en el 5,6% de los GISTs, mientras que afectan al exón 12 en el 1,5% de los tumores. Finalmente, el 12% de todos los GISTs carecen de mutaciones en ambos genes (*wild type*), a pesar de realizar una secuenciación completa de los mismos.

1.1.4.2 MECANISMO DE ACTUACIÓN DE KIT. En ausencia del ligando (*stem cell factor*) KIT es un monómero sin actividad TQ. La activación fisiológica acontece cuando dímeros del ligando interaccionan con dos moléculas contiguas de KIT, lo que provoca su

autofosforilación y, consecuentemente, la fosforilación de los sustratos sobre los que actúa la quinasa. Los efectos de la activación de KIT pueden ser modificados por la disponibilidad del sustrato o por la desfosforilación de KIT a través de fosfatasas (Heinrich *et al.*, 2002).

La actividad biológica de KIT parece estar mediada a través de la fosforilación activadora de factores de transcripción tales como MAPK p42/44, AKT, S6K, STAT1 y STAT3 (Duensing *et al.*, 2004^b). Los STATs (*Signal Transducers and Activators of Transcription*), que parecen ser los principales mediadores de la actividad de KIT en condiciones fisiológicas y en los GISTs, son los principales constituyentes de una de las vías más rápidas de señalización intracelular, desde los receptores de superficie al núcleo, donde alteran la transcripción de genes. Los STATs 1, 3 y 5 son los que muestran una relación más directa con la oncogénesis en muchas neoplasias. El STAT1 parece actuar fundamentalmente como un supresor de tumores, induciendo la apoptosis y el bloqueo del crecimiento a través de la activación de las caspasas y del p21^{CIP1}. El STAT3, sobre todo, y el STAT5 tienen, por el contrario, un papel oncogénico. Los genes diana del STAT3, cuya transcripción estimula, son sobre todo genes a partir de los cuales se sintetizan proteínas antiapoptóticas tales como Bcl-xl, Mcl-1 y BCL-2, y genes que producen proteínas asociadas a la proliferación celular como la Ciclina D1 y c-myc (Bromberg, 2002).

I.1.4.3 OTROS EVENTOS GENÉTICO-MOLECULARES. Los estudios iniciales de hibridación genómica comparada en el GIST demostraron, como hallazgo más constante, pérdidas de material genético en la región cromosómica 14q, detectadas en el 75% de los tumores benignos y 62% de los malignos, lo que hizo sugerir a estos autores la posibilidad de que existiera un nuevo gen supresor en esta región implicado en la diferenciación y/o proliferación de células mesenquimales (El-Rifai *et al.*, 1996). Un estudio más reciente, empleando la misma técnica, mostró una media de 2,6 aberraciones en la copia del ADN en los tumores benignos, mientras que el número medio en los malignos fue de 7,5 y en los metastásicos de 9, predominando siempre las pérdidas sobre las ganancias en los benignos, lo que podría ayudar a establecer el pronóstico de estos tumores (El-Rifai *et al.*, 2000).

La aplicación de un *microarray* de expresión con 13.826 cADNs humanos (Allander *et al.*, 2001) ha mostrado, según sus autores, una gran homogeneidad en el patrón de expresión génica de los 13 GIST estudiados, lo que sugiere que el GIST puede representar la expansión clonal de una célula progenitora (CIC) tras la mutación activadora de KIT, con

pocos cambios genéticos adicionales. En otro estudio posterior de diseño similar (Antonescu *et al.*, 2004), los resultados fueron contradictorios con los previos, pues los 24 GISTs investigados fueron heterogéneos en función de su localización, con el hallazgo de diferentes patrones de expresión génica en los tumores surgidos en el estómago respecto a los del intestino delgado.

Como ya se mencionó anteriormente, uno de los más recientes y relevantes descubrimientos en la genética molecular del GIST es la comprobación de la existencia de mutaciones en el gen *PDGFRA* en algunos de estos tumores, en un porcentaje que puede situarse en torno al 5% de todos ellos. En concreto, Heinrich y colaboradores (Heinrich *et al.*, 2003^b) estudiaron 40 tumores que carecían de mutaciones *c-kit* y, en 14 de estos casos (35%), detectaron mutaciones intragénicas activadoras de *PDGFRA*. Las dos posibles mutaciones – en *c-kit* y *PDGFRA* – son mecanismos oncogénicos alternativos y mutuamente excluyentes en el GIST, y ambas conducen a la misma activación de señales intermediarias o a los mismos cambios citogenéticos asociados a la progresión tumoral. En un segundo trabajo, Hirota y colaboradores (Hirota *et al.*, 2003) estudian 8 casos de GISTs sin mutaciones *c-kit* y encuentran dos tipos de mutaciones en el gen *PDGFRA* en 5 de estos tumores. De estas mutaciones, una de ellas responde al imatinib (Val-561 por Asp), mientras que la segunda (Asp-842 por Val) sólo lo hace débilmente.

Es de destacar que un elevado porcentaje de los GISTs portadores de una mutación de *PDGFRA* corresponden al tipo histológico epitelioides (Debiec-Rychter *et al.*, 2004^b), lo que encaja con la observación realizada previamente en una evaluación de mutaciones de *c-kit* en una serie de GISTs en la que los autores encontraron que los 7 tumores epitelioides estudiados carecían de mutaciones en este gen (Wardelmann *et al.*, 2002). Como es previsible, ninguno de los tumores mutantes en *PDGFRA* expresan CD117 en el estudio inmunohistoquímico. También es probable que, de igual modo que en los GISTs mutantes para *c-kit* la tinción inmunohistoquímica para KIT (CD117) es la norma, en las células neoplásicas de los GISTs con mutaciones en *PDGFRA* se acumule la proteína correspondiente. Sin embargo, los ensayos realizados hasta el momento con los anticuerpos comerciales dirigidos contra *PDGFRA* no han dado unos resultados satisfactorios y reproducibles (Medeiros *et al.*, 2004).

I.1.5 VALORACIÓN PRONÓSTICA DEL GIST

I.1.5.1 FACTORES MORFOLÓGICOS. Los criterios útiles para distinguir los GISTs benignos de los malignos, con o sin una categoría intermedia de tumores de pronóstico indeterminado, han sido objeto de intensas discusiones y controversias a lo largo de los últimos años. En este período de tiempo, se han hecho numerosas propuestas que han dado diferente valor pronóstico a muchos factores clínico-patológicos: localización del tumor, tamaño, actividad mitótica, densidad de la celularidad, grado nuclear, invasión de la mucosa, necrosis, ulceración, etc. De todos ellos, los que han concitado mayor atención han sido el tamaño del tumor y el número de mitosis, y las clasificaciones más ampliamente utilizadas juegan con combinaciones de estos dos parámetros.

Aunque la invasión de la mucosa, la necrosis tumoral, o la alta celularidad han mostrado una asociación estadística relevante con un comportamiento maligno en algunos estudios, la valoración y/o cuantificación de estos rasgos es mucho menos reproducible y no permite establecer un pronóstico en cada situación de caso-individuo, la única que refleja exactamente la realidad clínica (Fletcher *et al.*, 2002^a).

Sin embargo, un problema detectado ya hace años, todavía no resuelto y que provoca una considerable inconsistencia en todas estas clasificaciones de los GISTs en función de su pronóstico, es la existencia de lesiones muy pequeñas (menores de 2 cm de diámetro) o con muy escasas mitosis (menos de 5 por 50 campos de gran aumento) capaces de causar enfermedad metastática (Evans, 1985; Franquemont, 1995). Es sabido que esta incertidumbre es consustancial con el GIST y de ahí la existencia de la ya mencionada categoría no comprometida de lesiones de "potencial maligno indeterminado", cuya amplitud fue variando a lo largo de los años de tal manera que, en algunas propuestas (Rosai, 1996), la mayoría de los tumores podían ser encuadrados en esta categoría. Así, muchos autores rechazan el uso del término "benigno" para referirse al GIST, con la posible excepción de las lesiones muy pequeñas (≤ 1 cm) encontradas casualmente en el curso de una intervención quirúrgica abdominal por otro motivo. Con un seguimiento suficiente, parece claro que cualquier GIST descubierto a través de los síntomas clínicos por él causados tiene la capacidad de comportarse como un tumor maligno, aunque menos del 50% de los GIST primarios y localizados recurrirán en los primeros 5 años de seguimiento (DeMatteo *et al.*, 2000).

Esta situación insatisfactoria ha conducido a múltiples intentos de definición de parámetros más objetivos del comportamiento del GIST, entre ellos los marcadores inmunohistoquímicos de la proliferación celular, ya sea con el *Proliferating Cell Nuclear Antigen* o PCNA (Amin *et al.*, 1993; Franquemont y Frierson, 1995; Ray *et al.*, 1994; Sbasching *et al.*, 1994), o con el Ki67 o MIB-1 (Abdulkader *et al.*, 2002; Emory *et al.*, 1997; Kontogianni *et al.*, 2003; Panizo-Santos *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2002). También se comprobó el grado de validez de la determinación de la ploidía de ADN a través de la citometría de flujo (Cooper *et al.*, 1992; Cunningham *et al.*, 1993; El-Naggar *et al.*, 1989; Kiyabu *et al.*, 1988; Lerma *et al.*, 1994; Tsushima *et al.*, 1987) y el análisis de imagen (Carrillo *et al.*, 1997; Lerma *et al.*, 1994; Rudolph *et al.*, 1998). Aunque la presentación de los resultados es variable, la información pronóstica obtenida en estos estudios no es muy diferente de la procedente de la valoración de los parámetros morfológicos habituales o convencionales, y ninguno ha demostrado ser claramente útil en una situación de caso-individuo.

Hay algunos expertos que todavía hoy mantienen la posibilidad de identificar los GISTs gástricos benignos usando una constelación de características histológicas (Trupiano *et al.*, 2002), pero parece existir un acuerdo general en que es más adecuado establecer un esquema basado en la determinación del riesgo que intentar definir criterios estrictos que separen los tumores benignos de los malignos. De este modo, el Simposio celebrado el año 2002 en torno al GIST, auspiciado por el *National Institute of Health* norteamericano (Berman y O'Leary, 2001; O'Leary y Berman; 2002), ha propuesto un sistema de consenso por el que cada GIST diagnosticado será situado en un nivel de riesgo determinado (muy bajo, bajo, intermedio o alto) en función del tamaño y del número de mitosis (**Tabla 2**), reconociendo que ningún tumor puede ser definitivamente etiquetado como benigno (Fletcher *et al.*, 2002^a).

Aunque este esquema goza de una más amplia aceptación en la actualidad, en otro artículo publicado como conclusiones del mismo *GIST Symposium*, Miettinen y colaboradores proponen una clasificación pronóstica ligeramente diferente de estos tumores (**Tabla 3**), que tiene en cuenta la aparente tendencia de los tumores intestinales a ser más agresivos que los gástricos (Miettinen *et al.*, 2002^a), diferencia de comportamiento ya constatada en series anteriores (Ueyama *et al.*, 1992).

	TAMAÑO	MITOSIS
Riesgo muy bajo	<2 cm	<5/50 CGA
Riesgo bajo	2-5 cm	<5/50 CGA
Riesgo intermedio	<5 cm	6-10/50 CGA
	5-10 cm	<5/50 CGA
Riesgo alto	>5 cm	>5/50 CGA
	>10 cm	Cualquier tasa mitótica
	Cualquier tamaño	>10/50 CGA

CGA = Campo de gran aumento

TABLA 2. Determinación del riesgo de comportamiento agresivo en el GIST (Fletcher CDM et al. Hum Pathol 2002; 33: 459).

En la era pre-imatinib, la supervivencia a 5 años de los GISTs presumiblemente malignos variaba mucho según las series publicadas, con cifras que oscilaban entre el 28 y el 80%, y la supervivencia media de los pacientes en los que la resección completa del tumor fue imposible se situaba en 10-23 meses (Conlon *et al.*, 1995; DeMatteo *et al.*, 2000; Pithorecky *et al.*, 2000). Las pautas de quimioterapia ensayadas en el tratamiento del GIST maligno han sido básicamente ineficaces pues, aunque con regímenes basados en la antraciclina se ha logrado una tasa de respuesta del 10 al 30% en otros sarcomas de partes blandas, en el caso del GIST la tasa de respuesta referida es del 0-5% (DeMatteo *et al.*, 2000). La radioterapia no ha mostrado ningún beneficio en el tratamiento del GIST, además de que es perjudicial para los órganos abdominales próximos, inevitablemente radiados.

Al margen de los ya mencionados datos del tamaño del tumor y número de mitosis, otros parámetros clínico-patológicos pueden tener trascendencia pronóstica en el GIST tales como la localización u órgano en el que asienta. Los GISTs pequeños, habitualmente benignos y encontrados de modo casual, son más frecuentes en el estómago y en el recto que en el colon e intestino delgado, lo que solo en parte puede ser atribuido a la mayor accesibilidad a la endoscopia del estómago y recto. Lo que parece cierto es que, a igualdad de tamaño y número de mitosis, el pronóstico es mejor en los tumores gástricos que en los del intestino delgado (Miettinen *et al.*, 2002^a).

Probablemente benigno

Tumores intestinales: Diámetro máximo ≤ 2 cm y $<$ de 5 M/CGA

Tumores gástricos: Diámetro máximo ≤ 5 cm y $<$ 5 M/CGA

Probablemente maligno

Tumores intestinales: Diámetro máximo > 5 cm o > 5 M/CGA

Tumores gástricos: Diámetro máximo > 10 cm o > 5 M/CGA

Potencial maligno bajo o indeterminado

Tumores intestinales: Diámetro máximo > 2 cm pero ≤ 5 cm y $<$ 5 M/CGA

Tumores gástricos: Diámetro máximo > 5 cm pero ≤ 10 cm y $<$ 5 M/CGA

M/CGA = mitosis por 50 campos de gran aumento.

TABLA 3. Guía para la evaluación de malignidad del GIST (Miettinen M et al. Hum Pathol 2002; 33: 478).

La mayoría de los tumores mesenquimales esofágicos son leiomiomas benignos, pero los escasos GISTs verdaderos descubiertos en el esófago suelen ser malignos (Miettinen *et al.*, 2000^b). Los GISTs localizados en el intestino delgado y duodeno son más frecuentemente agresivos (Bucher *et al.*, 2004; Miettinen *et al.*, 2003), alcanzando un porcentaje del 64% de tumores malignos (25 de 39 lesiones) en una serie (Brainard y Goldblum, 1997). El bajo número de GISTs colónicos impide realizar análisis estadísticos, pero parecen ser benignos respecto a malignos en una proporción también de 1:2 (Miettinen *et al.*, 2000^c). Los escasos GISTs apendiculares descritos fueron hallazgos casuales, y todos ellos han sido benignos (Miettinen y Sobin, 2001). En el recto - la tercera localización más frecuente de los GISTs tras el estómago y el intestino delgado - los tumores parecen mostrar un comportamiento intermedio entre los gástricos y los del intestino delgado (Miettinen *et al.*, 2001^a). Los GISTs no vinculados directamente al tubo digestivo, que asientan en el epiplon, mesenterio u otros tejidos blandos abdominales y retroperitoneales, mostraron en una serie reciente (Reith *et al.*, 1999) un porcentaje de malignidad del 39%, aunque es probable que esta estimación subestime los casos agresivos porque el seguimiento era limitado.

La valoración de la densidad celular es un rasgo difícil de objetivar y la atipia nuclear marcada es muy inhabitual en el GIST, por lo que el significado de estos factores no está claro (Miettinen *et al.*, 2002^a). Lo que sí parece ser un marcador de los tumores malignos es la invasión de la mucosa, con presencia de células neoplásicas entre las glándulas, pero es

tan infrecuente que su utilidad práctica es muy limitada (Brainard y Goldblum, 1997). La invasión de la mucosa es diferente de la ulceración de la mucosa, que sí es muy frecuente y puede producir clínica de sangrado, pero que no tiene valor pronóstico.

Debe hacerse constar que la disponibilidad de un nuevo fármaco como el Glivec (mesilato de imatinib), de eficacia probada en el tratamiento del GIST metastático o recidivante (Dagher *et al.*, 2002) y actualmente en estudio como tratamiento adyuvante del GIST primario con datos de mal pronóstico (Brumming *et al.*, 2003; Eisenberg y Judson, 2004), puede desplazar el foco desde la predicción del comportamiento de la lesión hacia la selección adecuada de pacientes susceptibles de ser tratados con esta terapia.

I.1.5.2 INMUNOHISTOQUÍMICA Y PRONÓSTICO. Las inmunotinciones para CD34 y CD117 son extraordinariamente útiles en el proceso diagnóstico del GIST y, al menos en el caso del CD117, probablemente indispensable. No obstante, ni la extensión ni la intensidad de la expresión de estos marcadores aporta información de valor pronóstico (Fletcher *et al.*, 2002^a). Dado que la tinción con CD117 tiende a emplearse en la selección de los pacientes susceptibles de ser tratados con imatinib cabe esperar que, sólo en este sentido, su expresión repercuta sobre el pronóstico del tumor.

Los marcadores de la actividad proliferativa celular, en particular los dirigidos a los epitopos de Ki67 resistentes a la fijación formólica e inclusión en parafina (MIB-1), han demostrado ser eficaces en la evaluación pronóstica de tumores de diferentes orígenes. En el caso de los GISTs los resultados han sido contradictorios y, mientras que en algunos estudios los tumores con un porcentaje de núcleos teñidos del 10% o superior demostraron una mayor tendencia a un comportamiento agresivo estadísticamente significativa (Panizo-Santos *et al.*, 2000; Rudolph *et al.*, 1998), en otros estudios el índice de proliferación MIB-1 no aportó una información adicional a la obtenida a partir de los métodos clásicos tales como la contabilización directa del número de mitosis (Goldblum y Appelman, 1995).

I.1.5.3 MUTACIONES Y PRONÓSTICO. Los primeros trabajos que abordaron de una forma sistemática la determinación en los GISTs del status mutacional en *c-kit* por PCR y secuenciación, con o sin un paso intermedio de *screening* por *single strand conformation polymorphism* (SSCP), se inclinaron casi unánimemente a considerar que los tumores con

mutaciones tendían a ser malignos (Lasota *et al.*, 1999; Taniguchi *et al.*, 1999). Sin embargo, pronto surgieron voces discrepantes y así, Rubin y colaboradores (Rubin *et al.*, 2001; Singer *et al.*, 2002), estudian 48 casos de GIST y encuentran mutaciones en 44 (92%) y, de ellas, 34 afectan al exón 11 que codifica el dominio yuxta-membrana. Estos autores no encuentran diferencias globales entre el comportamiento de los GISTs con mutaciones y los tumores que carecen de ellas, aunque sí perciben diferencias dentro del grupo de lesiones con mutación dependiendo del exón afecto y del tipo de alteración (delección *in frame* vs. mutación puntual). Andersson y colaboradores (Andersson *et al.*, 2002) también afirman que el vínculo entre las mutaciones en *c-kit* y el comportamiento es mucho más complejo de lo sospechado, y un fenotipo maligno puede adquirirse sin mutación, y múltiples mutaciones pueden aparecer en tumores benignos. Corless y colaboradores, en un trabajo muy elegante (Corless *et al.*, 2002), estudian la situación mutacional de 13 GISTs que medían entre 4 y 10 mm. de diámetro, todos ellos con inmunotinción positiva para CD117. En 11 de estos tumores encuentran mutaciones en *c-kit* (10 en el exón 11 y uno en el exón 9). Estos resultados son una refutación contundente de la hipótesis de que los tumores mutantes son más agresivos, aunque todavía se publican series que defienden esta suposición (Hou *et al.*, 2004; Kim TW *et al.*, 2004; Koon *et al.*, 2004).

Hoy, con el descubrimiento adicional de que existen GISTs con mutaciones en el gen *PDGFRA* (Heinrich *et al.*, 2003^b; Hirota *et al.*, 2003), parece más claro que el status mutacional en el GIST no guarda relación directa con el pronóstico del tumor en el momento del diagnóstico. Sin embargo, sí se ha comprobado que, en aquellos pacientes que por el hecho de tener tumores recidivantes o metastásicos deben entrar en protocolos de tratamiento con imatinib, la mutación subyacente – si existe – tendrá una gran relevancia sobre la respuesta al tratamiento (Debiec-Rytcher *et al.*, 2004^a; Heinrich *et al.*, 2003^a). En una serie (Debiec-Rytcher *et al.*, 2004^a), los pacientes con GISTs que presentan mutaciones en el exón 11 de *c-kit*, la tasa de remisiones parciales tras la administración de imatinib es mayor (83%) que en los que existe otra mutación (23%). En una segunda serie (Heinrich *et al.*, 2003^a), el porcentaje de respuestas parciales con mutación en el exón 11 de *c-kit* fue del 83,5%, del 47,8% si se sitúa en el exón 9, y no hubo ninguna respuesta en ausencia de mutaciones. El número de pacientes con mutaciones en *PDGFRA* fue demasiado bajo para alcanzar conclusiones.

Por lo tanto, la subclasificación molecular del GIST no influye directamente en el pronóstico, pero sí lo puede hacer indirectamente, a través de la identificación de los pacientes con riesgo de fallo en el tratamiento con imatinib.

I.1.5.4 UNA RÁPIDA REVISIÓN DEL CICLO CELULAR. PROTEÍNAS DEL CICLO CELULAR Y PRONÓSTICO DEL GIST. El equilibrio fisiológico entre proliferación y muerte celular es un mecanismo extraordinariamente complejo, aunque cada vez mejor comprendido. Una o más alteraciones en este delicado balance, en el que intervienen muchos genes y sus productos proteicos, es un fenómeno universal en la neoplasia. El desarrollo de los tumores puede deberse a una inhibición de la apoptosis o muerte celular programada, con el consiguiente incremento en la supervivencia celular. Un segundo mecanismo, observado más frecuentemente que el anterior y no incompatible con el mismo, es la aceleración de la actividad proliferativa como consecuencia de la desregulación de genes con funciones controladoras del ciclo celular. Estos genes alterados son, con especial frecuencia, los llamados genes supresores de tumores (p53, p16 o p27) pues su función fisiológica es inhibir la entrada de las células en las fases activas del ciclo celular o inducir la apoptosis, sobre todo cuando los mecanismos de supervisión de la replicación del ADN registran la existencia de fallos (Bury y Cross, 2003).

Las células con capacidad de dividirse entran, de 2 a 3 horas antes de la transición de fase G1/S, en el llamado "punto de restricción", a partir del cual la división progresará, independientemente de que los estímulos externos o internos que indujeron la proliferación permanezcan o desaparezcan. Pero una vez que se supera el punto de restricción, hay diferentes mecanismos que controlan la síntesis de ADN y la buena marcha de la mitosis en puntos cruciales del proceso, los llamados "puntos de chequeo" (*checkpoints*) (Sherr, 2000). El más importante *checkpoint* es la detección, con la consiguiente reparación si es posible, de los errores de replicación del ADN y en este proceso juega un papel fundamental la proteína supresora de tumores p53 (Bury y Cross, 2003; Sherr, 2000). A pesar de la naturaleza heterogénea de los múltiples efectores que participan en las rutas moleculares implicadas en el ciclo celular, la mayoría de estas proteínas pertenecen a tres familias: las quinasas ciclin-dependientes (CDKs), las ciclinas, y los inhibidores de las quinasas ciclin-dependientes (CDKIs) (Bury y Cross, 2003; Sánchez-Beato *et al.*, 2003). Los miembros fundamentales de estas familias de mediadores pueden verse en la **Tabla 4**.

De las más de 10 CDKs existentes en los mamíferos, las que parecen jugar un papel relevante en el control del ciclo celular son las CDKs 1, 2, 4 y 6. La CDK1 (también denominada *cdc2*) es responsable del inicio de la mitosis y, por tanto, de la transición G2/M, mientras que las otras tres CDKs están implicadas en el paso a través del punto de

restricción G1/S.

CDK	Ciclina activadora	CDKI
CDK 1	Ciclina B	
CDK 2	Ciclina A, Ciclina E	CIP/KIP
CDK 4	Ciclina D	CIP/KIP, INK4
CDK 6	Ciclina D	CIP/KIP

TABLA 4. Relación funcional de las principales quinasas ciclina-dependientes (CDK), ciclinas e inhibidores de las quinasas (CDKI).

Como su nombre indica, la actividad de las CDKs depende de su asociación con un miembro de la familia de las ciclinas. Hay cuatro ciclinas – A, B, C y D – en los vertebrados. Mientras que la expresión de CDKs y ciclinas no cambia entre los diferentes tipos de tejidos y células, la expresión de CDKIs es frecuentemente específica de los tejidos. Hay dos familias de CDKIs: los inhibidores de CDK4 (INK4), que comprende p16^{INK4a}, p18 y p19, y que compiten con la ciclina D para ligarse a la subunidad reguladora de la CDK4 con el resultado final de su inhibición; y la familia CIP/KIP formada por p21^{CIP1}, p27^{KIP1} y p57^{KIP2}. La p21^{CIP1} está implicada en el bloqueo del ciclo celular en respuesta al daño del ADN detectado por p53, mientras que los niveles de p27^{KIP1} se incrementan en respuesta a diferentes señales anti-mitóticas, tales como la inhibición por contacto y el TGF-β. Los niveles de ciclinas y CDKIs y, por tanto, sus efectos últimos sobre el ciclo celular, dependen de dos procesos: su transcripción y su degradación proteolítica. En la proteólisis de los inhibidores participa de modo destacado la ubiquitina (Bury y Cross, 2003; Ortega *et al.*, 2000).

El punto de restricción y la consiguiente transición entre las fases G1 y S del ciclo celular se regula a través de tres diferentes rutas moleculares, aunque naturalmente interrelacionadas, que están más o menos alteradas en prácticamente todos los tumores agresivos y que están representadas por las proteínas p16^{INK4a}-ciclina D-CDK4/6-Rb, p14^{ARF}-MDM2-p53-p21^{CIP1}, y p27^{KIP1}-ciclina E-CDK2 (Sherr, 2000).

El papel de las alteraciones del gen que codifica p16 en el comportamiento del GIST y, más específicamente, condicionando la progresión de estos tumores desde la mutación

inicial en *c-kit* hasta llegar a convertirse en una neoplasia abiertamente maligna, ha cobrado un creciente interés en los últimos tiempos (Schneider-Stock *et al.*, 2003; Ricci *et al.*, 2004). Se postula que la metilación del promotor de este gen, que tiene una función supresora de tumores, o bien su delección en el cromosoma 9, eliminaría el freno a la proliferación celular que supone la actividad de esta proteína cuando actúa sobre la ruta ciclina D-CDK4/6/INK4/Rb/E2F del ciclo celular (Ortega *et al.*, 2002). Estas alteraciones en el gen p16 se traducen en una disminución cuantificable de la expresión inmunohistoquímica de la proteína correspondiente en los GIST de comportamiento maligno (Schneider-Stock *et al.*, 2003; Ricci *et al.*, 2004). En nuestro estudio no hemos podido utilizar este marcador por no disponer de un anticuerpo comercial fiable cuando comenzamos el trabajo, pero un editorial reciente recomienda ser cauteloso antes de incorporar la evaluación inmunohistoquímica de p16 al estudio de rutina en los GIST sin que exista un consenso previo en torno a la calidad de los anticuerpos disponibles, las condiciones técnicas de la tinción y los esquemas de cuantificación de la expresión (Corless, 2004).

La ciclina D1 es un importante regulador positivo en la progresión de la fase G1 del ciclo celular a la fase S, mientras que la proteína del retinoblastoma (pRb) inhibe esta transición. Bajo condiciones de estímulo mitogénico, la acumulación de ciclinas de tipo D permite la formación de complejos CDK4/6-ciclina D, que fosforilan e inactivan pRb, con la consiguiente entrada de la célula en el punto de restricción. Un nivel adicional de regulación es aportado por los INK4, entre los cuales el más importante es p16^{INK4a} (en adelante p16). La integridad de esta cascada reguladora, denominada "ruta de la pRb", parece estar comprometida en la mayoría de los cánceres humanos (Sánchez-Beato *et al.*, 2003; Ortega *et al.*, 2000). Hay muy pocos estudios, sin embargo, que hayan abordado las alteraciones en esta ruta que puedan jugar un papel en la génesis y en el pronóstico del GIST (Ricci *et al.*, 2004; Schneider-Stock *et al.*, 2003). Nosotros hemos intentado evaluar la expresión inmunohistoquímica de dos marcadores proteicos implicados en esta ruta reguladora del ciclo celular: ciclina D1 y pRb.

La proteína p53, sintetizada a partir de un importante gen del mismo nombre con función supresor de tumores, desempeña – como se dijo más arriba - un papel crucial en el control del ciclo celular, induciendo la apoptosis de las células que han sufrido errores en la replicación de su ADN. La regulación negativa de la progresión en el ciclo celular por parte de p53 es mediada en parte por la inducción de p21^{CIP1} (en adelante p21), una CKI de la familia CIP/KIP que neutraliza la actividad kinasa de los complejos CDK2-ciclina E. Otra CKI de la familia CIP/KIP con un importante papel regulador es p27^{KIP1} (en adelante p27), que es un

factor implicado de diversas maneras en la diferenciación celular, apoptosis, e incluso en la respuesta a la quimioterapia en las neoplasias (Lloyd *et al.*, 1999). La proteína p27 falta o es escasa en las células con una tasa alta de proliferación y, con frecuencia, la pérdida de expresión de p27 es indicadora de una mala evolución en muchas neoplasias. Las mutaciones en el gen *p53*, que suelen traducirse en la sobreproducción de una proteína p53 no funcional pero inmunohistoquímicamente detectable, están implicadas en la secuencia de acontecimientos que conducen al desarrollo de muchas neoplasias tales como el carcinoma colorrectal, el carcinoma de células transicionales, etc. La mayoría de los trabajos que evaluaron la expresión de esta proteína en el GIST concluyeron que no era un factor pronóstico relevante de forma independiente, en los análisis multivariante (Cunningham *et al.*, 2001; Panizo-Santos *et al.*, 2000; Wang X *et al.*, 2002; Wong *et al.*, 2003). También hay algunos estudios de la expresión génica e inmunohistoquímica (Gelen *et al.*, 2003; Pruneri *et al.*, 2003) de p27 en el GIST, con resultados no concluyentes, mientras que la proteína p21 apenas ha sido explorada en el GIST. De esta ruta molecular, hemos estudiado inmunohistoquímicamente en el GIST las alteraciones de tres de sus componentes: p53, p27 y p21.

En lo que respecta a la apoptosis, la ruta fisiológica más frecuentemente implicada en las neoplasias es la denominada mitocondrial o intrínseca que, cuando se activa, se caracteriza por causar una alteración en la permeabilidad de la membrana mitocondrial con la liberación del citocromo c, el cual, asociado al factor apoptótico activador de la proteasa-1 (APAF1), actúa sobre la caspasa 9, que inicia o dispara los fenómenos que conducen a la muerte celular (Igney y Krammer, 2002). BCL-2 forma parte de una familia de proteínas reguladoras de la apoptosis. Algunos miembros de esta familia, como la propia BCL-2, tienen una función antiapoptótica, mientras que otros componentes son proapoptóticos, entre los que destaca la proteína BAX. Ambos actúan sobre la ruta mitocondrial de la muerte celular. La proteína BCL-2 es, por tanto, un factor protector de la célula frente a la apoptosis, y su papel potencial en la génesis o agresividad de los tumores mesenquimales ha sido poco estudiado (Suster *et al.*, 1998). La expresión de BCL-2 parece ser un marcador de mal pronóstico en el GIST en algunas series (Cunningham *et al.*, 2001; Panizo-Santos *et al.*, 2000), mientras que en otra se asoció a un mejor comportamiento (Kontogianni *et al.*, 2003), pero, en cualquier caso, no parece tener valor como variable independiente. Tampoco fue relevante la inmunotinción para BAX (Kontogianni *et al.*, 2003).

La proteína c-myc es un factor de transcripción que promueve la proliferación a través de la inducción de genes implicados en el control del ciclo celular tales como CDK4,

Id2, CDC25A, y las ciclinas D1, D2, A y E. Además, c-myc inhibe genes bloqueadores del crecimiento como p15, p21, p27, GADD45 y GAS1 (Sánchez-Beato *et al.*, 2003), y parece promover la inmortalidad celular actuando sobre la telomerasa. En un estudio inmunohistoquímico de diversos factores relacionados con el ciclo celular y la apoptosis en el GIST (Panizo-Santos *et al.*, 2000), el marcador que alcanzó una mayor significación estadística en relación con el pronóstico fue la expresión de c-myc. El 86,6% de los GIST clínicamente malignos fueron positivos para c-myc, entendiéndose por casos positivos aquellos que expresaban este marcador en más del 25% de las células neoplásicas.

I.1.6 TRATAMIENTO

I.1.6.1 CIRUGÍA. La resección quirúrgica de la lesión siempre se ha situado en primera línea en el tratamiento del GIST. La cirugía debe ser completa siempre que sea posible, lo que suele facilitarse por la tendencia de esta neoplasia a tener un crecimiento expansivo y no infiltrativo, rasgo que permite obtener frecuentemente unos márgenes quirúrgicos negativos. La disección quirúrgica de la masa debe ser muy cuidadosa para evitar su ruptura. Aunque el aspecto de muchos GISTs en las imágenes de TC puede ser muy alarmante, estos tumores se proyectan a menudo hacia el exterior del tubo digestivo y desplazan las estructuras vecinas sin invadirlas. Por ello, pueden separarse de los órganos adyacentes con cierta facilidad aunque, en algunos casos, la resección en bloque es inevitable a causa de la existencia de adhesiones fibrosas o tumorales densas. En la laparotomía, el abdomen debe explorarse cuidadosamente, prestando una atención especial a la superficie peritoneal y al hígado para excluir una diseminación metastática. Como en todos los tumores mesenquimales, las metástasis a ganglios linfáticos regionales son raras, por lo que no está indicado realizar una linfadenectomía (Conlon *et al.*, 1995; DeMatteo *et al.*, 2000).

Tras la extirpación quirúrgica completa del tumor, la actitud seguida habitualmente es la observación o seguimiento periódico del paciente. Las recurrencias y metástasis en el GIST suelen ser también abdominales, ya sea en forma de nódulos diseminados por la superficie peritoneal o de lesiones hepáticas. Más raras son las metástasis a otros órganos tales como los pulmones o el hueso. Tras la recurrencia, la supervivencia media es de sólo

10-23 meses (Conlon *et al.*, 1995; DeMatteo *et al.*, 2000; Pithorecky *et al.*, 2000).

Una amplia serie recientemente publicada de 200 casos (DeMatteo *et al.*, 2000), con un apreciable sesgo por proceder de un único Hospital de referencia con un número muy elevado de tumores malignos, en 80 de 93 pacientes con enfermedad primaria se logró realizar una resección completa. El porcentaje de supervivencia a los 5 años de estos pacientes fue del 54%, y el factor más directamente vinculado a la supervivencia fue el tamaño del tumor.

I.1.6.2 QUIMIOTERAPIA CONVENCIONAL. La tasa de respuesta del GIST a los agentes quimioterápicos convencionales es extremadamente baja, por debajo del 10% (DeMatteo *et al.*, 2002). Debido al fracaso de la mayoría de los regímenes propuestos, no se alcanzó en su momento ningún acuerdo sobre el fármaco o combinaciones de fármacos que debían administrarse a los pacientes con GIST no susceptibles de tratamiento quirúrgico.

En el GIST con recurrencia peritoneal se intentó la citorreducción quirúrgica seguida de quimioterapia intraperitoneal adyuvante con cisplatino y doxorubicina, o bien con mitoxantrona sola (Berthet *et al.*, 1999). De este modo, el intervalo medio hasta la siguiente recurrencia se amplió de 8 a 21 meses. También se intentó la embolización o quimioembolización de la arteria hepática en el tratamiento de las metástasis hepáticas del GIST, pero los resultados han sido pobres (DeMatteo *et al.*, 2002).

I.1.6.3 RADIOTERAPIA. El papel de la radioterapia en el control del GIST es casi nulo, a diferencia de lo que sucede en los sarcomas de partes blandas de las extremidades. El uso de la radiación está limitado por su toxicidad potencial en las estructuras y órganos circundantes en el abdomen y, en la era pre-imatinib, parece que la única indicación aceptable era la existencia de unos márgenes quirúrgicos positivos en el estudio microscópico de los tumores gástricos o rectales (DeMatteo *et al.*, 2002).

I.1.6.4 IMATINIB (GLIVEC). En 1996 se publicaron los resultados logrados en el bloqueo in vitro de la actividad tirosin-quinasa de ABL y de la proteína quimérica BCR-ABL, producto de la translocación cromosómica t(9; 22) característica de la LMC, utilizando para

ello una pequeña molécula, entonces conocida como STI-571, lo que conducía a la muerte de las células neoplásicas (Druker *et al.*, 1996). Pronto se trasladó su uso a la práctica clínica, demostrando ser una terapia segura y eficaz en esta neoplasia hematológica (Druker *et al.*, 2001).

La publicación inicial de la existencia en el GIST de mutaciones en el gen *c-kit* que se traducen en una activación constitutiva de la función TQ de la proteína KIT (Hirota *et al.*, 1998), condujo a algunos investigadores a concebir que el STI-571 podría ser eficaz también en el GIST, pues el mecanismo de activación patológica de KIT es muy similar al de la proteína de fusión BCR-ABL en la LMC. Esta hipótesis se sustentaba en el hecho comprobado de que STI-571 no era un inhibidor específico de BCR-ABL, sino que también bloqueaba la actividad de otras TQs como el PDGFRA y la propia KIT. Joensuu y colaboradores (Joensuu *et al.*, 2000) comunicaron en el año 2000 los espléndidos resultados logrados con STI-571 - entonces ya denominado mesilato de imatinib (Glivec) - en el control de un GIST recurrente en cavidad peritoneal y con metástasis hepáticas en una mujer de 54 años en la que habían fracasado todas las terapias convencionales. El tumor era CD117 positivo, y se logró una respuesta metabólica completa - demostrada a través de la negatividad en la exploración con PET (tomografía por emisión de positrones) - con una dosis de 400 mg/día, que se mantenía 11 meses después, en el momento de la publicación. Las biopsias seriadas de las metástasis hepáticas demostraron que la neoplasia era reemplazada por tejido fibroso o mixoide.

Estos resultados alentadores condujeron a la realización de ensayos clínicos a gran escala de la aplicación de imatinib en el tratamiento del GIST metastático y/o irresecable, tanto en un estudio colaborativo Finlandia-Estados Unidos (Demetri *et al.*, 2002) como en otro puramente europeo patrocinado por la *European Organization for Research and Treatment of Cancer* (EORTC) (Van Oosterom *et al.*, 2001). En la primera serie, de los 86 pacientes con seguimiento de más de tres meses se logró una respuesta parcial en el 59% de los casos, la enfermedad permaneció estable en el 26%, y solo se registró progresión de la misma en el 13%. No hubo respuestas completas. Los resultados fueron muy similares en el ensayo europeo. Estos resultados pueden considerarse espectaculares, particularmente en el caso que nos ocupa del GIST irresecable que era en esencia completamente resistente a cualquier terapia sistémica antes del advenimiento del imatinib. Finalmente, la FDA norteamericana aprobó el uso de imatinib en el tratamiento del GIST metastático y/o irresecable, con una dosis recomendada de 400 o 600 mg/día (Dagher *et al.*, 2002). A estas dosis, la toxicidad del fármaco es limitada, observándose como principales efectos adversos edema, retención de fluidos, náuseas, vómitos, diarrea, mialgias, rash cutáneo, citopenias no

severas, sangrado y elevación en las cifras de transaminasas o bilirrubina.

Actualmente están en marcha dos estudios - patrocinados por el *American College of Surgeons Oncology Group* (ACOSOG) - evaluando el papel del imatinib como terapia adyuvante en GISTs primarios. En uno de ellos, en fase II, se incluyeron pacientes con tumores que presentaban factores morfológicos asociados a un alto riesgo potencial (más de 10 cm de diámetro, ruptura tumoral o tumores multifocales) (Brumming *et al.*, 2003). Otro estudio en fase III incluye pacientes con GISTs de riesgo alto y moderado (tumores de 3 cm o más de diámetro) asignados aleatoriamente al tratamiento con imatinib (400 mg/día durante un año) o con placebo (DeMatteo *et al.*, 2002). Hay al menos otro ensayo clínico similar en marcha, de ámbito europeo, patrocinado por la EORTC. No disponemos todavía de los resultados de estos ensayos.

Con todo esto, el imatinib se ha convertido en el arma más poderosa para luchar contra el GIST metastático y/o irreseccable (Schwartz, 2002). Los pacientes que respondan deben ser considerados candidatos a la resección quirúrgica. En los pacientes con enfermedad estable se seguirá administrando el fármaco hasta que la progresión sea evidente. En los pacientes con tumores resistentes al imatinib, deberá interrumpirse la medicación e intentarse las poco eficaces terapias convencionales, o bien entrar en ensayos clínicos de tratamientos experimentales con nuevos medicamentos, incluyendo varios inhibidores de TQs.

Siguiendo el mismo proceso de razonamiento, se comprobó recientemente que algunos pacientes con trastornos mieloproliferativos crónicos infrecuentes, en los que subyace una translocación cromosómica que implica al gen que codifica el PDGFRA, han respondido espectacularmente al tratamiento con imatinib (Apperley *et al.*, 2002).

Como ya se mencionó anteriormente, hoy se sabe que el status mutacional en *c-kit* o, con mucha menor frecuencia, en *PDGFRA* no tiene repercusiones pronósticas en los GISTs en el momento del diagnóstico. Pero si en su evolución se registran recidivas o metástasis que hacen necesario el tratamiento con imatinib, el conocimiento del tipo de mutación existente si aportará una valiosa información sobre la respuesta del tumor al tratamiento (Debiec-Rytcher *et al.*, 2004^a; Heinrich *et al.*, 2003^a). Los GISTs con una mejor respuesta son los que tienen mutaciones en el exón 11 de *c-kit*, mientras que en los tumores que carecen de mutaciones la respuesta al tratamiento con imatinib es nula.

I.2. MICROMATRICES DE TEJIDOS - TISSUE MICROARRAYS (TMAs)

I.2.1 DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LOS TMAs

La micromatriz de tejidos (MMT), más ampliamente conocida en la literatura médica por su denominación inglesa y las siglas correspondientes (*tissue microarray*, TMA, término usaremos en lo sucesivo de manera preferente), fue presentada por Kallioniemi y colaboradores en el año 1998 (Kononen *et al.*, 1998), como un método de alto rendimiento en la investigación biológica en general, y oncológica en particular, pues permite el análisis simultáneo de cientos de muestras tisulares diferentes en la misma preparación. Los tejidos pueden ser estudiados con todas las técnicas susceptibles de ser empleadas sobre secciones histológicas, tales como el estudio por microscopía óptica convencional, las tinciones inmunohistoquímicas - que constituyen su principal utilidad en la práctica - y la hibridación *in situ*. Este procedimiento guarda un cierto paralelismo conceptual con los conocidos *arrays* de expresión de cADN (*microarrays* de expresión), pero mientras que uno de estos últimos permiten estudiar a la vez la expresión de miles de genes en una sola muestra tumoral, con un TMA podemos evaluar simultáneamente la expresión, en este caso inmunohistoquímica, de un solo marcador en cientos de muestras tisulares.

El dispositivo más ampliamente utilizado en la preparación de los TMAs es un sencillo instrumento de precisión (Beecher Instruments, Silver Spring, MD) que consiste básicamente en una aguja hueca que pincha los bloques de parafina originales - llamados donantes - en un área previamente seleccionada de los mismos por ser representativa del tejido o la lesión que se pretende estudiar. Posteriormente, el cilindro obtenido se coloca en una posición preestablecida, determinada mediante unos tornillos de precisión con escalas graduadas, de un segundo bloque de parafina denominado receptor, en el que se ha practicado previamente un orificio para alojar el tejido. Siguiendo reiteradamente este procedimiento, al final del proceso de construcción, este bloque puede contener hasta un millar de cilindros

tisulares de diferentes orígenes. Para evitar los problemas derivados de un muestreo inadecuado o de pérdidas de tejido, los casos suelen estar representados al menos por duplicado en el TMA. El resultado final de este proceso es un bloque de parafina que permite estudios masivos de la expresión inmunohistoquímica de marcadores proteicos - o incluso de ácidos nucleicos a través de la hibridación *in situ* - sobre tejidos íntegros.

I.2.2 APLICACIONES DE LOS TMAs

La aplicación fundamental de los TMAs es la caracterización de nuevas proteínas, comprobando su espectro de expresión inmunohistoquímica en tejidos normales y neoplásicos. Cada vez con una mayor frecuencia, el conocimiento de la existencia y estructura de estas proteínas se obtiene a partir de los resultados de la aplicación de las micromatrices de expresión o de cADN, que permiten determinar los genes expresados preferentemente en las neoplasias estudiadas. Las proteínas sintetizadas a partir de esos ADNs complementarios son testadas a través de los TMAs, lo que permite conocer el rango de su expresión tisular, y desarrollar análisis estadísticos de estos patrones de expresión en relación con los datos clínicos de los pacientes, para definir de este modo marcadores tisulares de importancia pronóstica o diagnóstica (Mengel *et al.*, 2003; Torhorst *et al.*, 2001). En el caso concreto del GIST, esta fue la metodología seguida para descubrir el DOG1, un nuevo marcador diagnóstico de estas neoplasias de aparente gran sensibilidad y especificidad (West *et al.*, 2004).

Las preparaciones obtenidas a partir de los TMAs se procesan, en las tinciones inmunohistoquímicas o en las de hibridación *in situ*, de idéntica manera a la protocolizada en cada laboratorio para las secciones tisulares convencionales.

Los TMAs han sido utilizados hasta ahora en prácticamente todas las áreas de la patología, como pueden ser los linfomas (Foucar, 2002; García *et al.*, 2003; Hans *et al.*, 2004; Hedvat 2002), el cáncer de mama (Zhang *et al.*, 2003), el cáncer de pulmón (Au *et al.*, 2004), etc. En todos estos trabajos, la técnica de TMAs demostró ser robusta y válida en todas sus fases, desde la propia construcción de la matriz hasta su evaluación microscópica.

A pesar de esto, la técnica de TMA no carece de limitaciones. Si el área diagnóstica

no está presente en un cilindro concreto, los resultados inmunohistoquímicos, sean positivos o negativos, no serán valorables. Por ello, debe prestarse una cuidadosa atención a la morfología tisular, no sólo en las secciones teñidas con Hematoxilina Eosina (HE), sino también en las inmunotinciones. La principal razón de discrepancias entre los TMAs y las secciones completas es el muestreo inadecuado, que conduce a resultados negativos falsos.

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

II.1 JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

La identificación de los tumores mesenquimales del tubo digestivo agresivos o potencialmente malignos ha sido objeto de numerosas propuestas y largas controversias, especialmente tras la comprobación de que la mayor parte de estos tumores no eran en realidad, como se supuso durante décadas, histogénicamente derivados del músculo liso sino que se originaban aparentemente de una célula mesenquimal primitiva y, en su diferenciación, adquirirían características propias de la CIC. En esta polémica historia se han propuesto innumerables factores de valor pronóstico potencial, pero siempre ocuparon un lugar central en la determinación del comportamiento de un tumor dado el tamaño de la lesión y su actividad proliferativa, generalmente expresada como el número de mitosis por 50 CGA. Incluso las propuestas más refinadas tienen puntos débiles, pues hay tumores - cierto es que excepcionales - que siendo de pequeño tamaño y con un bajo número de mitosis han dado lugar a recidivas peritoneales o metástasis (Evans, 1985). Por ello, las publicaciones más recientes renuncian a identificar sin ambigüedades los tumores benignos y los malignos, y prefieren etiquetar a las lesiones en función de su riesgo (Fletcher *et al.*, 2002^a; Miettinen *et al.*, 2002^a). Aunque la muy reciente introducción de un tratamiento eficaz del GIST maligno, como es el imatinib, ha podido desplazar algo el punto de interés desde la valoración pronóstica precisa de cada tumor hacia la identificación - por medio de la inmunotinción para CD117 o del estudio genético directo - de las lesiones susceptibles de ser tratadas con este agente en el caso de que aparezcan metástasis o una recidiva local, sigue siendo un objetivo prioritario establecer parámetros reproducibles que permitan distinguir los GISTs benignos de los malignos.

Los TMAs han demostrado, en el poco tiempo transcurrido desde su diseño hasta el presente, ser un método adecuado para el análisis masivo de marcadores inmunohistoquímicos tradicionales o nuevos sobre diversas lesiones neoplásicas. En los numerosos estudios publicados de grandes series de GISTs se ha recurrido en muy contadas ocasiones a los TMAs (Sheehan *et al.*, 2003; West *et al.*, 2004). Además, en estas publicaciones se han estudiado ampliamente las inmunotinciones que permiten solucionar los

problemas de diagnóstico diferencial pero son escasos los trabajos que evalúan proteínas que, en muchas otras neoplasias, guardan relación con el pronóstico, tales como los mediadores o factores implicados en el ciclo celular y la apoptosis. Nuestra intención en el presente trabajo, que estudia retrospectivamente una serie de 84 casos de GISTs procedentes de dos instituciones y tratados de una manera homogénea, fue aplicar este nuevo método de análisis para, en primer lugar, comprobar que los resultados obtenidos con las matrices son equiparables a los practicados sobre secciones completas en las inmunotinciones más comunes y, en segundo lugar, someter a los TMAs a una batería restringida de tinciones para los marcadores fundamentales del ciclo celular y la apoptosis y evaluar, tras el análisis estadístico correspondiente, si aportan información pronóstica adicional a la obtenida a través de los parámetros más clásicos. Los GISTs suelen ser neoplasias bastante homogéneas en sus características histopatológicas – en una valoración intratumoral, no intertumoral - por lo que parece que la aplicación de TMAs al estudio de sus marcadores será rentable, superando el obstáculo teórico del error de muestreo.

La tinción inmunohistoquímica para CD117 en el GIST es crucial, como se ha dicho en numerosas ocasiones. Por ello, es deseable que la técnica se protocolice de la manera más rigurosa posible para lograr unos resultados reproducibles dentro del mismo laboratorio y entre diferentes laboratorios. También es necesario definir claramente lo que debe entenderse por una inmunotinción positiva y evaluar las modificaciones propuestas para incrementar su especificidad. Creemos que los TMAs son un instrumento válido para lograr estos objetivos.

II.2 OBJETIVOS

- 1. Estudio clínico-patológico de una amplia serie de GISTs, prestando especial atención a aquellos rasgos morfológicos que pueden tener valor pronóstico.**
- 2. Validación de una micromatriz de tejidos (*tissue microarray*) en el estudio inmunofenotípico del GIST, comparando para ello los resultados obtenidos en la micromatriz con los observados en las secciones completas tradicionales.**
- 3. Evaluación de la rentabilidad de los diversos marcadores inmunohistoquímicos empleados en el diagnóstico diferencial del GIST, con el fin de definir la batería de anticuerpos más adecuada.**
- 4. Evaluación de los protocolos técnicos propuestos para la inmunotinción con CD117.**
- 5. Comprobación de la influencia pronóstica de los factores reguladores del ciclo celular y de la apoptosis, comparando su utilidad con los parámetros valorados tradicionalmente, de manera fundamental el tamaño del tumor y su número de mitosis.**

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1 PACIENTES

Los casos estudiados en el presente trabajo proceden de dos instituciones: el C. H. U. de Vigo y el C. H. U. de Santiago de Compostela, y en las dos fueron recuperados por procedimientos ligeramente diferentes.

En el C. H. U. de Vigo se realizó una búsqueda cruzada en la base de datos del Servicio de Anatomía Patológica de los tumores registrados con una clave topográfica correspondiente al tubo digestivo, epiploon o mesenterio, y con un clave abierta de tumor mesenquimal, utilizando para ello el código SNOMED. El período temporal abarcado de este modo se extiende desde el año 1995 – año en el que se dotó al Servicio de Anatomía Patológica de su actual aplicación informática – hasta el año 2002, en el que cerramos la serie. Así se identificaron 43 pacientes. Otros 14 pacientes se recuperaron de los archivos preinformáticos del Servicio de Anatomía Patológica y de los archivos propios del Servicio de Cirugía General. De estos últimos, nueve pacientes fueron objeto de una publicación previa (Cáceres *et al.*, 1992). Las intervenciones quirúrgicas más antiguas en estos paciente datan del año 1979.

En el C. H. U. de Santiago todos los pacientes fueron identificados a través de una búsqueda informática en la base de datos del Departamento de Anatomía Patológica, en el período temporal 1991-2002. Por este procedimiento se localizaron 53 tumores en otros tantos pacientes. También en este caso, las circunstancias clínico-patológicas de 34 de estos pacientes fueron comunicadas en un artículo reciente (Abdulkader *et al.*, 2002).

Siguiendo este proceder, logramos reunir entre las dos instituciones un total de 110 pacientes en los que hay un diagnóstico de tumor mesenquimal directamente vinculado al tubo digestivo o localizado en el interior de la cavidad abdominal. Tras un análisis morfológico e inmunohistoquímico preliminar, eliminamos 26 de los pacientes pues sus lesiones no eran GISTs: 12 tumores son leiomiomas, muchos de ellos ya identificados como tales en el estudio anatomopatológico inicial, 5 lesiones – todas ellas gástricas – son schwannomas y, en este caso, todos los tumores fueron diagnosticados originalmente de GIST (o GANT). Una lesión localizada en el colon y otra en el

mesenterio corresponden a sendas fibromatosis (tumor desmoide) y un tumor gástrico es un lipoma submucoso. Dos son sarcomas metastásicos, uno en el intestino delgado, con primario localizado en partes blandas de un miembro inferior, y otro en recto, consecuencia de la diseminación de un leiomioma uterino. Un tumor pélvico desconectado del tubo digestivo corresponde a un leiomioma celular probablemente originado en el cuerpo uterino. Finalmente, en tres casos no dispusimos de material suficiente para el estudio por tratarse de biopsias endoscópicas de muy pequeño tamaño.

Tras este filtrado, finalmente contamos con 84 tumores en otros tantos pacientes, lo que representa el 76,36% de los 110 casos potenciales. Además, se da la circunstancia de que de cada uno de los dos Hospitales procede exactamente la mitad de los tumores, esto es, 42 pacientes por Hospital. El número de preparaciones teñidas con hematoxilina-eosina estudiadas para cada paciente fue muy variable, oscilando entre una y 18, con una mediana de seis preparaciones por caso.

Aunque en la actualidad existe una fuerte tendencia a exigir la expresión inmunohistoquímica de CD117 para sostener el diagnóstico de GIST – llegando incluso a incluir este requisito en la propia definición de la entidad (Hasegawa *et al.*, 2003) – se admite la existencia infrecuente de algunos ejemplos de genuinos GIST CD117 negativos (Fletcher *et al.*, 2002^a, Corless *et al.*, 2004). Por ello decidimos mantener el diagnóstico de GIST en cinco de estos 84 casos, en los que la inmunotinción para CD117 fue negativa o muy débilmente positiva, pues la constelación de los restantes hallazgos clínico-patológicos fue lo suficientemente contundente como para incluirlos en la serie.

Los datos clínicos se recogieron de los informes anatomopatológicos originales, de donde se obtuvo información tal como la edad y sexo de los pacientes, localización y dimensiones de los tumores, así como sus principales características macroscópicas. A través de la revisión de las historias clínicas archivadas de los pacientes completamos la recogida de datos, prestando especial atención a la clínica de presentación de las lesiones y a la fecha y causa de la muerte, ya fuera ésta consecuencia de la evolución natural del GIST o motivada por otras causas. El seguimiento comienza en la fecha de la primera cirugía y concluye con la fecha de la muerte, si ésta tuvo lugar, expresando el período temporal en meses. También hemos registrado el momento de la aparición de recidivas o metástasis. La fecha establecida arbitrariamente como punto final del seguimiento es el mes de Febrero de 2004.

El único criterio empleado para determinar la malignidad de los tumores estudiados fue la situación clínica de los pacientes, sin atender en principio a las características morfológicas – macro y microscópicas - de las lesiones. Por tanto, se

consideraron GISTs malignos aquellos en los que se registraron siembra o diseminación tumoral en la cavidad abdominal, en el momento del diagnóstico o durante la evolución posterior de los pacientes, y cuando aparecieron metástasis a distancia.

III.2 REVISIÓN PATOLÓGICA

Las características macroscópicas recogidas a partir de los informes anatomopatológicos archivados fueron el tamaño de los tumores, su localización – que se dividió en cinco grandes categorías: esófago, estómago, intestino delgado, colon-recto y no vinculados al tubo digestivo – y otros rasgos descritos tales como la degeneración quística, hemorragia o necrosis identificada macroscópicamente.

En el estudio microscópico, prestamos especial atención a algunos datos morfológicos que también fueron tabulados: el tipo histológico básico del tumor (fusocelular, epitelioide o mixto), el grado de la neoplasia, la presencia de necrosis, hemorragia, ulceración, quistificación, infiltración tumoral de la lámina propia de la mucosa y la identificación de las llamadas fibras esquenoides.

Finalmente, se efectuó una contabilidad de las mitosis, siempre sobre las secciones completas. Para ello se identificaron previamente a pequeños o medianos aumentos los campos con una mayor actividad proliferativa. Posteriormente, utilizando el objetivo de 40 aumentos en un microscopio Olympus BX40 con unos oculares 10x y con un número de campo de 22 lo que se traduce en un campo de gran aumento (CGA, 400x) de 0,237 mm² de superficie, contamos las mitosis en 50 CGA sucesivos, ya de modo aleatorio. La contabilidad se rigió por criterios estrictos, atendiendo tan sólo a las mitosis incuestionables, con ausencia de la membrana nuclear, y prescindiendo de elementos dudosos tales como cuerpos apoptóticos, células inflamatorias, etc. En aquellos casos en los que el tamaño del tumor era demasiado pequeño para evaluar los mencionados 50 CGA, el número de mitosis se multiplicó por el factor necesario para elevar el número de CGA obtenido a esos 50 CGA.

En función del tamaño y el número de mitosis, cada tumor se situó en una de las cuatro categorías de riesgo potencial, aplicando para ello la propuesta de consenso y de uso más generalizado (Fletcher *et al.*, 2002^a): riesgo muy bajo, bajo, intermedio y alto.

Para la asignación de grado a los tumores se aplicó el sistema defendido en el volumen de la OMS dedicado a los tumores de partes blandas y óseos (Fletcher *et al.*,

2002^b), que divide a los tumores en tres grados: 1, bien diferenciado; 2, moderadamente diferenciado; y 3, pobremente diferenciado. Este sistema se basa fundamentalmente en la valoración combinada de tres factores: la densidad celular, el número y aspecto de las mitosis, y el pleomorfismo nuclear.

III.3 CONSTRUCCIÓN DE LOS TMAs

En todos los casos se seleccionaron uno o dos bloques de parafina en función de la representatividad de la lesión y de su espesor, bloques que se destinaron a la construcción de los TMAs. En las preparaciones correspondientes teñidas con HE marcamos las áreas indicadas, y el marcaje se trasladó a los bloques de parafina seleccionados.

Todos los tumores – GIST y no GIST – recuperados en la búsqueda fueron incluidos en dos TMAs, uno de ellos basado en los casos recuperados del C. H. U. de Vigo (TMA 1) y el segundo con los tumores del C. H. U. S. (TMA 2). Estos bloques fueron contruidos con la ayuda de un dispositivo comercial manual (Beecher Instruments, Silver Spring, MD, EEUU). El aparato, descrito brevemente, dispone de un dispositivo móvil con un juego de dos agujas: una destinada a crear un fino conducto cilíndrico en el bloque de parafina receptor, y la segunda, con un calibre interior algo mayor, se emplea para pinchar el bloque donante, en el punto previamente señalado, con el fin de obtener un cilindro de parafina con el tejido. Este cilindro tisular se introduce a continuación en el bloque receptor a través del orificio previamente practicado. El bloque receptor se mueve entre cada inserción de tejido con la ayuda de unos tornillos de micrométricos de precisión situados en los ejes de coordenadas X e Y. Una vez concluida la construcción del TMA, con arreglo a una plantilla de diseño previo, el bloque de parafina receptor se calienta a 60° C durante 30 minutos para facilitar la plena integración del nuevo tejido en la parafina, tras lo que ya puede procederse al corte de secciones de 4 µm de espesor con un microtomo convencional.

Todos los tumores se incluyeron por duplicado y, como se dijo antes, además de los 84 GISTs, añadimos una representación de los demás tumores mesenquimales abdominales o vinculados al tubo digestivo que recuperamos en la búsqueda inicial, entre los que se cuentan leiomiomas (12 casos), leiomiomas (2 casos), schwannomas (5 casos) y fibromatosis mesentéricas (2 casos). También se añadieron cilindros de la capa

muscular propia del tubo digestivo normal. De este modo, en cada uno de los dos bloques receptores se introdujeron finalmente 120 cilindros de tejido de 0,6 mm de diámetro, separados por una distancia de 0,4 mm entre los límites de cada cilindro, con un cilindro adicional (amígdala palatina) destinado a servir de control de posición del TMA. Como plantillas para la construcción de los TMAs, y como tablas para la recogida de los resultados de las inmunotinciones, se emplearon unos diagramas elaborados a tal efecto con la hoja de cálculo Excel™ (Microsoft).

De los dos TMAs se hicieron inicialmente 35 secciones de 4 µm de espesor, tiñendo la primera y la última con hematoxilina-eosina para ratificar la representatividad y la persistencia del tejido en los diferentes niveles de corte de los bloques receptores. Las secciones restantes se montaron en portas especiales para inmunohistoquímica (SuperFrost®Plus, Menzel-Glaser, Alemania) y, a la espera de su tinción, se impregnaron en parafina por inmersión para preservar la antigenicidad del tejido.

III.4 INMUNOHISTOQUÍMICA

En el laboratorio del Servicio de Anatomía Patológica del C. H. U. de Vigo se realizaron todas las inmunotinciones. Para ello se utilizó un sistema automatizado, el equipo Benchmark™ de la firma Ventana Medical Systems (E.E.U.U.), distribuido en España por Atom, que permite la estandarización completa del proceso, obteniendo de este modo unos resultados más homogéneos. El desenmascaramiento antigénico empleado fue idéntico en todas las tinciones, utilizando un tampón comercial basado en TRIS suministrado por el mismo proveedor – Cell Conditioning Solution (CC1), referencia 950-124, Ventana – con una temperatura de trabajo de 100° C durante 30 minutos. La incubación con los anticuerpos policlonales o monoclonales primarios fue de 30 minutos, excepto con la ciclina D1 en el que la incubación se prolongó a toda la noche a 4° C. En la inmunotinción propiamente dicha se empleó el método de la estreptavidina-biotina-peroxidasa, con diaminobencidina como cromógeno, y con una contratinción con hematoxilina.

El suministrador de los anticuerpos utilizados, las referencias comerciales, los respectivos clones y las diluciones de trabajo se reseñan en la **Tabla 5**. Estos anticuerpos pueden dividirse básicamente en dos categorías. Por un lado tenemos los destinados a identificar con la suficiente certeza los casos de GIST y a resolver las dudas planteadas

en el diagnóstico diferencial, y aquí pueden incluirse los siguientes: KIT (CD117), CD34, actina músculo-específica (AME), desmina, S100, proteína glial fibrilar ácida (GFAP), β -catenina, y vimentina. En segundo lugar están los marcadores implicados en el control o regulación del ciclo celular y de la apoptosis, y en este apartado debemos considerar los anticuerpos siguientes: Ki67, ciclina D1, BCL2, BAX, p21, p27, p53, pRb y c-myc. La primera categoría de marcadores, utilizados en el diagnóstico diferencial, se aplicó tanto sobre las secciones de los dos TMAs como sobre secciones completas y representativas de todos o una parte de los tumores, con el fin de comprobar si la inmunoreactividad de los TMAs es similar a la del material considerado como referencia. En concreto, fueron teñidas secciones completas de los 84 tumores con CD117, CD34 y vimentina; mientras que 45 tumores se tiñeron con S-100 y AME, 43 con desmina, 38 con GFAP y 27 con β -catenina.

ANTICUERPO	ORIGEN	CLON	REFERENCIA	DILUCIÓN
CD117	Dako	Policlonal	A4502	1:100
CD34	Novocastra	QBEnd/10	NCL-END	1:20
Actina	Enzo	HHF35	C34931	1:20
Desmina	Bio-Genex	33	MU-072-UC	1:100
S-100	Bio-Genex	Policlonal	PU-058-UP	1:300
GFAP	Bio-Genex	G-A-5	MU-020-UC	1:1000
β-catenina	Novocastra	17C2	NCL-B-CAT	1:50
Vimentina	Dako	V-9	M0725	1 :500
Ki67	Master Diag.	MIB1	211611Q	1:50
Ciclina D1	Novocastra	P2D11F11	NCL-Cyclin D1-GM	1:10
BCL2	Dako	124	M0887	1:10
BAX	Dako	Policlonal	A3533	1:10
p21^{WAF1/CIP1}	Novocastra	4D10	NCL-WAF-1	1:20
p27^{KIP1}	Novocastra	1B4	NCL-p27	1:20
p53	Novocastra	DO7	NCL-p53-DO7	1:50
pRb	Biogenex	G3245	B504	1:100
c-myc	Novocastra	9E11	NCL-cMYC	1:100

TABLA 5. Relación de los anticuerpos utilizados en el estudio inmunohistoquímico.

Además, recientemente se ha recomendado emplear el anticuerpo comercial policlonal CD117 de uso más extendido – el A4502 de Dako – a una dilución de 1:250 sin

desenmascaramiento antigénico por calor (Lucas et al., 2003), con el fin de evitar tinciones no deseadas en otras lesiones mesenquimales que no son GIST, tales como la fibromatosis o tumor desmoide. Para comprobar la rentabilidad diagnóstica de esta propuesta, efectuamos en nuestra serie de casos una tinción adicional de los dos TMAs con A4502, siguiendo estrictamente la técnica descrita en este artículo.

Todas las inmunotinciones fueron valoradas por el autor de este trabajo sobre las preparaciones de los dos TMAs. En esencia, a cada cilindro de los TMAs se le asignó uno de cuatro valores: 2, si la tinción es claramente positiva, tanto en intensidad como en extensión, o cuando la expresión se sitúa en el nivel medio para el marcador estudiado; 1, cuando la inmunotinción es positiva pero con una señal más débil o en escasas células tumorales, o cuando la intensidad se sitúa por debajo del nivel medio; 0, si no existe expresión inmunohistoquímica de ese marcador; y, finalmente, -1, si el cilindro correspondiente se ha perdido en la tinción o si ya no queda tejido en el bloque de parafina. En caso de que hubiera discrepancias en los resultados tintoriales entre los dos cilindros, se asignó a efectos de los estudios estadísticos el valor más alto, aunque se registraron los porcentajes de heterogeneidad inmunohistoquímica para cada marcador.

En el caso de Ki67 (MIB-1), contamos directamente el número de núcleos teñidos en cada uno de los dos cilindros pertenecientes a cada tumor, sumamos el número de los dos cilindros y obtenemos una media dividiendo el resultado entre dos (Ki67_med). También tabulamos el número de núcleos teñidos en el cilindro con mayor expresión de este antígeno (Ki67_máx). Para trasladar los datos de contabilidad de la inmunotinción para Ki67 obtenidos en los TMAs a secciones completas hemos comprobado que, a pesar de utilizar en la construcción de los TMAs una aguja de 0,6 mm de diámetro, los cilindros de tejido medidos sobre el porta miden 0,68 mm. Esta discreta expansión del tejido puede deberse a la rehidratación del mismo durante el procesamiento y tinción. Con estas dimensiones cada cilindro tendrá un área de 0,363 mm², con lo que, si multiplicamos por tres el número de núcleos teñidos en un cilindro, el resultado equivaldrá muy aproximadamente al número de núcleos teñidos por mm². También contamos el número células que incluye cada cilindro de los TMAs en los casos de GIST, con el fin de conocer el porcentaje de núcleos teñidos con Ki67, porcentaje conocido en la literatura como índice MIB-1 y que es la forma habitual de referir la expresión de este marcador.

En la tabulación de los resultados inmunohistoquímicos evitamos hacer una cuantificación precisa del porcentaje de células teñidas, con la excepción del Ki67, y la valoración de cada marcador en niveles de intensidad 1 y 2 se moduló siempre en función de la expresión media de cada uno de los marcadores evaluados.

III.5 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

En 16 de los casos de GIST pudo realizarse un estudio ultraestructural. Para ello, se fijó tejido fresco en una solución fría de glutaraldehído al 4% en un tampón fosfato con un pH de 7,4. El tejido fue postfijado en tetróxido de osmio al 1%, deshidratado en etanol a concentraciones crecientes, e incluido en resina Epon. Las secciones finas seleccionadas se tiñeron con acetato de uranio y citrato de plomo, para ser examinadas posteriormente mediante el microscopio electrónico de transmisión Jeol 100B (Tokio, Japón) del Departamento de Anatomía Patológica del C. H. U. de Santiago. Los criterios ultraestructurales empleados para evaluar la línea predominante de diferenciación en cada tumor fueron, en esencia, los descritos por Erlandson y colaboradores (Erlandson *et al.*, 1996). En consecuencia, en las lesiones examinadas se determinó si la diferenciación predominante era muscular, neural, mixta o dual; o bien si carecían por completo de cualquier signo ultraestructural de diferenciación.

III.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los cálculos fueron realizados utilizando el paquete estadístico SPSS para Windows, versión 11.5.1 (16 Nov 2002, ©SPSS Inc., Chicago, USA).

Para verificar la normalidad de las variables cuantitativas se aplicó la prueba no paramétrica de Kolmogorov-Smirnov.

Las variables cuantitativas se compararon usando un test de diferencia de medias. Cuando se verificó la normalidad en la distribución de las variables, se utilizó la t de Student para muestras independientes. Si no se cumplía el criterio de normalidad, recurrimos al test no paramétrico de la U de Mann-Whitney.

Para comparar variables cualitativas utilizamos el test de χ^2 , salvo cuando los casos esperados eran menos de 5, en cuyo caso empleamos el test exacto de Fisher.

Las correlaciones entre variables fueron evaluadas usando tablas de contingencia, para las variables discretas, y métodos de regresión lineal para las variables continuas. Dado que ninguna de las variables estudiadas, con la excepción de la edad de los pacientes, se ajusta a la normalidad, la significación estadística de las posibles correlaciones se calcularon mediante el coeficiente no paramétrico Tau de Kendall. Para las variables escaladas utilizamos el coeficiente de correlación de Spearman.

Los criterios adoptados para la determinación del comportamiento maligno, como acontecimientos no censurados en las curvas de supervivencia, fueron la aparición de recurrencias o recidivas locales en la cavidad abdominal, las metástasis a distancia o - directamente - la muerte causada por la enfermedad, todo ello expresado en meses tras la cirugía inicial. Solo las muertes en las que se pudo confirmar su relación directa con el GIST se contabilizaron como eventos, los restantes exitus fueron censurados en el momento de la muerte.

Todas las variables clínico-patológicas estudiadas fueron sometidas a un análisis de supervivencia univariante a través del método de Kaplan-Meier, y las diferencias se compararon con el test del logaritmo del rango. El análisis se completó utilizando un modelo de regresión de Cox univariante.

Elegimos para el análisis multivariante todos los parámetros pronósticos con los que se obtuvo un valor P menor o igual a 0,05 en el análisis univariante, utilizando de nuevo el modelo de regresión de Cox, a través de la progresión por pasos adelante y eliminación de variables por pasos atrás, verificado con el test de Wald.

El nivel considerado de significación estadística fue $p < 0,05$ (error α : 5%).

III.7 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La revisión bibliográfica se llevó a cabo mediante la consulta vía Internet de la página web Pub Med, un servicio de la *National Library of Medicine* estadounidense que incluye alrededor de 14 millones de artículos publicados en el área de la biomedicina desde los años 50 del pasado siglo (<http://www.ncbi.nlm.gov>). Las citas proceden de la base de datos Med Line y de otras muchas publicaciones. Toda esta revisión está actualizada al mes de Septiembre del año 2004.

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

IV.1 HALLAZGOS CLÍNICOS Y MACROSCÓPICOS

Los 84 pacientes con GIST finalmente incluidos en este trabajo se repartieron exactamente por mitades en lo que atañe al sexo, esto es, 42 eran varones y otros 42 eran mujeres. El rango de edad de estos pacientes, en el momento del diagnóstico, oscilaba entre los 28 y los 88 años, con una media de 65,81 años, una mediana de 67,5 años y una desviación típica de 12,18 años. En cuanto a la localización de los diferentes tumores, 1 era esofágico (1,2%), 46 eran gástricos (55,4%), 30 surgían de algún punto del intestino delgado (36,1%), 1 era colo-rectal (1,2%) y 4 tumores no estaban directamente vinculados al tubo digestivo (4,8%). Una paciente se presentó con numerosas masas abdominales, sin que fuera posible determinar la porción del tubo digestivo en la que se originó la neoplasia, y en otra paciente no pudo conocerse el origen por no figurar explícitamente este dato en la historia clínica.

El tamaño de los tumores – evaluado a partir de su dimensión máxima – oscilaba entre 0,4 y 32 cm, con una media de 7,58 cm, una mediana de 5 cm y una desviación típica de 7,40 cm. Si estratificamos los tumores según las magnitudes acotadas que utilizan Fletcher y colaboradores en su aproximación pronóstica al riesgo de comportamiento agresivo en el GIST (Fletcher *et al.*, 2002^a), 16 lesiones (19%) midieron menos de 2 cm, 28 (33,3%) medían entre 2 y 5 cm, 19 (22,6%) medían más de 5 cm pero menos de 10 cm, y 21 tumores (25%) medían 10 cm o más en dimensión máxima. El aspecto macroscópico de los tumores fue marcadamente variable y, mientras que la mayoría de los GISTs estudiados crecieron predominantemente hacia la luz del tubo digestivo, otros lo hicieron exofíticamente formando masas subserosas. La mayoría de los GISTs de pequeño tamaño mostraron una superficie de corte bastante homogénea, fibrilar, blanco-grisácea y elástica. Sin embargo, muchos de los tumores presentaron una superficie de corte más heterogénea en la que alternaban áreas nodulares carnosas y blandas, con otras más fibrosas y consistentes, así como zonas más o menos amplias de hemorragia o de necrosis. Muchos tumores de crecimiento hacia la luz del tubo digestivo acabaron erosionando o ulcerando claramente la mucosa, con signos macroscópicos de hemorragia luminal (**Figura 3**).

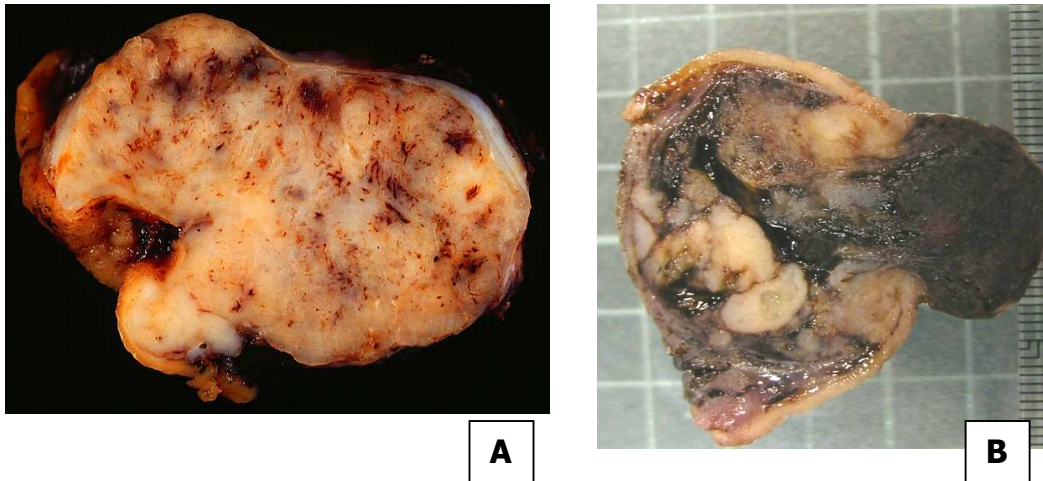


FIGURA 3. Aspecto macroscópico de dos GISTs. **A.** Tumor gástrico de crecimiento fundamentalmente exofítico, aspecto fibrilar y con pequeñas áreas de hemorragia. **B.** Tumor del intestino delgado de crecimiento submucoso, de aspecto más heterogéneo. Ambos tumores provocan la ulceración de la mucosa.

En 20 lesiones de un total de 81 tumores en los que este dato está registrado (24,7%), 15 de ellas localizadas en el estómago, la quistificación era una característica macroscópica muy destacada, de tal manera que en muchos de estos casos la neoplasia viable se limitaba a un delgado casquete periférico que rodeaba una o más grandes cavidades quísticas. De este modo, no es extraño que en 6 pacientes con tumores gástricos el diagnóstico prequirúrgico de sospecha, a través de técnicas de imagen, fuera de neoplasia quística pancreática.

Una buena parte de los tumores (25 casos, 29,76%) se descubrió casualmente, bien en el transcurso de laparotomías realizadas por otros motivos, generalmente resecciones gástricas o intestinales por carcinomas, bien en exploraciones abdominales con técnicas de imagen. Como es previsible, la mayoría de los tumores de pequeño tamaño se detectó de este modo. Cuando se registraron en la historia clínica síntomas causados directamente por el GIST, el dato más frecuentemente reseñado (26 pacientes, 30,95%) fue una hemorragia digestiva, considerada alta en 5 pacientes, baja en 20 pacientes, y con hemoperitoneo en un paciente. La hemorragia fue lo suficientemente copiosa como para causar un cuadro de anemia crónica o aguda clínicamente evidente en 16 pacientes (19,04%). En algunos casos (3 pacientes, 3,57%), la hemorragia digestiva fue de tal magnitud que llegó a requerir una intervención quirúrgica de urgencia.

El siguiente síntoma en importancia fue el dolor abdominal, que se presentó en 11 pacientes (13,09%). El dolor fue de tipo cólico, causado por obstrucción intestinal, en 3 de estos enfermos, que también fueron intervenidos quirúrgicamente de urgencia. En otros 10 pacientes (11,90%), el síntoma clínico dominante fue la sensación subjetiva de masa abdominal, acompañada frecuentemente de dispepsia o de otras molestias imprecisas. En los restantes 12 pacientes, no figuraba en las historias clínicas datos sobre la sintomatología prequirúrgica.

En la fecha de cierre del seguimiento (febrero del año 2004), disponemos de datos de 79 pacientes (94%), mientras que en el caso de los restantes 5 pacientes no existe constancia documental en sus historias clínicas ni en otros registros que permitan conocer su evolución posterior al diagnóstico. Empleando para los estudios estadísticos los datos disponibles en los 79 pacientes seguidos, permanecían con vida y sin evidencia de enfermedad 36 (45,57%), 3 (3,8%) están vivos con GIST metastático y siguiendo tratamiento con mesilato de imatinib, y 40 (50,63%) habían fallecido. De estos últimos, en 16 pacientes (20,25%) había una evidencia contundente para establecer que la muerte estaba relacionada directamente con el GIST, y en los restantes 24 pacientes (30,38%) el fallecimiento se debió a causas ajenas al GIST. El período de seguimiento osciló entre 0 meses, cuando los pacientes murieron en el postoperatorio inmediato, y los 200 meses, contando siempre desde la primera intervención quirúrgica. El seguimiento medio fue de 57,51 meses, con una mediana de 51 meses y una desviación típica de 46,08 meses. Cuando se registraron en la historia clínica, en el caso de los GISTs malignos, uno o más episodios de recidiva local, aparición de implantes intraabdominales o metástasis en el hígado u otros órganos, también tabulamos la fecha de aparición, contando las semanas desde la cirugía inicial.

De las cifras anteriores se deduce que, finalmente, encontramos 19 pacientes con tumores clínicamente malignos entre los 79 pacientes de los que se dispone de seguimiento. En un paciente (número 10), que fue intervenido quirúrgicamente por presentar obstrucción intestinal por un carcinoma colo-rectal con metástasis hepáticas, se descubrió en el momento de esta intervención que tenía un GIST obviamente maligno en el intestino delgado con implantes tumorales múltiples. El paciente falleció poco después - a los cuatro meses de la cirugía - a causa del carcinoma metastático, por lo que lo incluimos en el estudio de supervivencia como dato censurado.

La totalidad de los datos clínicos relevantes se presenta en el Anexo 1.

IV.2 HALLAZGOS HISTOLÓGICOS

Las características microscópicas de los tumores son las habituales de los GIST, esto es, siendo muy heterogéneos sus rasgos entre tumores diferentes, si consideramos cada tumor aisladamente, resultan ser neoplasias bastante homogéneas compuestas por células fusiformes, epitelioides, o por mezclas de estos dos tipos celulares.

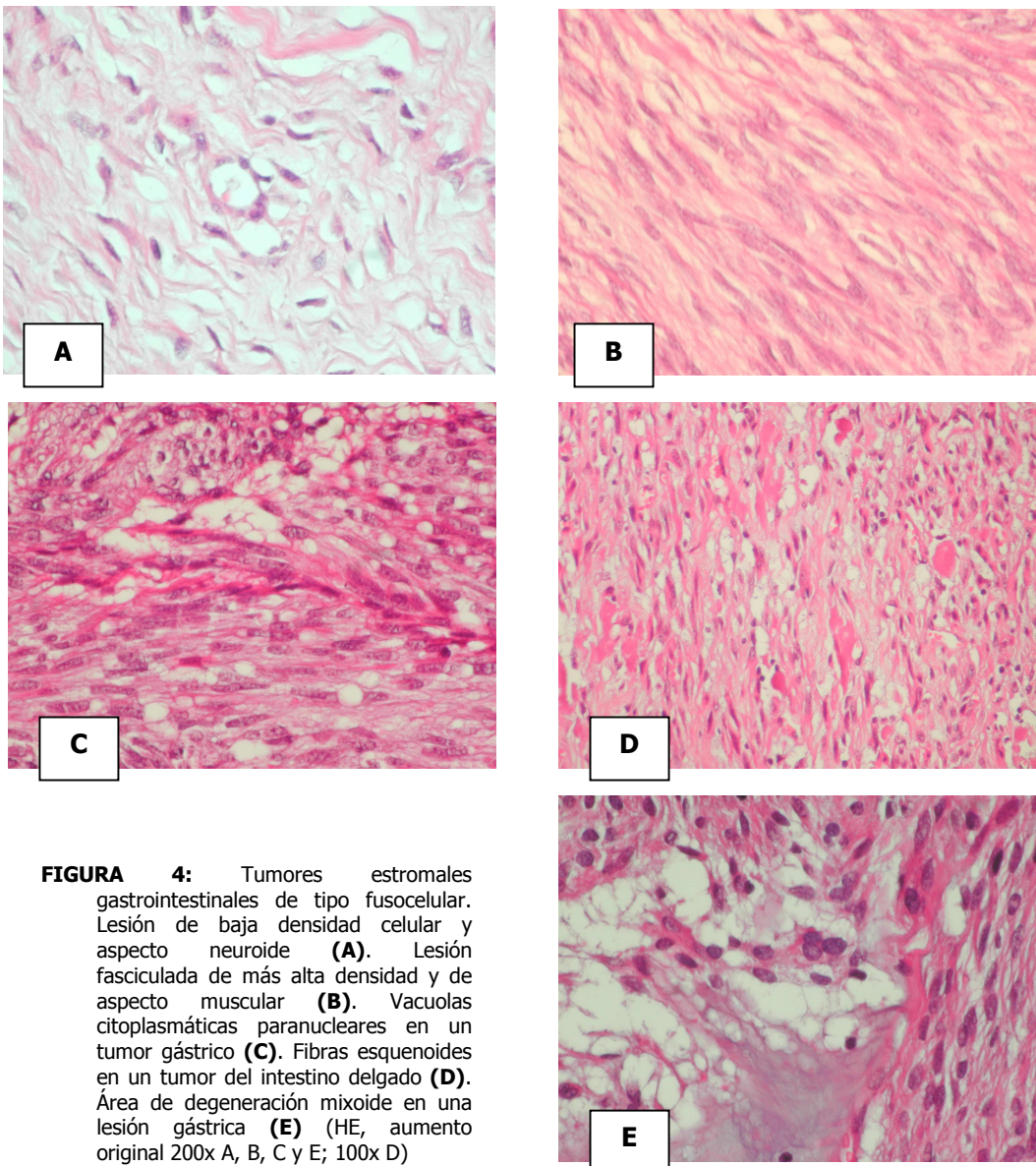


FIGURA 4: Tumores estromales gastrointestinales de tipo fusocelular. Lesión de baja densidad celular y aspecto neuroide **(A)**. Lesión fasciculada de más alta densidad y de aspecto muscular **(B)**. Vacuolas citoplasmáticas paranucleares en un tumor gástrico **(C)**. Fibras esquenoides en un tumor del intestino delgado **(D)**. Área de degeneración mixoide en una lesión gástrica **(E)** (HE, aumento original 200x A, B, C y E; 100x D)

En los tumores fusocelulares (**Figura 4**), las células neoplásicas poseen citoplasmas levemente eosinófilos y fibrilares, más pálidos habitualmente que los de las células musculares lisas. La densidad de la proliferación celular es muy variable, como lo es el patrón histológico. Algunos tumores muestran un patrón fasciculado, frecuentemente con haces cortos o de aspecto estoriforme, mientras que otros carecen por completo de un patrón definido. A veces se observa una agrupación celular con formación de empalizadas, que recuerda a los tumores schwannianos. Los núcleos son bastante uniformes pero de contorno variable dependiendo del caso o del campo, desde núcleos muy elongados y algo serpiginosos – que remedan los de los schwannomas – hasta núcleos perfectamente ovoides o en forma de cigarro puro. No encontramos, al menos de modo generalizado, el elevado grado de pleomorfismo e hiper cromatismo nuclear que puede observarse en otros tumores mesenquimales malignos o sarcomas, tales como en los leiomiomas, que constituyen uno de los principales diagnósticos diferenciales. Sin embargo, si pueden identificarse campos aislados en los que las células neoplásicas muestran núcleos grandes, de contornos irregulares y con un fuerte hiper cromatismo, pero este fenómeno infrecuente – al igual que sucede con muchos tumores endocrinos – no se asocia necesariamente con una mayor actividad mitótica ni con otros rasgos de comportamiento agresivo. Un hallazgo destacado, observado en al menos 8 de nuestros casos es la presencia de numerosas vacuolas citoplasmáticas paranucleares que, en otro tiempo, se creyó que eran un marcador de diferenciación muscular lisa. También observamos en 7 tumores (8,33%) – todos ellos fusocelulares y localizados en el intestino delgado – las llamadas fibras esquenoides, unas partículas de colágeno de rasgos peculiares, hialinas e intensamente eosinófilas, de aspecto globular o fascicular.

Los GISTs de tipo epitelioides se componen de células redondas o poligonales de tamaño medio con citoplasmas eosinófilos o claros (**Figura 5**), llegando a adquirir en al menos un caso un cierto aspecto de células en “anillo de sello”. Los núcleos son uniformes y, en este caso, siempre de contornos redondos u ovoides, con cromatina de patrón vesicular y pequeños cromocentros o nucleolos. Es frecuente la tendencia a la asociación en nidos de las células tumorales, separados por septos fibrovasculares delicados, lo que refuerza la posibilidad de confusión diagnóstica con tumores epiteliales o neuroendocrinos.

Los GISTs de tipo celular mixto muestran, por lo general, una mezcla compleja e íntima de elementos fusocelulares y de células epitelioides con diferentes formas de transición. Son mucho más infrecuentes los tumores que presentan transiciones abruptas de un patrón histológico a otro.

En lo que atañe al tipo histológico de los tumores de esta serie, 57 casos (67,9%) son de tipo fusocelular, 12 (14,3%) son de tipo epiteliode, y 15 tumores (17,9%) son mixtos.

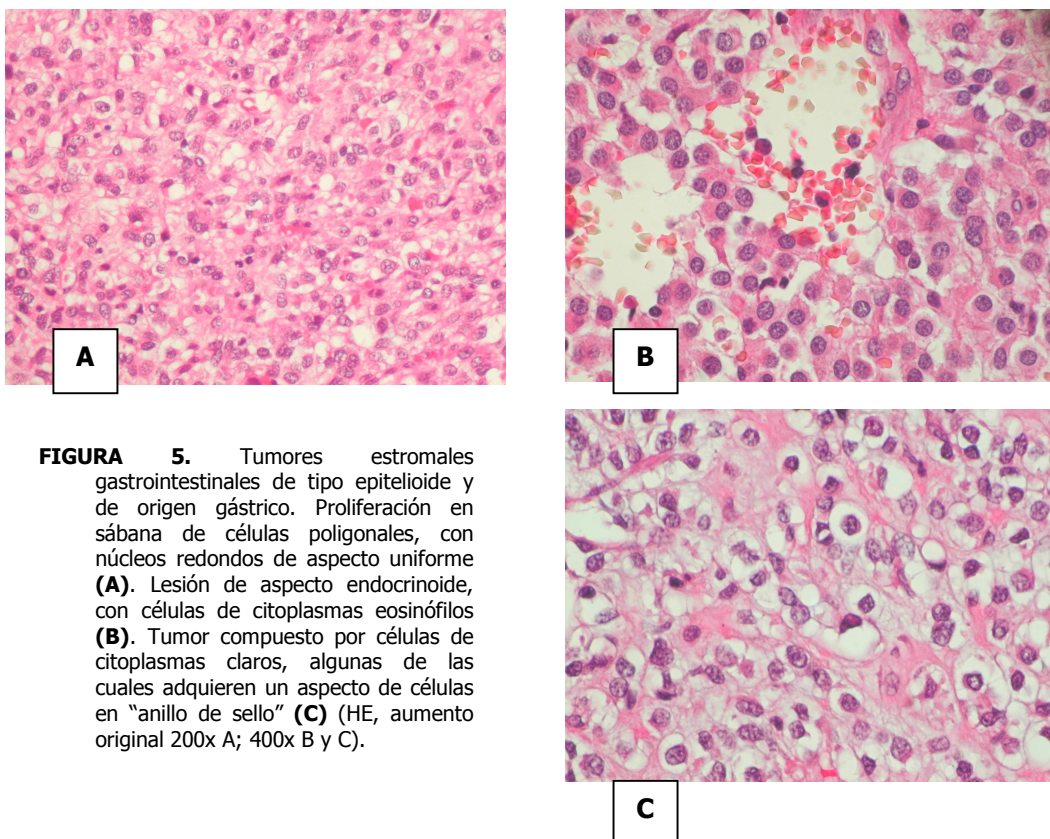


FIGURA 5. Tumores estromales gastrointestinales de tipo epiteliode y de origen gástrico. Proliferación en sábana de células poligonales, con núcleos redondos de aspecto uniforme **(A)**. Lesión de aspecto endocrinoide, con células de citoplasmas eosinófilos **(B)**. Tumor compuesto por células de citoplasmas claros, algunas de las cuales adquieren un aspecto de células en "anillo de sello" **(C)** (HE, aumento original 200x A; 400x B y C).

El número de mitosis por 50 CGA oscila entre ninguna y 110, con una media de 6,68, una mediana de 1 mitosis, y una desviación típica de 19,13. El número de tumores que muestra 5 M/50 CGA o menos es de 67 (79,8%), hay 7 tumores (8,3%) con un número de mitosis entre 6 y 10 por 50 CGA, y 10 lesiones (11,9%) presentan más de 10 M/50 CGA. Un hecho percibido de manera inmediata es que existe una fuerte relación entre el tamaño y el número de mitosis, de tal manera que en sólo 4 de los 44 tumores de 5 cm o menos de diámetro encontramos más de 5 M/50 CGA.

La aplicación directa de la propuesta de Fletcher y colaboradores (Fletcher *et al.*, 2002^a) que define el riesgo de comportamiento agresivo del GIST en función del tamaño tumoral y el número de mitosis (Tabla 1) da los siguientes resultados: 16 tumores (19%) son de riesgo MUY BAJO, 24 (28,6%) de riesgo BAJO, 18 (21,4%) de riesgo INTERMEDIO, y 26 (31%) de riesgo ALTO **(Tabla 6)**.

En 16 tumores (19%) encontramos áreas de necrosis más o menos extensas, y solo dos de ellos medían menos de 5 cm en dimensión máxima. La hemorragia es un fenómeno presente con mucha mayor frecuencia, y lo encontramos en 47 de los 84

MITOSIS	TAMAÑO			
	Menos de 2 cm	2-5 cm	5-10 cm	Más de 10 cm
Menos de 5 M/50 CGA	16 (100%) ^a	24 (85,7%) ^b	15 (78,9%) ^c	12 (57,1%) ^d
5-10 M/50 CGA	0 (0%) ^c	3 (10,7%) ^c	2 (10,5%) ^d	2 (9,5%) ^d
Más de 10 M/50 CGA	0 (0%) ^d	1 (3,6%) ^d	2 (10,5%) ^d	7 (33,3%) ^d
TOTAL	16 (100%)	28 (100%)	19 (100%)	21 (100%)

NOTAS: ^a Muy bajo riesgo, ^b Bajo riesgo, ^c Riesgo intermedio, ^d Alto riesgo

TABLA 6. Tamaño y tasa de mitosis de los GISTs de esta serie.

tumores (56%). Mientras que vemos a menudo la ulceración de la mucosa, la infiltración de la misma – entendida como la interposición anárquica de células neoplásicas en la lámina propia de la mucosa entre las glándulas preexistentes – es muy rara. La primera circunstancia fue detectada en 22 de 71 casos evaluables (31%) y la infiltración neoplásica, sin embargo, en sólo un caso de los 73 tumores que pudimos valorar (1,4%).

Respecto al grado histológico de los GISTs, a ninguno de ellos se le asignó un grado 3 lo que es previsible si se atiende a que muy raramente, si sucede alguna vez, estos tumores muestran la profunda atipia y el nivel de pleomorfismo nuclear que puede verse en muchos otros tumores malignos de partes blandas. Por otra parte, las mitosis casi siempre son escasas, lo que suele obligar a una contabilidad minuciosa y lenta de las mismas, y nunca son atípicas. Finalmente, 61 de los 84 tumores (72,6%) son de grado 1 y los restantes 23 (27,4%) son de grado 2.

En contraste con los GISTs, los leiomiomas del tracto gastrointestinal que hemos estudiado muestran rasgos idénticos a los leiomiomas de otras localizaciones, esto es, son tumores de menor densidad celular, con un patrón fasciculado más definido y aspecto más uniforme, con células de citoplasmas fibrilares con intensa eosinofilia, y con núcleos que presentan la característica forma de cigarro puro, con extremos romos. La

ausencia de mitosis es la norma y nunca encontramos necrosis. Los schwannomas que identificamos en la búsqueda, todos ellos gástricos, muestran un manto de celularidad linfoide a su alrededor, con formación incluso de folículos dotados de centros germinales. Además, se observa un patrón festoneado organoide en al menos algunos puntos de las secciones. Sin embargo, los rasgos morfológicos de los GISTs, de los leiomiomas y de los schwannomas se solapan ampliamente, y en muchos casos sólo pudimos resolver este diagnóstico diferencial con la ayuda de las tinciones inmunohistoquímicas. Los leiomiosarcomas son tumores obviamente malignos, con un marcado pleomorfismo nuclear y numerosas mitosis, siendo fáciles de diferenciar de los GISTs. La fibromatosis o tumor desmoide mesentérico se distingue del GIST por su contorno mal definido, frecuentemente infiltrativo, y su marcada colagenización.

Hemos contado directamente el número de células completas presentes en los cilindros de los TMAs que corresponden a los GISTs. El número medio de células es de 299,7; con una mediana de 299,5; y una desviación típica de 61,75. el número mínimo es de 188 células y el máximo de 465 células.

En el Anexo 2 están tabulados todos los datos morfológicos, macro y microscópicos, observados en los 84 GISTs.

IV.3 HALLAZGOS INMUNOHISTOQUÍMICOS

De los 84 tumores estudiados, la inmunotinción para KIT (CD117) efectuada sobre secciones completas es positiva en 79 casos (94%), mientras que uno de estos tumores (número 59) perdió la expresión de este marcador cuando se evaluó el resultado en los TMAs. En los otros 5 no logramos demostrar expresión de CD117, no obstante y como ya hemos dicho, sus características clínicopatológicas fueron lo suficientemente explícitas como para mantener el diagnóstico de GIST. En 57 de los 78 tumores positivos en los TMAs, la inmunotinción es intensa y en la mayoría de las células neoplásicas, con expresión citoplasmática ligeramente reforzada en la zona submembranosa de las células (**Figura 6**). En los 21 tumores restantes, la tinción para CD117 es más débil y/o más focal, y se percibe en algunos tumores un patrón de gota citoplasmática paranuclear. En todas las restantes lesiones estudiadas, incluyendo en ellas las dos fibromatosis mesentéricas, la inmunotinción para CD117 es completamente negativa.

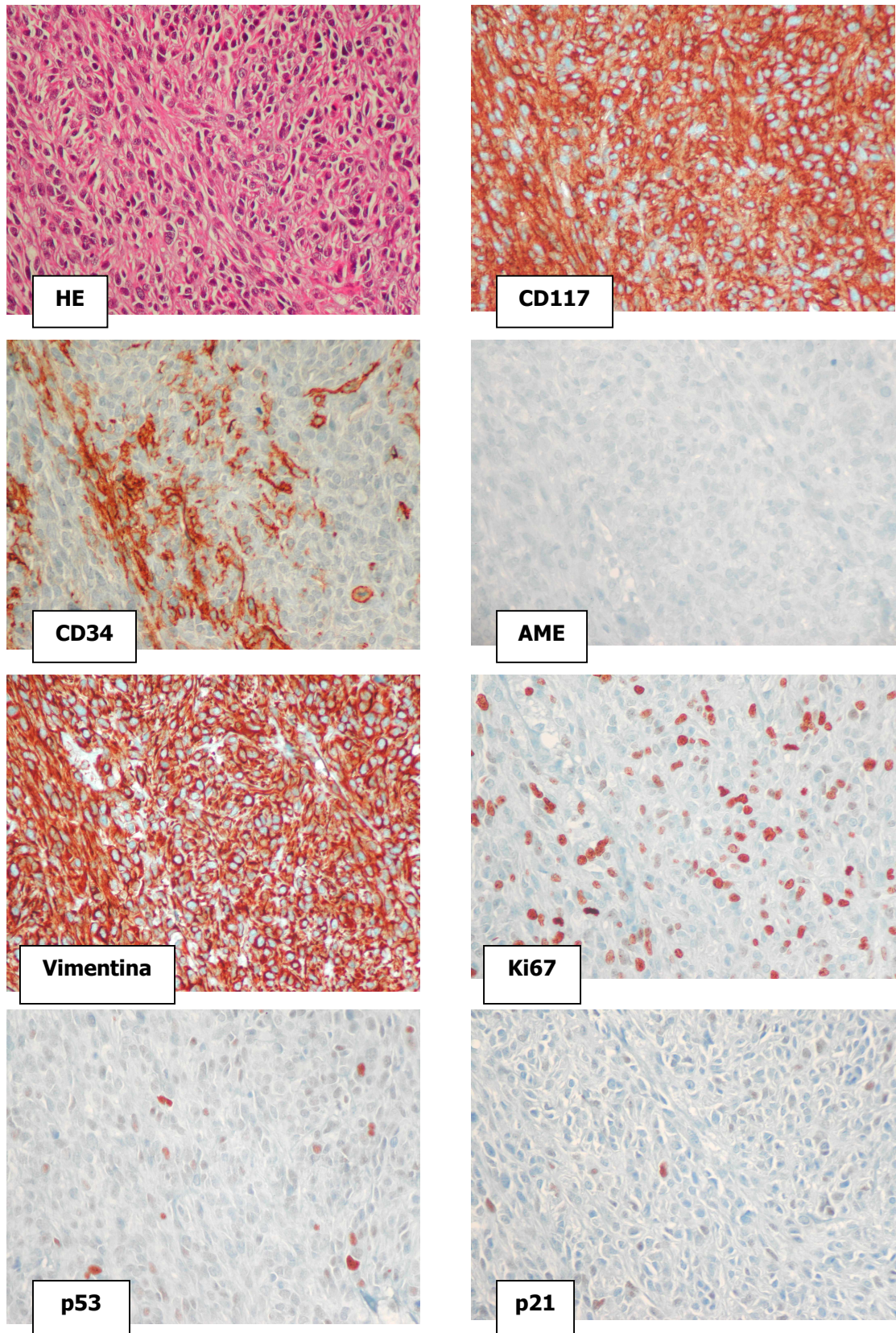


FIGURA 6. TMA2 (A8). Tumor estromal gastrointestinal (GIST) de 3,5 cm de diámetro y de localización ileal, de características morfológicas malignas. Véase la inmunotinción intensa de CD117 y de vimentina, así como el elevado porcentaje de núcleos teñidos con Ki67 y p53 (HE, avidina-biotina-peroxidasa-DAB contrateñida con hematoxilina, aumento original: 200x).

La tinción para CD34 es positiva en un número menor de casos (66 tumores, 78,6%). La expresión citoplasmática de este marcador es fuerte y extensa en 45 de estos 66 tumores, y más débil en los 21 restantes. En solo uno de los 5 tumores CD117 negativos la tinción para CD34 es positiva. Encontramos, además, una llamativa diferencia en la expresión de este marcador en función de la localización del tumor y así, mientras que el 93,5% de las lesiones gástricas se tiñen con CD34 (43 de 46), sólo lo hacen el 56,7% de los tumores situados en el intestino delgado (17 de 30). Esta diferencia de expresión es estadísticamente significativa ($p < 0,0001$).

Con la proteína S100 se observa una inmunotinción positiva en 13 de los 84 casos (15,5%). Esta tinción es siempre débil y focal excepto en 2 de los 13 tumores positivos, en los que la tinción es más intensa. Sin embargo, en solo uno de los casos (caso 27) se observa una expresión débil de GFAP. Este tumor fue clínicamente maligno, y expresa otros marcadores tales como S100, desmina o AME.

En cuanto a los marcadores utilizados para detectar una diferenciación muscular, la desmina es positiva en 9 tumores (10,7%) y la AME en 8 tumores (9,5%). La inmunotinción para estos dos anticuerpos es compartida en 7 casos. La inmunotinción para la vimentina es intensa en casi todos los GISTs estudiados, y solo en dos tumores se registra una expresión negativa, probablemente causada por una pérdida general de antigenicidad del tejido, pues son casos también negativos para otros muchos marcadores, incluido el CD117.

MARCADOR	Secciones completas	Secciones TMAs
CD117	79/84 (94%)	78/84 (92,9%)
CD34	67/84 (79,8%)	66/84 (78,6%)
S-100	8/45 (17,8%)	13/84 (15,5%)
AME	9/45 (20%)	8/84 (9,5%)
Desmina	6/43 (13,9%)	9/84 (10,7%)
GFAP	1/38(2,6%)	1/84 (1,2%)
β-catenina	0/27 (0%)	0/82 (0%)
Vimentina	82/84 (97,6%)	82/84 (97,6%)

TABLA 7. Comparación de los resultados inmunohistoquímicos entre la tinción de secciones completas y de secciones de los TMAs. El marcador de resultados más dispares es la AME, a causa de su expresión muy focal en el GIST.

Si comparamos estos resultados del estudio inmunohistoquímico realizado sobre los TMAs con los resultados obtenidos con las secciones completas, que sirve de referencia o *gold-standard* (**Tabla 7**), comprobamos que la correlación es muy buena, con la única excepción, lógica pero no muy relevante, de uno de los marcadores que se pueden expresar en el GIST de un modo muy focal: la AME.

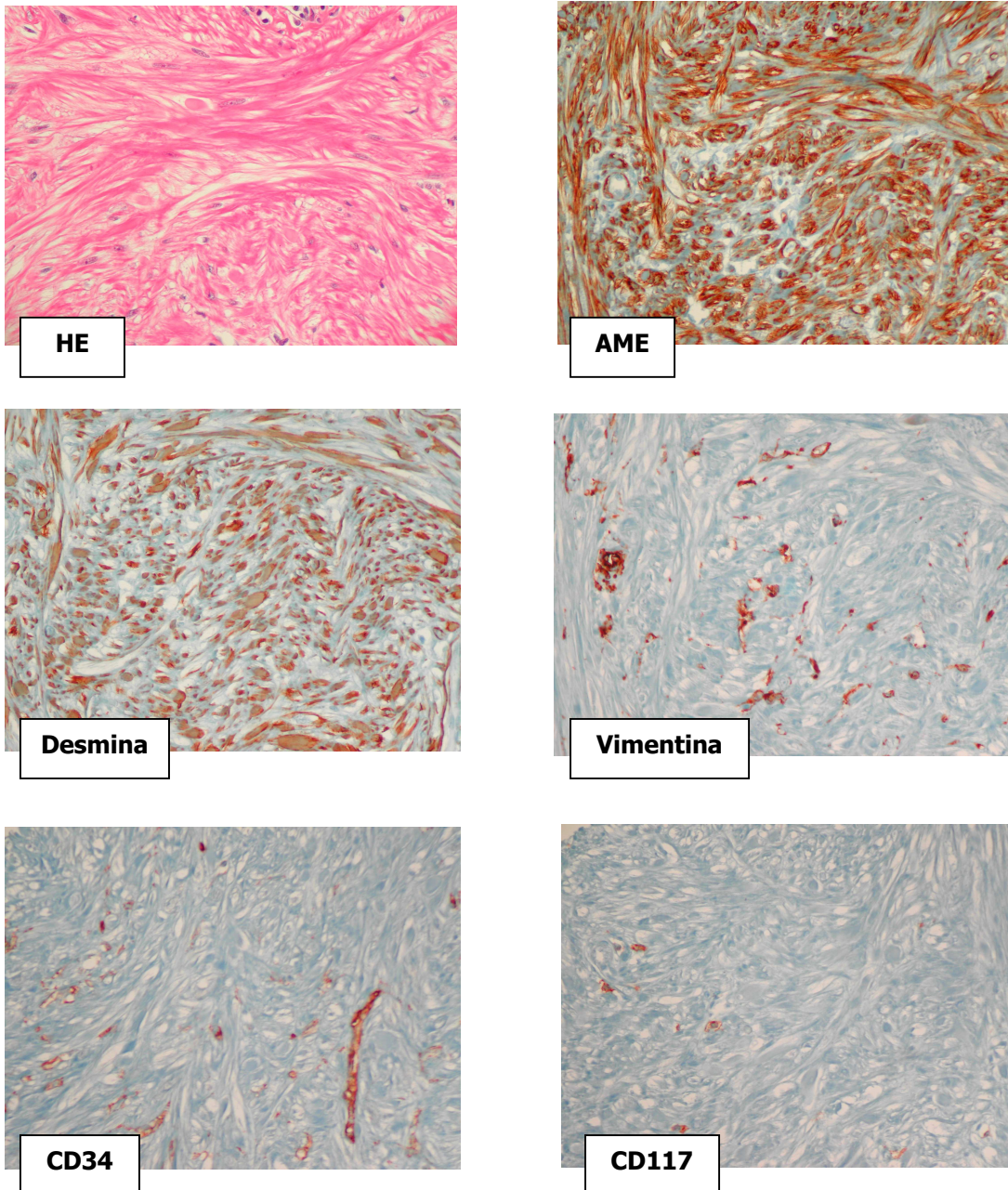


FIGURA 7. TMA 1 (B4). Leiomioma rectal dependiente de la *muscularis mucosae*, de 0,6 cm de diámetro. Obsérvese la expresión contundente de AME y desmina, y la inmunotinción negativa para vimentina, CD34 y CD117. En esta última se tiñen algunos mastocitos (HE, avidina-biotina-peroxidasa-DAB contrateñida con hematoxilina, aumento original: 200x).

En los doce leiomiomas estudiados (**Figura 7**) la expresión inmunohistoquímica de la desmina y de la AME es difusa e intensa, siempre mayor que en los GISTs que son positivos para estos marcadores. La tinción para CD34 es siempre negativa, con la excepción evidente de los endotelios vasculares. Llama la atención también la negatividad universal de la tinción para la vimentina en los tumores de músculo liso. Los dos leiomiosarcomas incluidos en los TMAs muestran un inmunofenotipo idéntico al de los tumores benignos.

Los cinco schwannomas resultaron intensamente positivos, con el habitual patrón mixto de tinción nuclear y citoplasmático, para la proteína S-100 (**Figura 8**). La intensidad de la expresión de GFAP es más variable pero, en cualquier caso, todos los schwannomas son positivos para este marcador.

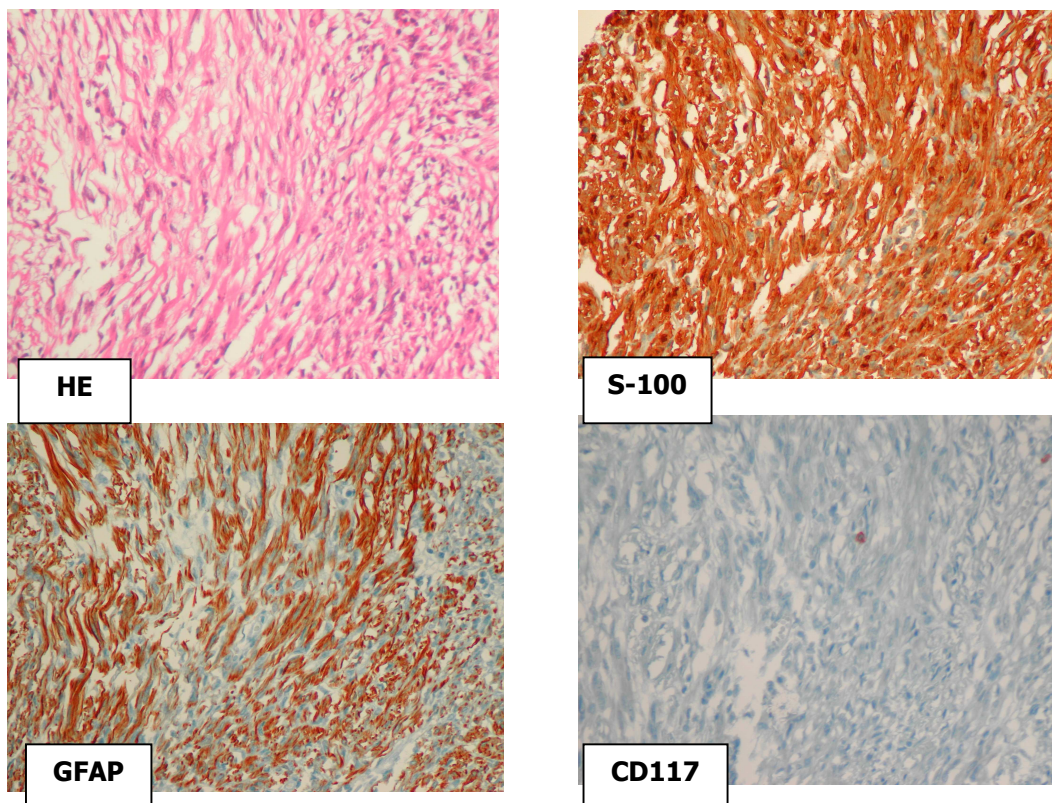


FIGURA 8. TMA 2 (H2). Schwannoma gástrico, de 12 x 9,5 cm, etiquetado inicialmente como GIST. Además de la valoración de sus características morfológicas generales, la expresión generalizada e intensa de S-100 y GFAP, con una inmunotinción negativa para CD117, conducen al diagnóstico correcto (HE, avidina-biotina-peroxidasa-DAB contrateñida con hematoxilina, aumento original: 200x).

La expresión de β -catenina se limita a las dos fibromatosis incluidas en el estudio, sin que identifiquemos inmunoreactividad en los GISTs, schwannomas o tumores de músculo liso. La expresión en las fibromatosis es nuclear, y se aprecia en la mayoría de las células.

La **tabla 8** resume estos resultados del estudio inmunohistoquímico básico de los GISTs, y los compara con las principales entidades implicadas en el diagnóstico diferencial que hemos recuperado de nuestros archivos en el curso de este trabajo, y que incluimos en los TMAs: 12 leiomiomas, 5 schwannomas y 2 fibromatosis (tumor desmoide), todos ellos situados en relación directa con el tubo digestivo.

	KIT	CD34	S100	GFAP	DESM	AME	VIM	β-CAT
GIST	+ (78/84)	+/- (66/84)	-/+ (13/84)	neg (1/84)	-/+ (9/84)	-/+ (8/84)	+ (81/83)	neg (0/84)
LEIOMIOMA	neg (0/12)	neg (0/12)	neg (0/12)	neg (0/12)	+ (12/12)	+ (12/12)	neg (0/12)	neg (0/12)
SCHWANNOMA	neg (0/5)	neg (0/5)	+ (5/5)	+ (5/5)	neg (0/5)	neg (0/5)	+ (5/5)	neg (0/5)
FIBROMATOSIS	neg (0/2)	neg (0/2)	neg (0/2)	neg (0/2)	neg (0/2)	+/- (1/2)	+ (2/2)	+ (2/2)

NOTA. DESM: desmina, AME: actina músculo-específica, VIM: vimentina, β -CAT: β -catenina.

TABLA 8: Resultados del estudio inmunohistoquímico con los marcadores de valor diagnóstico en el GIST y otros tumores mesenquimales del tubo digestivo. Están resaltados en negrita los resultados más informativos en el diagnóstico diferencial.

El número de núcleos teñidos con Ki67 (MIB-1), contabilizados como la media del resultado obtenido en los dos cilindros de cada GIST en los TMAs (Ki67_med), oscila entre ninguno y 189, con una media de 12,06, una mediana de 3,75 y una desviación estándar de 24,7. También hicimos una valoración de la inmunotinción para Ki67, atendiendo exclusivamente al cilindro con el número máximo de núcleos teñidos (Ki67_máx). En este último caso, las cifras oscilan entre 0 y 195, la media es de 14,92, la mediana es de 5, y la desviación típica es de 27,11. Dado que el número medio de núcleos por cilindro en los TMAs es casi 300, el resultado de dividir entre 3 el valor de KI67_med nos dará muy aproximadamente la expresión de este marcador como porcentaje de núcleos teñidos, parámetro que recibe el nombre de índice MIB-1. El índice MIB-1 en nuestra serie de GISTs oscila entre 0 y 63%, con 17 tumores mostrando un índice de 5 o superior.

Recientemente, Kindblom (Kindblom, 2004) propuso una aproximación pronóstica a los GISTs que probablemente sea más atinada que la clasificación de consenso vigente ya comentada (Fletcher *et al.*, 2002^a). Esta propuesta se basa en la asignación a cada lesión de una puntuación o *score* resultado de la suma directa del tamaño del tumor, expresado como su diámetro mayor en centímetros, y del índice MIB-1. Kindblom comenta que un valor mayor de 7 implicaría un pronóstico peor. La aplicación de esta propuesta a nuestra serie da un *score* mínimo de 1 y uno máximo de 67, con una media de 11,6, una mediana de 6,17 y una desviación típica de 11,98. En 47 de los 84 GISTs (56%) el *score* se sitúa entre 1 y 7 (BAJO RIESGO), 14 tumores (16,7%) tienen una puntuación situada entre 8 y 15 (RIESGO INTERMEDIO), y en los 23 restantes (27,3%) el *score* es de 16 o más puntos (ALTO RIESGO). En la **tabla 9** se muestra el comportamiento clínico de los GISTs en función del *score* asignado con esta estratificación.

COMPORTAMIENTO CLÍNICO			
Puntuación	BENIGNO	MALIGNO	TOTAL
1-7	42 (97,7%)	1 (2,3%)	43 (100%)
8-15	11 (84,6%)	2 (15,4%)	13 (100%)
> 15	7 (30,4%)	16 (69,6%)	23 (100%)

TABLA 9. Comportamiento clínico de los GISTs en función de la puntuación asignada sumando el diámetro mayor, expresado en centímetros, y el índice MIB-1.

El número de GISTs que resultan positivos para BAX y c-myc es muy elevado, y se observa una apreciable tinción de fondo que dificulta considerablemente la valoración de los resultados. En el caso del BAX, 67 tumores son positivos y 17 negativos, mientras que con c-myc encontramos 70 tumores positivos y 13 negativos. La inmunohistoquímica para p53, BCL-2 y p27 es de mayor calidad y permite hacer una valoración más precisa. Con p53 vemos 43 tumores negativos (0), 27 con expresión débil (1), y 12 con una expresión intensa (2). Con BCL2 los resultados son de 42 casos, 28 casos y 13 casos en cada una de las tres categorías mencionadas para el p53; y para p27 encontramos 59, 20 y 4 tumores, respectivamente. La inmunotinción para ciclina D1, pRb y p21 no permite matizar la intensidad y solo la consideramos positiva o negativa. En el caso de la ciclina D1, 60 tumores son negativos y 24 positivos; con pRb, 56 son negativos y 27 positivos; y

con p21, 46 son negativos y 37 positivos. Siempre que la suma de los tumores no alcanza la cifra de 84, son casos cuyos cilindros se perdieron en el proceso de tinción y montaje de las preparaciones de los TMAs.

Como se dijo anteriormente, se ha propuesto una modificación en las condiciones técnicas en las que se debe realizar la inmunotinción para CD117, con el fin de eliminar las indeseables reacciones que se observan con este anticuerpo en algunas entidades que como la fibromatosis (tumor desmoide), lo que puede provocar problemas adicionales en el diagnóstico diferencial (Lucas *et al.*, 2003). Estas modificaciones consisten en esencia en emplear una dilución a 1:250 del anticuerpo policlonal más ampliamente utilizado (A4502, DAKO), en vez de la dilución recomendada por el proveedor de 1:100, y sin efectuar un desenmascaramiento antigénico con calor. La aplicación estricta de este protocolo al proceso de tinción inmunohistoquímica de los dos TMAs provocó que solo en 68 GISTs se obtuviera una reacción positiva, siempre de intensidad más ligera que en la inmunotinción original (**Figura 9**). En consecuencia, la sensibilidad de la tinción en la identificación de los GISTs bajó desde un 92,9% (78 de 84 tumores) a un 81% (68 de 84 tumores).

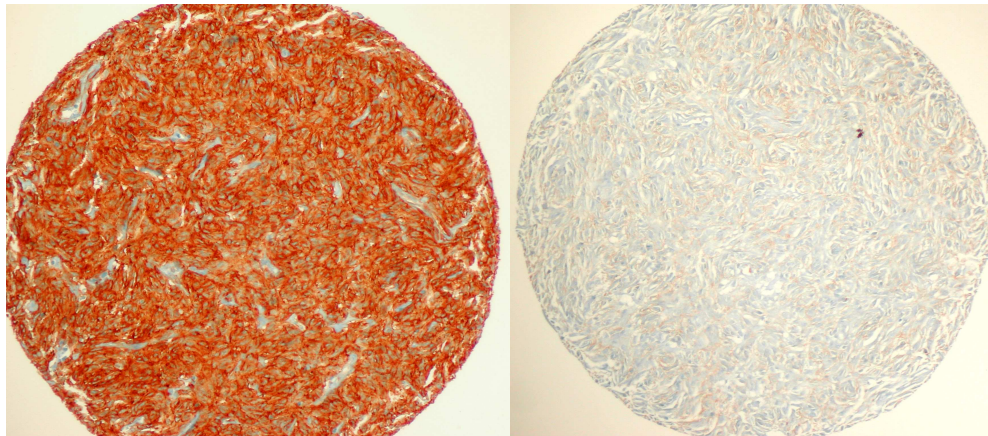


FIGURA 9. TMA 2 (B3). GIST, inmunotinción para CD117. Izquierda: dilución de trabajo de 1:100, con recuperación antigénica por calor. Derecha: dilución de 1:250, sin desenmascaramiento antigénico. La expresión se pierde casi por completo (CD117, anticuerpo policlonal A4502, DAKO, aumento original 40x)

La totalidad de los resultados obtenidos en el estudio inmunohistoquímico en los 84 GISTs se muestra en el Anexo 3.

IV.4 HALLAZGOS ULTRAESTRUCTURALES

El examen ultraestructural realizado en 16 de los 84 tumores demostró una diferenciación muscular incompleta o abortiva en 5 de ellos (31,3%). En 7 tumores se encontraron rasgos morfológicos que sugieren diferenciación neural (43,8%) y, por ello, fueron calificados en su momento de GANTs. Finalmente, en 4 tumores (25%) los signos de diferenciación fueron ambiguos o mixtos, con marcadores ultraestructurales tanto musculares como neurales.

No parece existir ninguna relación entre la diferenciación de las neoplasias, según se desprende del estudio ultraestructural, y los resultados de las tinciones inmunohistoquímicas realizadas sobre los TMAs. Así, solo uno de estos 16 GISTs estudiados, con diferenciación dual por microscopía electrónica, resulta ser positivo para S-100, mientras que los 7 tumores "neurales" son negativos. De los 5 tumores con diferenciación muscular ultraestructural, en solo uno de ellos se encuentra expresión de desmina, siendo negativa en todos los casos la AME. Todos los tumores estudiados expresan CD117 y, con CD34, se tiñen también todos los tumores "musculares" mientras que 2 de los 7 tumores "neurales" son negativos para este último marcador.

IV.5 ANÁLISIS PRONÓSTICO

Como ya hemos dicho, la definición de malignidad en este trabajo deriva exclusivamente del comportamiento clínico de cada tumor. Así, son malignos todos aquellos casos en los que se registró en la historia clínica la existencia de recidivas intraabdominales o metástasis, suceso que ocurrió en 19 pacientes (22,6%), de los cuales 16 fallecieron por la enfermedad y los otros tres sobrevivían en el momento de cierre del seguimiento, y estaban a tratamiento con imatinib. En un paciente (número 10) ya en la cirugía inicial se observaron numerosos implantes tumorales en la cavidad abdominal. Por ello, aunque falleció a las pocas semanas de la cirugía por otra causa, lo hemos considerado también como ejemplo de GIST maligno, pero sólo a efectos del estudio inmunohistoquímico, sin trasladar este caso al estudio de la supervivencia.

IV.5.1 COMPARACIÓN DE MEDIAS DE VARIABLES CUANTITATIVAS

La comparación de las medias de las variables cuantitativas – edad, tamaño tumoral, número de mitosis y número medio de núcleos teñidos con Ki67 (MIB-1)– entre los grupos de pacientes con tumores clínicamente benignos y malignos, utilizando para ello el test de la U de Mann-Whithney, revela la existencia de diferencias significativas en tres de estas variables: el tamaño, las mitosis y el índice MIB-1, todas ellas con una p menor de 0,001. La edad, sin embargo, no difiere entre ambos grupos ($p = 0,210$).

Cuando las comparaciones se establecen por órgano afecto (estómago *versus* intestino delgado), no encontramos diferencias en los parámetros estudiados (edad, $p = 0,190$; tamaño, $p = 0,369$; mitosis, $p = 0,227$; Ki67, $p = 0,316$).

Cuando comparamos por sexos los cuatro parámetros antes indicados, encontramos que sólo el tamaño resulta significativamente diferente ($p = 0,023$), siendo mayor en el sexo masculino.

IV.5.2 CORRELACIONES

En nuestra serie, el sexo de los pacientes no guarda una relación estadísticamente significativa con el pronóstico. Sin embargo, sí encontramos una correlación en el límite de la significación estadística ($p = 0.044$) entre el sexo y la valoración del riesgo, si agrupamos los tumores considerados de muy bajo y bajo riesgo, por un lado, y los de riesgo intermedio y alto, por el otro. En este caso, los tumores de mayor agresividad teórica aparecen en los varones. También observamos una fuerte asociación entre el sexo y el órgano afecto ($p = 0,006$), con un predominio reforzado (75,7%) de los tumores gástricos sobre los situados en el intestino delgado en las mujeres, en relación con la frecuencia observada en los varones (46,2%). También vemos (**Tabla 10**), con nivel de significación estadística ($p = 0,004$), que el comportamiento de los GISTs depende de la localización de los tumores, si atendemos exclusivamente a los dos segmentos del tubo digestivo en los que asientan con mayor frecuencia: el estómago y el intestino delgado. Mientras que en el estómago tan solo mostraron un comportamiento clínico adverso un 10,87% de los tumores, en el intestino delgado se alcanzó una cifra del 40%.

Otro de los parámetros que no tienen valor pronóstico pero que sí tiene una fuerte relación con el órgano en el que asienta el tumor es la inmunotinción para CD34. Un inmunofenotipo positivo para este marcador es mucho más común en los tumores del

estómago (43 de 46, 93,5%) que en los del intestino delgado (17 de 30, 56,7%). Por el contrario, no hay diferencias de expresión para la desmina, AME o S-100 según el órgano afecto.

Variable	Tumores benignos	Tumores malignos	τ de Kendall
Edad			
< 70 años	33 (54,1%)	12 (63,2%)	p = 0,48
70 años o más	28 (45,9%)	7 (36,8%)	
Sexo			
Varón	30 (46,9%)	12 (60%)	p = 0,302
Mujer	34 (53,1%)	8 (40%)	
Órgano			
Estómago	41 (69,5%)	5 (29,4%)	p = 0,004
Intestino delgado	18 (30,5%)	12 (70,6%)	
Tamaño			
< 5 cm	38 (59,4%)	2 (10%)	p < 0,001
5 cm o mayor	26 (40,6%)	18 (90%)	
Mitosis			
< 5 / 50 CGA	59 (92,2%)	8 (40%)	p < 0,001
5 ó más / 50 CGA	5 (7,8%)	12 (60%)	
Necrosis			
No	54 (84,4%)	14 (70%)	p = 0,206
Sí	10 (15,6%)	6 (30%)	
Hemorragia			
No	32 (50%)	5 (25%)	p = 0,037
Sí	32 (50%)	15 (75%)	
Grado histológico			
1	52 (81,3%)	9 (45%)	p = 0,006
2	12 (18,8%)	11 (55%)	
Ki67			
< 15 núcleos	60 (93,8%)	7 (35%)	p < 0,001
15 núcleos o más	4 (6,3%)	13 (65%)	
p53			
Negativo	38 (60,3%)	5 (26,3%)	p = 0,008
Positivo	25 (39,7%)	14 (73,7%)	
p21			
Negativo	37 (58,7%)	9 (45%)	p = 0,286
Positivo	26 (41,3%)	11 (55%)	
p27			
Negativo	47 (74,6%)	12 (60%)	p = 0,239
Positivo	16 (25,4%)	8 (40%)	
BCL-2			
Negativo	33 (51,6%)	9 (47,4%)	p = 0,748
Positivo	31 (48,4%)	10 (52,6%)	
BAX			
Negativo	14 (21,9%)	3 (15%)	p = 0,472
Positivo	50 (78,1%)	17 (85%)	
Ciclina D1			
Negativo	45 (70,3%)	15 (75%)	p = 0,677
Positivo	19 (29,7%)	5 (25%)	
c-myc			
Negativo	9 (14,3%)	4 (20%)	p = 0,568
Positivo	54 (85,7%)	16 (80%)	

TABLA 10. Relaciones entre el comportamiento clínico de los GISTs y otras variables.

El tipo histológico (epiteliode vs. fusocelular) no tiene valor pronóstico, pero sí encontramos una fuerte relación con el órgano afectado (p = 0,004), pues los 11 tumores puramente epiteliodes identificados estaban situados en el estómago, donde

otros 10 fueron calificados de mixtos. Sin embargo, todos los tumores intestinales fueron fusocelulares, excepto 3 que eran mixtos. No observamos que exista una asociación entre la carencia de expresión de CD117 y el tipo tumoral epitelioides en nuestra serie, y los cinco tumores negativos para CD117 en la tinción de secciones completas son del tipo fusocelular. Aunque nuestros datos no confirman la relevancia de la necrosis en la identificación de los GIST de comportamiento agresivo, la hemorragia sí se sitúa por encima del límite de la significación estadística ($p = 0,037$). Ambos parámetros morfológicos guardan, sin embargo, una estrecha relación con el tamaño de los tumores ($p < 0,001$). Ni la degeneración quística ni la presencia de fibras esquenoides tienen valor pronóstico. Sí vemos que la quistificación es más frecuente en los tumores gástricos, órgano en el que el 32,6% de las lesiones muestran áreas de degeneración quística, mientras que sólo se ve en el 7,4% de los intestinales. Lo contrario sucede con las fibras esquenoides, que identificamos en 7 de 29 tumores intestinales (24,1%) y en ninguno de los 46 tumores gástricos. Un dato morfológico de gran importancia pronóstica es el grado histológico de las neoplasias ($p = 0,006$). De los 61 tumores de grado 1, solo 9 mostraron un comportamiento clínico maligno (14,8%), mientras que fueron malignos 11 de los 23 tumores de grado 2 (47,8%).

De todos los marcadores inmunohistoquímicos relacionados con el ciclo celular y la apoptosis, el único que demuestra tener valor pronóstico es p53 (**Tabla 8**). En 25 de los 63 (39,7%) tumores benignos clínicamente la inmunotinción fue positiva, mientras que en los malignos se observó positividad en 14 de los 19 casos (73,7%). El número de núcleos teñidos con p53, incluso en los casos con una expresión más contundente de este marcador, suele ser bajo en el caso de los GISTs por lo que optamos por considerar positivos todos los tumores en los que encontramos tinción nuclear, sin determinar el porcentaje de células teñidas. Aunque ni la inmunotinción para p21 ni para p27 aportaron información pronóstica, sí se percibe un marcado paralelismo en la expresión de estos dos marcadores, entre ellos, y con p53. El análisis de esta asociación mediante el test de chi-cuadrado y, en su caso, el test exacto de Fisher, muestran que la asociación es significativa, con una $p < 0,001$ en el caso de p53 y p21, una $p = 0,002$ en el caso de p53 y p27, y una $p = 0,002$ entre p21 y p27. En lo que atañe a p27, su tinción – ya sea positiva o negativa – coincide con la de p53 en 54 de los 82 tumores valorables (65,9%), y con p21 esta coincidencia se aprecia en 58 de los 82 tumores valorables (69,5%).

El coeficiente de correlación de Spearman para analizar la correlación entre el número de mitosis y el número de núcleos teñidos con Ki67, ambos expresados como parámetros escalados, es de 0,715 ($p < 0,001$).

IV.5.3 ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA. MODELO DE KAPLAN-MEIER

Los resultados de someter las variables que tienen un valor pronóstico potencial en los 84 pacientes con GISTs a un análisis de supervivencia, mediante el método de Kaplan-Meier y con resultados comparados con el logaritmo del rango, se muestran en la **Tabla 11.**

FACTOR	LOG. RANGO	SIGNIFICACIÓN
Sexo	0,48	0,4878
Edad (mayor/menor 70 años)	0,00	0,9593
Tamaño (mayor/menor 10 cm)	32,77	<0,0001
Tamaño (<2cm, 2-5 cm, 5-10 cm, >10cm)	29,19	<0,0001
Mitosis (<5, 5-10, >10/50CGA)	25,83	<0,0001
Mitosis (más/menos 5/50 CGA)	20,61	<0,0001
Riesgo (alto vs. otros)	44,86	<0,0001
Puntuación (<i>score</i>)	42,39	<0,0001
Tipo (fusocelular/epitelioide/mixto)	1,09	0,5792
Necrosis	3,86	0,0495
Hemorragia	2,23	0,1357
Órgano (estómago vs. int. delgado)	7,19	0,0073
Ulceración	2,11	0,1463
Degeneración quística	0,25	0,6201
Grado histológico	8,53	0,0035
Ki67 (más/menos 20 núcleos teñidos)	32,45	<0,0001
BCL2	0,20	0,6564
BAX	0,04	0,8431
p53	9,57	0,0020
Ciclina D1	0,27	0,6028
pRb	0,08	0,7731
p21	1,86	0,1726
p27	1,16	0,2822
c-myc	1,82	0,1776

TABLA 11. Análisis por el método de Kaplan-Meier. Logaritmo del rango y significación estadística de diferentes variables, en relación con la supervivencia.

Como se observa en la tabla, el sexo, la edad, el tipo histológico, la hemorragia, la ulceración, la degeneración quística, y las inmunotinciones para BCL2, BAX, ciclina D1, pRb, p21, p27 y c-myc, no alcanzan un nivel de significación estadística. Por el contrario,

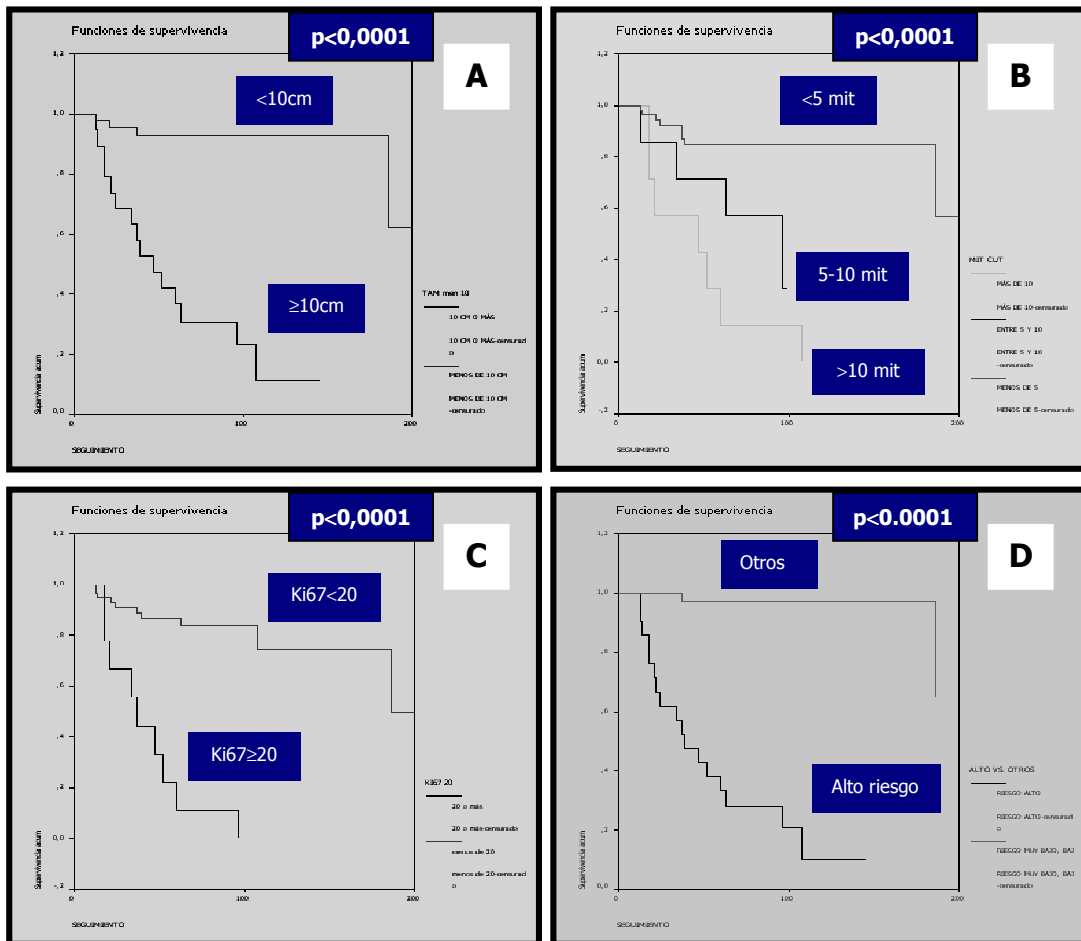


Figura 10. Curvas de supervivencia, análisis de Kaplan-Meier. **A. Tamaño tumoral.** Se comparan lesiones que miden 10 cm o más de diámetro, con las menores. **B. Número de mitosis / 50 CGA.** Línea superior: menos de 5. Línea media: entre 5 y 10. Línea inferior: más de 10. **C. Tinción con Ki67.** Se comparan los tumores con 20 núcleos o más teñidos por cilindro en los TMAs, con los que muestran menos de 20. **D. Comportamiento de los tumores de alto riesgo,** según la clasificación de consenso, comparados con los de las demás categorías.

el tamaño y la tasa de proliferación, expresada por el método tradicional del número de mitosis o a través del número de núcleos teñidos con Ki67, divide claramente a los pacientes en diferentes categorías pronósticas, y esto sucede cuando se aplican diferentes puntos de estratificación en estas variables continuas (**Figura 10**). Como es natural, el riesgo de comportamiento agresivo del GIST, que se determina en la clasificación de consenso a partir del tamaño tumoral y del número de mitosis, también

se sitúa en un nivel alto de significación, sobre todo cuando se comparan los tumores de alto riesgo con todos los demás (intermedio, bajo y muy bajo riesgo). La puntuación estratificada, obtenida sumando el diámetro máximo de los tumores y el índice MIB-1, también muestra un gran valor pronóstico.

Otras variables que, en el análisis de Kaplan-Meier, dividen a los pacientes en categorías pronósticas relevantes son el órgano en que asienta la neoplasia, si atendemos solo al estómago y al intestino delgado, la necrosis tumoral, el grado histológico, y la inmunotinción para p53 (**Figura 11**).

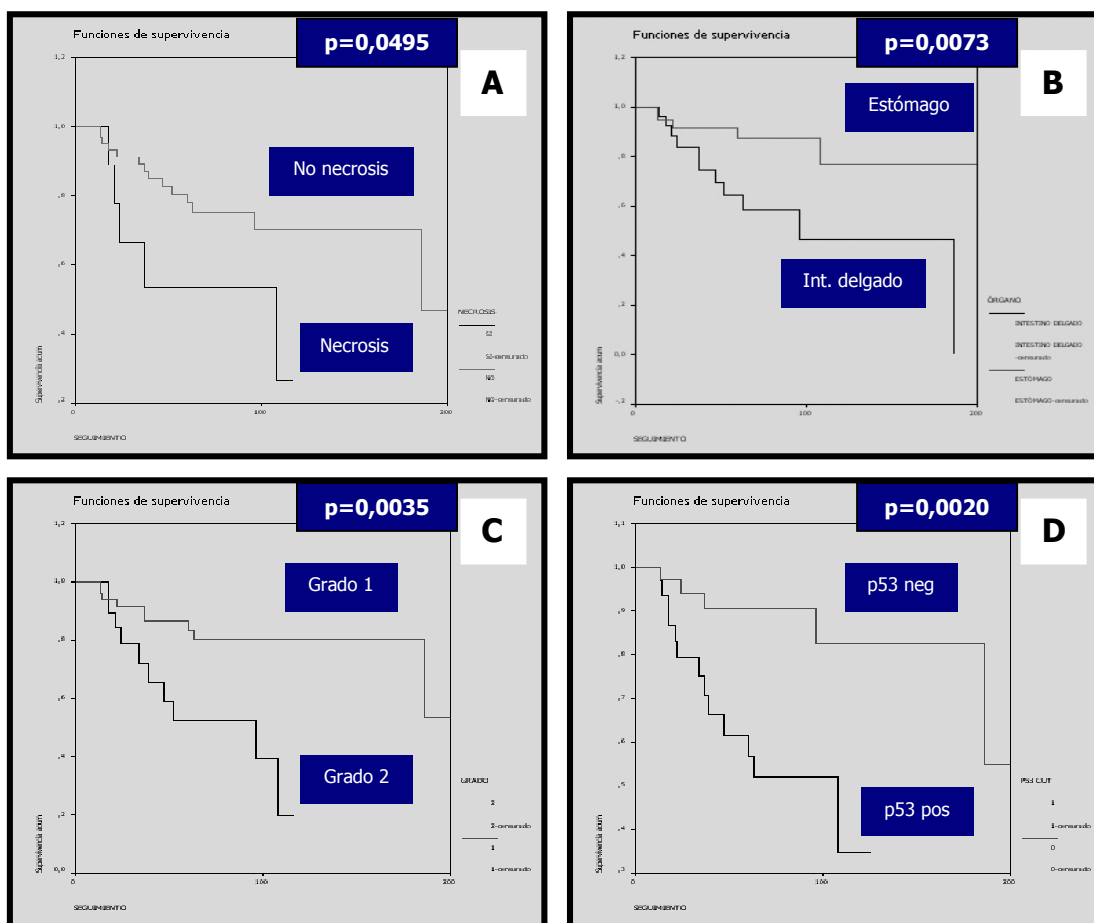


Figura 11. Curvas de supervivencia, análisis de Kaplan-Meier. **A. Necrosis tumoral**, presencia o ausencia valorada en las secciones microscópicas. **B. Órgano**. Línea inferior: tumores surgidos del intestino delgado. Línea superior: tumores gástricos. **C. Grado histológico**. Tumores de grado 2 vs. tumores de grado 1. **D. Tinción de p53**. Línea inferior: tumores positivos. Línea superior: tumores negativos.

IV.5.4 ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA. MODELO DE REGRESIÓN DE COX

En el análisis univariante, los datos clínico-patológicos que tienen una correlación más fuerte con el comportamiento biológico de los tumores son, como era de esperar, el tamaño – expresado como el diámetro máximo en centímetros - y la tasa de proliferación – expresada con el número de mitosis por 50 CGA o con el número de núcleos teñidos con Ki67, empleando en ambas variables continuas diferentes puntos de corte (**Tabla 12**). La estadística, en el caso del tamaño tumoral, se mantiene casi idéntica si establecemos estratificaciones dicotómicas a diferentes niveles: menor 5 cm y mayor o igual de 5 cm, menor de 10 cm y mayor o igual de 10 cm. Sin embargo, en lo que atañe

FACTOR	ODDS RATIO	SIGNIFICACIÓN	95% IC INF-SUP
Riesgo alto vs. otros	49,997	<0,0001	6,639-367,208
Puntuación	9,142	<0,0001	2,837-29,460
Int. delgado vs. estómago	3,953	0,013	1,340-11,663
Tamaño > 5 cm	15,462	0,008	2,056-116,298
Tamaño > 10 cm	15,094	<0,0001	4,361-52,240
5 M/50 CGA	6,691	<0,0001	2,585-17,318
10 M/50 CGA	5,500	<0,0001	2,164-13,978
15 núcleos Ki67 pos.	9,621	<0,0001	3,585-25,819
20 núcleos Ki67 pos.	10,071	<0,0001	3,796-26,719
p53 positivo	4,944	0,005	1,606-15,222
Grado 2	3,649	0,007	1,436-9,271

TABLA 12. Variables de importancia pronóstica en el GIST. Análisis univariante de Cox para la supervivencia.

al número de mitosis, se obtienen mejores resultados si situamos el punto de corte en los tumores que muestran 5 o más mitosis por 50 CGA (OR: 6,691), que si optamos por un número de 10 o más mitosis por 50 CGA (OR: 5,500).

La identificación de los tumores clínicamente malignos es especialmente certera si consideramos, por un lado, las neoplasias asignadas a la categoría de alto riesgo en la clasificación vigente (Fletcher *et al.*, 2002^a) y, por el otro, todas las demás, es decir, los tumores de muy bajo riesgo, de bajo riesgo, y de riesgo intermedio. Si procedemos de este modo, la OR del análisis es de 49,997 (IC: 6,639-367,208). De hecho, todos los GIST que se comportaron clínicamente como neoplasias malignas en esta serie, excepto sólo un caso, caen en la categoría de tumores de alto riesgo. Así, 18 de los 25 tumores de alto riesgo fueron malignos. El que hace el número 19º de los tumores malignos (caso 78) correspondió a una lesión de 5 cm de diámetro localizada en el intestino delgado de un paciente varón, que fue intervenido en el año 1987 por presentar episodios de hemorragia digestiva. En el examen histopatológico se comprobó que era un GIST – entonces diagnosticado de leiomioma – de patrón fusocelular, sin hemorragia intratumoral o necrosis, y con solo 2 mitosis por 50 CGA. Con estos datos, si se le aplica la clasificación de determinación del riesgo, el tumor debe ser considerado como de bajo riesgo. Sin embargo, en el año 2002, 186 meses después de la cirugía, se le detectan al paciente metástasis hepáticas del GIST. La inmunotinción para CD117, realizada recientemente sobre el tumor original con motivo de este nuevo episodio, es positiva y el paciente está siendo sometido también a tratamiento con imatinib, con el que se logró una remisión parcial de la enfermedad.

La valoración de la proliferación celular a través de la inmunotinción para Ki67 (MIB-1) es, en esta serie, superior a la contabilidad directa de las mitosis a la hora de identificar los tumores de comportamiento clínico maligno. En un análisis multivariante de Cox si confrontamos el número de mitosis con el índice MIB-1, este último parámetro permanece como variable independiente. Aunque, como se dijo más arriba, los GISTs calificados de alto riesgo se diferencian claramente en su comportamiento clínico de los restantes tumores, si comparamos en el análisis de regresión todas las categorías de la clasificación de consenso con la estratificación que ya definimos en la puntuación obtenida a partir del tamaño y del índice MIB-1 (0-7: bajo riesgo, 8-15: riesgo intermedio, más de 15: alto riesgo), este *score* - con una OR de 9,142 (IC: 2,837-29,460) - desplaza a la clasificación vigente.

En un análisis multivariante general, en el que confrontamos todas las variables mencionadas que demuestran tener importancia pronóstica, expresadas en sus valores brutos y, por tanto, sin estratificaciones arbitrarias; solo el tamaño, la tinción

inmunohistoquímica para p53 y la tasa de proliferación valorada a través de la expresión de Ki67, permanecen como variables independientes en la identificación de los tumores de comportamiento adverso (**Tabla 13**).

FACTOR	ODDS RATIO	SIGNIFICACIÓN	95% IC INF-SUP
Tamaño	1,115	0,001	1,047-1,187
Índice MIB-1	1,030	0,024	1,004-1,056
p53 positivo	1,907	0,041	1,026-3,546

TABLA 13. Variables pronósticas independientes. Análisis multivariante de Cox con las variables expresadas en sus valores brutos.

Si en el análisis multivariante de Cox aplicamos diferentes puntos de corte a las variables cuantitativas y hacemos entrar como variables todas aquellas que, en el análisis univariante, mostraron tener relevancia pronóstica (órgano, tamaño, mitosis, expresión de Ki67, grado histológico, expresión de p53), permanecen como variables independientes respecto a la supervivencia de los pacientes tan solo tres de ellas: el órgano donde se localiza el tumor y, más en concreto, los surgidos en el intestino delgado *versus* los gástricos; el tamaño del tumor, si se establece la estratificación por encima y por debajo de los 10 cm de diámetro mayor; y un inmunofenotipo positivo para p53 (**Tabla 14**).

FACTOR	ODDS RATIO	SIGNIFICACIÓN	95% IC INF-SUP
Int. delgado vs. estómago	4,561	0,011	1,413-14,723
Tamaño > 10 cm	8,933	0,001	2,424-32,925
p53 positivo	3,600	0,040	1,063-12,191

TABLA 14. Variables pronósticas independientes. Análisis multivariante de Cox para la supervivencia.

V. DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

El GIST es el tumor de estirpe no epitelial que más frecuentemente surge en el tubo digestivo o en sus inmediaciones (Appelman y Helwig, 1986; Rosai, 1996; Rosai, 2004). Esta neoplasia está rodeada desde hace muchos años de una densa nube de confusión y de discusiones entre los especialistas, relacionadas tanto con su origen enigmático como con la gran dificultad que plantea la identificación de criterios pronósticos útiles y reproducibles.

A pesar de que el GIST es una neoplasia básicamente heterogénea desde el punto de vista macroscópico, microscópico y, desde luego, en lo que atañe a su comportamiento biológico, en su patología molecular subyace una relativa homogeneidad. En todos los GISTs parece existir un único acontecimiento genético-molecular que juega un papel central en su desarrollo, situación sin parangón en la gran mayoría de los restantes tumores que suelen ser el resultado de la acumulación de un número mayor o menor de trastornos moleculares de idéntica importancia. Este acontecimiento, generalmente una mutación o delección genética aunque no siempre detectable, conduce a la activación constitutiva o permanente de una tirosín-quinasa, que hace que una putativa célula mesenquimal pluripotencial del tubo digestivo o de estructuras vecinas adquiera la capacidad de proliferar para dar lugar a la formación de masas tumorales, cuyas células tienden a adquirir un fenotipo similar al de las CIC (Kindblom *et al.*, 1998; Miettinen *et al.*, 2000^a; Rosai, 2004). En la inmensa mayoría de los casos, la tirosín-quinasa activada en estos tumores es KIT, aunque hay casos de GIST con la activación – alternativa y mutuamente excluyente – de PDGFRA (Heinrich *et al.*, 2003^b; Hirota *et al.*, 2003). Para reflejar además la homogeneidad a este nivel más básico, sea cual sea la tirosín-quinasa activada, la administración de mesilato de imatinib (Glivec) ha demostrado ser sumamente efectiva en el control del GIST recidivante o metastático a través del bloqueo de la actividad enzimática (Dagher *et al.*, 2002; Demetri *et al.*, 2002; Van Oosterom *et al.*, 2001).

Las controversias en el GIST parten incluso de su propia definición. Hasta hace poco tiempo, existía un cierto consenso en definir el GIST como aquel tumor mesenquimal del tubo digestivo que expresa inmunohistoquímicamente la proteína KIT (CD117) (Fletcher *et al.*, 2002^a; Hasegawa *et al.*, 2002). Sin embargo, ni todos los GISTs están directamente vinculados al tubo digestivo – hay GISTs incuestionables que surgen en los tejidos blandos de la cavidad abdominal (epiplon, mesenterio, superficie

peritoneal, etc.) (Miettinen *et al.*, 1999^a; Reith *et al.*, 2000) - ni en todas las ocasiones se detecta KIT en el estudio inmunohistoquímico pues, entre otras posibles explicaciones y como se dijo más arriba, hay algunos GISTs en los que existe una mutación activadora en el gen que codifica la PDGFRA en vez de la mucho más común mutación en el gen *c-kit* (Debiec-Rytcher *et al.*, 2004^b; Heinrich *et al.*, 2003^b; Hirota *et al.*, 2003). Por estos motivos, se ha propuesto recientemente una nueva definición de los GISTs, como "los tumores intraabdominales no epiteliales (mesenquimales) que expresan la proteína KIT o que tienen una mutación activadora en un gen de un receptor tirosín-quinasa de clase III (*KIT* o *PDGFRA*)" (Joensuu y Kindblom, 2004).

En esta serie hemos considerado el diagnóstico de GIST sólo cuando no existían evidencias histológicas, inmunohistoquímicas o ultraestructurales obvias de diferenciación muscular lisa o neural/schwanniana y, en principio, exigimos la expresión inmunohistoquímica de CD117. De hecho, en 19 tumores mesenquimales, muchos de los cuales fueron inicialmente diagnosticados como GISTs, la aplicación de estos criterios supuso la modificación del diagnóstico de tal manera que doce casos eran leiomiomas verdaderos, cinco tumores resultaron ser schwannomas, y dos de ellos correspondían realmente a sendas fibromatosis/tumor desmoide. Sólo en cinco casos – en los que el estudio inmunohistoquímico sobre secciones completas no se apreció expresión de CD117 – mantuvimos el diagnóstico de GIST pues el resto de las características clínico-patológicas eran lo bastante contundentes como para tomar esta decisión. Es necesario constatar que estos cinco tumores eran pequeños, con diámetros mayores que oscilaban entre 0,8 y 4 cm, y ninguno de ellos mostró un comportamiento maligno en su evolución, aunque en dos casos no disponemos de datos de seguimiento. Estos dos últimos tumores se remitieron como casos de consulta desde otras instituciones, y es posible que la negatividad para CD117 sea una consecuencia de una pérdida general de antígenos por fijación deficiente. En ninguno de estos cinco tumores pudimos comprobar si el gen mutado era *PDGFRA* en vez de *c-kit*, por no haber realizado en este trabajo un estudio molecular específico en este sentido y por no existir en este momento una tinción inmunohistoquímica para PDGFRA que ofrezca resultados fiables (Medeiros *et al.*, 2004). Por otra parte, estos cinco tumores CD117 negativos correspondieron al tipo histológico fusocelular y recientemente se ha comprobado que las mutaciones en *PDGFRA* se asocian de modo significativo con un fenotipo tumoral epitelioide (Debiec-Rytcher *et al.*, 2004^b).

V.1 DATOS CLÍNICOS

Las características clínicas de los GISTs presentados en este trabajo son muy similares a las de series precedentes. Respecto al sexo de los pacientes, el número de casos es idéntico en ambos sexos, dato coincidente con el reflejado en la literatura (Miettinen *et al.*, 2000^a). El GIST es un tumor de presentación tardía, y nuestra serie constata una vez más este hecho, con sólo 6 pacientes menores de 50 años, entre los 80 en los que el dato de la edad era conocido. Aunque se han descrito algunos casos congénitos o de presentación en edad pediátrica, éstos son excepcionales (Bates *et al.*, 2000; Cypriano *et al.*, 2004). En lo que atañe a este aspecto, es interesante constatar que, en las familias afectas por mutaciones en línea germinal del gen *c-kit*, los GISTs, aunque a menudo múltiples, aparecen precozmente pero también en la edad adulta (Nishida *et al.*, 1998; Maeyama *et al.*, 2001), lo que ratifica la sospecha de que es necesario que existan alteraciones genético-moleculares adicionales para que la mutación en una tirosín-quinasa conduzca al desarrollo de los GISTs.

Un dato peculiar de esta serie es que tan sólo encontramos un caso en el colon-recto, y el porcentaje de tumores en esta localización suele oscilar entre el 5 y el 10% del total (Corless *et al.*, 2004; Miettinen *et al.*, 2000^a). También es llamativo que el tamaño de los tumores sea más reducido que en muchas de las series precedentes, con un porcentaje del 51,2% de lesiones menores o iguales de 5 cm. Este último dato deriva con seguridad del elevado número de nódulos o tumores (25 casos, 29,76%) descubiertos accidentalmente en el curso de laparotomías realizadas por motivos diferentes a la presencia del propio GIST. Siguiendo este razonamiento, una consecuencia directa de este número importante de lesiones de pequeñas dimensiones, sin clínica asociada, es que el porcentaje de tumores clínicamente malignos también es más bajo en nuestra serie (19 casos, 22,6%) del que se refleja en la literatura con cifras que oscilan entre un 30 y un 50% (Emory *et al.*, 1999; Evans, 1985; DeMatteo *et al.*, 2000).

La clínica de presentación, cuando existió, solió corresponder a una hemorragia digestiva crónica con anemia más o menos intensa, aunque también encontramos pacientes con una hemorragia digestiva aguda que condujo a situaciones más graves de pre-shock, que requirieron intervenciones quirúrgicas de urgencia. Algo más infrecuente fue la detección de los tumores por la sensación subjetiva de masa en los pacientes o a través de la palpación objetiva y directa de las lesiones.

Como sucede habitualmente con el GIST (DeMatteo *et al.*, 2000), el comportamiento maligno de los tumores en esta serie vino dado por la aparición de recidivas locales múltiples en el interior de la cavidad abdominal o por constatarse enfermedad metastática, siempre de localización hepática. En ningún caso encontramos en las historias clínicas revisadas referencias a la aparición de lesiones metastáticas en territorios extraabdominales. Tres de los pacientes más recientes en los que se diagnosticó GIST recidivante o metastático se pudieron beneficiar del tratamiento con imatinib, y permanecían con vida en una situación de remisión parcial de la neoplasia, en el momento de cierre del seguimiento.

En el análisis univariante, ni la edad ni el sexo de los pacientes mostraron tener relevancia pronóstica. Aunque algunas series anteriores refieren que la edad avanzada (Cunningham *et al.*, 1993; Emory *et al.*, 1999; Hasegawa *et al.*, 2002) y el sexo masculino (Cooper *et al.*, 1992; Hasegawa *et al.*, 2002) son factores que se asocian a un pronóstico peor, el sentir general es que estas variables repercuten poco, si lo hacen de alguna manera, sobre la supervivencia en el GIST.

V.2 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

Como ya se mencionó anteriormente, el tamaño medio de los tumores de esta serie es algo menor que el registrado en series precedentes. Aunque es más habitual que los tumores del intestino delgado sean mayores que los gástricos (Emory *et al.*, 1999), nosotros no encontramos una relación significativa entre el tamaño y la localización de las lesiones. Con respecto a este último aspecto, las dos porciones del tubo digestivo en las que con mayor frecuencia asientan los GISTs – el estómago y el intestino delgado – tienen una clara tendencia a mostrar características morfológicas diferenciadas. Mientras que en el estómago se concentran la gran mayoría de los tumores epitelioides, a menudo con áreas de degeneración quística, las lesiones surgidas en el intestino delgado son fusocelulares casi en su totalidad y muestran con frecuencia fibras esquenoides. Este hallazgo, claramente reflejado en esta serie, no ha sido referido con esta contundencia en publicaciones anteriores.

Mientras que en alguna serie precedente el porcentaje de pacientes que sobrevivían a los 5 años tras la cirugía era mayor en el caso de los GISTs de tipo fusocelular respecto a los pacientes con tumores epitelioides o mixtos (49% versus 23%,

respectivamente) (Singer *et al.*, 2002), en esta serie no encontramos diferencias en la evolución clínica en función del tipo histológico.

La necrosis y hemorragia es un hallazgo frecuente en los GISTs de esta serie que, como es esperar, guarda una estrecha asociación con el tamaño de los tumores. La necrosis es habitualmente de tipo coagulativo, es decir, con identificación de sombras celulares, inflamación y en contacto directo con la celularidad viable, sin fibrosis interpuesta. Hay una abundante literatura que demuestra que la presencia de necrosis coagulativa, en los tumores del músculo liso del miometrio, es un claro signo de comportamiento agresivo (Bell *et al.*, 1994), aunque es cierto que los dos tipos morfológicos de necrosis – hialinizante y coagulativa – no siempre son fáciles de distinguir. En el análisis de supervivencia por el método de Kaplan-Meier nosotros encontramos una relación en el límite de la significación estadística entre la presencia de necrosis y el comportamiento clínico. En relación con este punto, los resultados de las distintas series son contradictorios pues mientras que algunos autores observan una fuerte relación entre la necrosis y una evolución desfavorable (Abdulkader *et al.*, 2002; Brainard *et al.*, 1997; Carrillo *et al.*, 1997; Yan *et al.*, 2003), otros no encuentran este vínculo (Cooper *et al.*, 1992; Gelen *et al.*, 2004). En las tablas de contingencia observamos que existe una correlación entre la presencia de hemorragia y un comportamiento clínico agresivo de los tumores, pero esta variable pierde su valor pronóstico cuando es sometida a un análisis de supervivencia.

La ulceración de la mucosa es un fenómeno común en los tumores de gran tamaño. Es muy rara, por el contrario, la infiltración neoplásica directa – de patrón pseudolinfomatoso - de la lámina propia de la mucosa, que nosotros sólo identificamos en un tumor. En este caso, sorprendentemente, no logramos constatar un comportamiento clínicamente maligno del GIST, pero el paciente falleció pronto por el carcinoma gástrico que motivó la intervención quirúrgica.

Se ha propuesto la aplicación de diferentes sistemas de consenso en la asignación del grado histológico en el GIST, desde la aproximación clásica de Broders de cuatro niveles de diferenciación, hasta el sistema más complejo de Hasegawa (Hasegawa *et al.*, 2002), pasando por los dos sistemas más ampliamente utilizados en el campo de los tumores de partes blandas: el del NCI (*National Cancer Institute*, de EEUU) (Costa, 1990) y el del FNCLCC (*Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer*, de Francia) (Trojani *et al.*, 1984), que combinan de modo variable el tipo histológico, la celularidad, el pleomorfismo nuclear y la tasa de mitosis. Por otra parte, es cada vez más fuerte la tendencia por parte de los oncólogos que tratan tumores de partes blandas a convertir las asignaciones de grado en tres o cuatro niveles en una estratificación en dos

escalones: neoplasias de bajo grado (grado 1, cuando se utiliza un sistema de tres niveles; grado 1 y 2, si es de cuatro) y neoplasias de alto grado (grado 2 y 3, con sistemas de tres niveles; grado 3 y 4, si es de cuatro) (Cross, 1998; Fletcher *et al.*, 2002^b). En la evaluación de los tumores de esta serie, nosotros hemos hecho una aplicación laxa del sistema del NCI, de tres estratos, haciendo hincapié en la densidad celular y el pleomorfismo nuclear por encima de los restantes factores morfológicos. Como es de esperar, si se atiende a las características histopatológicas habituales del GIST, todos estos tumores caen en las categorías 1 (bajo grado) y 2 (alto grado), sin que identifiquemos tumores grado 3.

Que el tamaño es una variable de gran relevancia pronóstica está muy bien expresado en un amplio estudio epidemiológico reciente (Kindblom *et al.*, 2002), que refiere el dato de que se incrementa en un 5% el riesgo de muerte a los 5 años en los pacientes con GISTs por cada centímetro que aumenta el diámetro tumoral. De todos los rasgos morfológicos evaluados en esta serie - el número de mitosis será considerado más adelante - mostraron tener significación pronóstica en el análisis univariante tanto el tamaño como el grado histológico. El modo de expresar el tamaño - ya sea en bruto o estratificado - para obtener el mayor nivel de información pronóstica no está definitivamente resuelto, y se han propuesto diferentes puntos de corte. El sistema de consenso de valoración del riesgo en el GIST (Fletcher *et al.*, 2002^a) refiere tres puntos de corte precisos (2 - 5 - 10 cm) y parece razonable no modificar esta aproximación, aunque en el análisis multivariante encontramos que un corte en los 10 cm permanece como variable independiente explicativa de una evolución adversa, con una OR de 8,933. En el análisis multivariante de las variables cuantitativas sin puntos de corte, y prescindiendo de la inclusión del órgano en el análisis, permaneció el tamaño - expresado en su valor bruto en centímetros - como variable relevante en el pronóstico.

El grado de las neoplasias, asignado como se explicó más arriba, es una variable que demuestra tener en esta serie una estrecha relación con la evolución de los pacientes tanto en las curvas de Kaplan-Meier como en el modelo univariante de Cox, aunque desaparece como parámetro explicativo independiente en el análisis de regresión multivariante.

V.3 INMUNOHISTOQUÍMICA Y DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

El diagnóstico diferencial del GIST es amplio y no debe caerse en la tentación de efectuar este diagnóstico ante cualquier tumor mesenquimal localizado en el interior de la cavidad abdominal, esté vinculado o no al tubo digestivo, pues las implicaciones pronósticas y las opciones terapéuticas dependen enormemente de un diagnóstico certero.

Aunque la experiencia y el conocimiento profundo de esta entidad ayudan a su identificación en secciones teñidas por métodos convencionales (Trupiano *et al.*, 2002), sus características histopatológicas son lo suficientemente variadas como para que exista siempre un cierto grado de incertidumbre. Por ello, y probablemente con más motivo que en otras muchas neoplasias, es preciso recurrir a la ayuda de tinciones inmunohistoquímicas para ratificar un diagnóstico de GIST (Greenson, 2003; Fletcher *et al.*, 2002^a; Miettinen *et al.*, 2000^a; Yamaguchi *et al.*, 2004). En principio, podría pensarse que es un GIST cualquier tumor mesenquimal de la cavidad abdominal que exprese CD117. Pero, como siempre sucede en la Patología, un diagnóstico no debe basarse exclusivamente en un inmunofenotipo positivo para un determinado marcador, sin la valoración adecuada de todo el contexto clínico-morfológico o la inserción del marcador central en el contexto de una batería inmunohistoquímica más amplia. La entidad que puede plantear dificultades diagnósticas más serias es la fibromatosis o tumor desmoide mesentérico, debido fundamentalmente a la frecuente expresión de CD117 en el mismo (Yantiss *et al.*, 2000; Montgomery *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.*, 2004), aunque casi siempre es más débil que en el GIST y carece del refuerzo membranoso en su patrón de tinción (Rosai, 2004). Nosotros no hemos encontrado, en las dos fibromatosis mesentéricas estudiadas en los TMAs, una tinción positiva para CD117, aunque el número de casos es muy bajo para llegar a conclusiones válidas.

Se ha recomendado modificar las condiciones en las que se realiza habitualmente la inmunotinción – proponiendo la eliminación del desenmascaramiento antigénico y utilizando el anticuerpo policlonal de DAKO (A4502) a una dilución de 1:250 en vez de a la dilución de 1:100 estándar – para evitar esta indeseable y confusa expresión de CD117 en las fibromatosis (Lucas *et al.*, 2003). En este estudio, se ha realizado un ensayo de la inmunotinción para CD117 en estas condiciones comprobándose que 10 casos de GIST (12,7%) dejaban de expresar CD117. Por ello, creemos que el pretendido incremento en la especificidad de la inmunotinción se logra sólo a través de una apreciable disminución

en su sensibilidad, lo que hace poco recomendable la aplicación sistemática de esta modificación técnica.

Por otra parte, las fibromatosis nunca expresan CD34 y recientemente se ha comunicado que suelen mostrar un patrón de inmunotinción nuclear con β -catenina (Montgomery *et al.*, 2002; Yamaguchi *et al.*, 2004) derivado de mutaciones en este gen o en el gen APC que suelen ocurrir en esta entidad. Nosotros encontramos esta tinción de gran ayuda y las dos fibromatosis mesentéricas incluidas en esta trabajo, aunque son una muestra muy limitada, expresan claramente β -catenina con patrón nuclear en la mayoría de las células neoplásicas. Las diferentes características morfológicas de una y otra entidad también sirven de ayuda. Las fibromatosis que, a pesar de su rareza, son el más común tumor del mesenterio (Weiss y Goldblum, 2001), son lesiones de límites más imprecisos, con un patrón de crecimiento infiltrativo. Están formadas por una población homogénea de células fusiformes de forma ondulada, con núcleos de extremos afilados, a diferencia de los núcleos de extremos romos de los GISTs. El colágeno es abundante y, a menudo, de aspecto queloidal (Rodríguez *et al.*, 2004; Rosai, 2004). Recientemente, Yantiss y colaboradores han descrito una nueva entidad que denominaron seudotumor nodular fibroso reactivo del tracto gastrointestinal y del mesenterio (Yantiss *et al.*, 2003) pero, a juzgar por las ilustraciones y su definición, es posible que no sea más que una variante morfológica de la fibromatosis mesentérica.

Los tumores benignos de músculo liso del tubo digestivo son particularmente frecuentes en los dos extremos de este sistema, esto es, en el esófago – donde dependen de la capa muscular propia – y en el recto y colon distal – donde son de pequeño tamaño y surgen a partir de la *muscularis mucosae* (Miettinen *et al.*, 2001^b; Rosai, 2004) – y sus diferencias morfológicas respecto a los GIST son a menudo lo suficientemente explícitas como para poder ser identificados en secciones histológicas teñidas con HE, con la IHQ sólo útil como técnica de refuerzo. Son tumores muy bien delimitados, de baja densidad celular, constituidos por fascículos ordenados de células elongadas con citoplasmas eosinófilos y fibrilares, con núcleos grandes de extremos romos, que a veces muestran un grado apreciable de pleomorfismo, pero con ninguna o muy escasas figuras de mitosis. La IHQ, además de la constante negatividad para CD117 y CD34, revela una expresión fuerte y extensa de AME y desmina, diferente de la mucho más débil y focal que se observa en los GISTs positivos para estos marcadores de diferenciación muscular. Estos dos anticuerpos – AME y desmina – fueron positivos en esta serie en un número pequeño y similar de GISTs (9 casos se tiñeron con desmina y 8 casos con AME) evaluados en los TMAs, a diferencia de la más frecuente expresión de AME reflejada en la gran mayoría de las series precedentes. En estas series, el porcentaje

de GISTs que se tiñe con desmina rara vez supera el 5%, mientras que la AME se expresa en el 30-40% de los tumores (Corless *et al.*, 2004; Fletcher *et al.*, 2002^a; Ma *et al.*, 1993; Miettinen *et al.*, 2000^a), aunque siempre con cifras muy variables. Esta heterogeneidad en los resultados puede ser por la utilización de diferentes anticuerpos comerciales, por las condiciones técnicas de la inmunotinción o, en nuestro caso, por el uso de TMAs que dificulta la identificación de las expresiones muy focales de un marcador. En relación con esta última hipótesis, en la IHQ realizada sobre secciones completas de los GISTs se observa que el porcentaje de tumores que expresan AME es del 20,2%, una cifra que se aproxima mucho más a la reflejada en la literatura, en contraste con el 9,5% de inmunorreactividad de los GISTs en los TMAs. Esta es la única inconsistencia – poco relevante - detectada en el análisis de los GISTs a través de TMAs.

En nuestra serie, un hallazgo también constante en los leiomiomas estudiados fue la inmunotinción negativa para vimentina, con el anticuerpo monoclonal empleado (clon V9 de DAKO). Esta circunstancia ya ha sido reflejada previamente (Sarlomo-Rikala *et al.*, 2002) y creemos que también puede ser útil en el diagnóstico diferencial. La utilización de otro marcador de músculo liso como el h-caldesmon no parece aportar ayuda en el diagnóstico diferencial, y su expresión relativamente frecuente en el GIST se ha invocado como una prueba de que existe una tendencia a una diferenciación muscular lisa incompleta en esta entidad (Miettinen *et al.*, 1999^b).

Los dos leiomiosarcomas incluidos en los TMAs, además de compartir este inmunofenotipo, mostraron numerosas mitosis, muchas de ellas atípicas, y un grado muy elevado de pleomorfismo nuclear. Los GISTs, incluso los más agresivos, presentan mitosis que suelen ser relativamente escasas y que siempre son típicas. Además, el grado histológico es habitualmente más bajo, sin que – como ya dijimos - hayamos encontrado casos a los que pudiéramos asignar un grado 3.

Los schwannomas plantean un diagnóstico diferencial de muy difícil resolución si atendemos a la morfología y la IHQ clásica, como lo acredita que los 5 casos estudiados en este trabajo fueron etiquetados originalmente como GISTs o GANTs. La característica microscópica fundamental es la constante presencia de una corona de linfocitos – con formación incluso de centros germinales foliculares – en el margen tumoral, siempre muy bien definido. La presencia de un patrón vagamente organoide, de aspecto festoneado o trabecular, es un hallazgo más inconstante (Daimaru *et al.*, 1988; Miettinen *et al.*, 2001^c; Prevot *et al.*, 1999; Sarlomo-Rikala y Miettinen, 1995). En el estudio IHQ, estos tumores nunca expresaron CD117 ni CD34 y, sin embargo, la inmunotinción para S-100 y GFAP fue positiva y contundente. La positividad para GFAP es un fenómeno curioso que no se aprecia en ningún otro tumor mesenquimal del tubo digestivo y que tampoco es

característico de los schwannomas clásicos de partes blandas. La identificación correcta del schwannoma es muy importante pues su comportamiento es invariablemente benigno (Daimaru *et al.*, 1988; Miettinen *et al.*, 2001^c; Prevot *et al.*, 1999; Sarlomo-Rikala y Miettinen, 1995). Respecto a la expresión de S-100 por el GIST, nosotros encontramos una inmunotinción positiva para este marcador, siempre débil y focal, en el 15.5% de los tumores. Aunque ligeramente más alta de lo habitual, esta cifra es comparable con las reflejadas en series precedentes, que se sitúan entre el 5 y el 10% (Corless *et al.*, 2004; Fletcher *et al.*, 2002^a; Miettinen *et al.*, 2000^a).

El tumor fibroso solitario, extraordinariamente infrecuente en la cavidad abdominal y del que no encontramos ningún caso en esta serie, es otra entidad que debe considerarse en este diagnóstico diferencial, especialmente a causa de su positividad IHQ para CD34 (Miettinen *et al.*, 1995; Mikhael *et al.*, 1994). Son tumores bien definidos cuyas características histopatológicas pueden solaparse considerablemente con el GISTs, a pesar de su colagenización intensa y su patrón hemangiopericitóide focal. De nuevo, nunca expresan CD117 (Shidham *et al.*, 2002). La tinción inmunohistoquímica de CD34 se observó en el 78,6% de los GISTs de esta serie, que también es muy similar a los porcentajes que se mencionan más frecuentemente en la literatura, con cifras en torno al 70% de los tumores (Fletcher *et al.*, 2002^a; Miettinen *et al.*, 2000^a; Miettinen y Lasota, 2001).

Una entidad que debe añadirse a las mencionadas en el diagnóstico diferencial del GIST es el tumor glómico gastrointestinal. La mayor serie publicada consta de 32 tumores, de los cuales todos excepto uno – localizado en el ciego – eran gástricos, con un claro predominio de pacientes del sexo femenino (Miettinen *et al.*, 2002^b). El principal problema diagnóstico surge, como es previsible, con el tipo epitelioide del GIST. En el tumor glómico las células son más uniformes y redondas, y los capilares y venas son más prominentes que en el GIST. En el estudio inmunohistoquímico, los tumores glómicos suelen mostrar una expresión fuerte y extensa de la AME además, naturalmente, de la tinción negativa para CD117 y CD34 (Miettinen *et al.*, 2002^b).

Otras entidades tales como el tumor miofibroblástico inflamatorio, el pólipo fibroide inflamatorio, los tumores neuroendocrinos, y algunos carcinomas y melanomas, son alternativas que se plantean con menos frecuencia y cuyo diagnóstico diferencial puede ser resuelto con más facilidad.

En resumen, creemos que una valoración juiciosa de las características clínicas, macroscópicas, microscópicas e inmunohistoquímicas de los tumores mesenquimales abdominales – vinculados o no al tubo digestivo – debe llevar a solucionar las dificultades

que plantea el diagnóstico diferencial del GIST. De todo lo dicho, se deduce que los anticuerpos más informativos y relevantes, y que deben ser incluidos en la correspondiente batería inmunohistoquímica, son: CD117, desmina, S-100, β -catenina y CD34, que son los marcadores centrales positivos de los GISTs, tumores de músculo liso, schwannomas, fibromatosis y tumores fibrosos solitarios, respectivamente. Otros marcadores como la AME, h-caldesmon, enolasa neuroespecífica o GFAP tienen un valor más limitado.

V.4 VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROLIFERATIVA

El procedimiento de contar directamente las mitosis sobre secciones tisulares de las neoplasias, como indicador de la actividad proliferativa de las mismas, es una técnica antigua y muy instalada en el *armamentarium* de la Patología. Así por ejemplo, no puede faltar en los informes anatomopatológicos de neoplasias tan frecuentes como el carcinoma de la mama, como parte integral del sistema de grados histológicos conocido con el nombre de Bloom-Richardson (Bloom y Richardson, 1957; Elston y Ellis, 1991). Sin embargo, a pesar de su teórica sencillez, no es un procedimiento exento de puntos débiles o dificultades, reflejados en los estudios que abordaron las discrepancias interobservadores – e incluso intraobservadores - en las cifras de mitosis de diferentes tumores (Thunnissen *et al.*, 2001). Sólo si se aplican normas muy estrictas en la contabilidad – teniendo en cuenta exclusivamente las mitosis incuestionables y prescindiendo de aquellas estructuras que puedan simularlas tales como cuerpos apoptóticos, células inflamatorias, etc. - se pueden obtener valores relativamente homogéneos.

Un abordaje alternativo de esta cuestión es la utilización de marcadores inmunohistoquímicos que informan sobre la actividad proliferativa por expresarse exclusivamente en las células en mitosis o en las fases del ciclo celular que preceden a la mitosis. Los dos marcadores más ampliamente utilizados con este fin son el PCNA y el Ki67. Este último es un antígeno que corresponde a una proteína nuclear no-histona, expresada por células en las fases proliferativas G1, G2, S y M del ciclo celular (Gerdes *et al.*, 1991). El Ki67 también es conocido a través de las siglas MIB-1, que identifican un

anticuerpo monoclonal dirigido contra un epitopo de la molécula resistente a la fijación formólica y a la inclusión en parafina. El PCNA, en un tiempo muy popular, ha desaparecido prácticamente del uso cotidiano en favor del MIB-1 por su menor especificidad, pues se encuentra expresión de este marcador en las fases de descanso del ciclo celular en algunos tejidos y porque está desregulado en ciertos tumores malignos (Coltrera *et al.*, 1993).

En el caso de los GISTs, más que en otras neoplasias, es conocido de antiguo que el número de mitosis tiene un enorme valor pronóstico, de tal manera que sigue siendo una de las dos variables – junto con el tamaño tumoral – tenidas en cuenta para determinar el riesgo de que un GIST concreto tenga un comportamiento adverso (Fletcher *et al.*, 2002^a). Sin embargo, incluso en muchos GISTs clínicamente malignos, el número de mitosis suele ser relativamente bajo por lo que deben ser contadas sobre 50 CGA, y no 10 CGA como sucede en otros tumores, lo que aumenta las posibilidades de obtener unos resultados poco reproducibles.

Los estudios clínico-patológicos publicados hasta ahora no han resuelto todavía la cuestión de qué método es superior en la determinación de la actividad proliferativa en los GISTs, la contabilidad directa de las mitosis o la evaluación de la proliferación a través de la determinación del porcentaje de núcleos teñidos con MIB-1 (índice MIB-1). Algunos autores defienden la superioridad del abordaje inmunohistoquímico (Hasegawa *et al.*, 2002; Kindblom *et al.*, 2002; Rudolph *et al.*, 1998; Seidal *et al.*, 1999; Panizo-Santos *et al.*, 2000; Yan *et al.*, 2003), de tal modo que los pacientes con tumores que muestran un índice MIB-1 de 10 o superior desarrollan metástasis con frecuencia o tienen una superior mortalidad relacionada con el tumor. En otros estudios, por el contrario, el índice MIB-1 no demuestra ser más informativo sobre el curso de la enfermedad que el tradicional cómputo de mitosis (Goldblum y Appelman, 1995; Emory *et al.*, 1997).

En este estudio, cuando sometemos las dos formas de evaluar la proliferación celular a un análisis de regresión de Cox, comprobamos la superioridad de la aproximación inmunohistoquímica, con el valor añadido de que la tinción nuclear con MIB-1 suele ser contundente e inequívoca, lo que atenúa la subjetividad e imprecisión inevitable en la identificación y contabilidad de las mitosis. Un punto de corte de 15, en el número medio de núcleos teñidos con MIB-1 en los dos cilindros de cada GIST, fue la cifra más informativa respecto a la evolución clínica de los pacientes. Teniendo en cuenta que el número medio de células por cilindro en nuestros TMAs es de 300, un porcentaje aproximado de núcleos equivalente a ese punto de corte se debe situar en torno al 5%. Por tanto, un índice MIB-1 superior al 5% se traduce en una evolución desfavorable en los pacientes con GIST. Sin embargo, en el análisis multivariante en el que hacemos

entrar todos los parámetros de valor pronóstico con diferentes estratificaciones en las variables cuantitativas, se pierden todas las formas de evaluar la tasa de proliferación celular, y permanecen como factores independientes asociados a un comportamiento adverso sólo el tamaño mayor de 10 cm, que el tumor esté situado en el intestino delgado y la expresión inmunohistoquímica de p53.

Recientemente, Kindblom (Kindblom, 2004) propuso una nueva forma de abordar la predicción pronóstica en los GISTs, asignando una puntuación o *score* a los tumores, que probablemente sea más informativa que la clasificación de consenso vigente. Esta puntuación es el resultado de sumar directamente el diámetro máximo del tumor expresado en centímetros y el índice MIB-1, y su proponente sugiere que los GISTs con una puntuación mayor de 7 deben ser considerados como potencialmente malignos. La aplicación directa de esta estrategia a nuestra serie es especialmente valiosa si estratificamos los tumores en tres categorías:

- Puntuación 1-7: BAJO RIESGO.
- Puntuación 8-15: RIESGO INTERMEDIO.
- Puntuación mayor de 15: ALTO RIESGO.

Si seguimos este procedimiento 47 tumores son de bajo riesgo (56%), 14 son de riesgo intermedio (16,7%) y 23 son de alto riesgo (27,4%). La confrontación en un análisis de regresión multivariante de Cox de esta estratificación de la puntuación con la clasificación de consenso muestra la superioridad de la primera valoración pronóstica. Sin embargo, esta puntuación no resuelve definitivamente el problema de la identificación sin ambigüedades de los GISTs malignos, pues uno de los 19 tumores de evolución desfavorable caen en la categoría de bajo riesgo, y otros dos son tumores de riesgo intermedio. Creemos que este procedimiento nuevo de asignación de una puntuación o *score* a todos los GISTs es muy prometedor pero debe ser evaluado en series más amplias antes de trasladarse a la práctica clínico-patológica.

A la espera de incorporar a las clasificaciones de riesgo en el GIST éste u otros sistemas basados en el índice MIB-1, aparentemente superior a otros parámetros de proliferación, debemos seguir recurriendo al número de mitosis, pues se combina con el tamaño tumoral en la determinación del riesgo de comportamiento agresivo cuando aplicamos la clasificación vigente (Fletcher *et al.*, 2002^a). La valoración del riesgo así asignada tiene una enorme repercusión pronóstica, sobre todo si consideramos aisladamente los tumores de alto riesgo. En el presente estudio, todos los GISTs considerados malignos clínicamente – excepto un caso - caen en la categoría de tumores de alto riesgo. Sólo un tumor del intestino delgado operado el año 1987 que, por el tamaño y número de mitosis era de bajo riesgo, se comportó como lesión maligna al

aparecer metástasis hepáticas 15 años después de la cirugía. Miettinen y colaboradores (Miettinen *et al.*, 2003) refieren tres casos de GISTs duodenales muy similares a éste, pues medían entre 2 y 5 cm de diámetro, con una baja tasa de mitosis, y los pacientes fallecieron más de 5 años después de la cirugía inicial, tras sufrir numerosas recidivas. Estos autores plantean la posibilidad de que estas recidivas tan tardías correspondan en realidad a nuevos tumores primarios. Kindblom y colaboradores, en un amplio estudio epidemiológico del sur de Suecia con casi 300 casos recogidos de GISTs (Kindblom *et al.*, 2002), llegan a la conclusión de que los grupos de riesgo intermedio, bajo y muy bajo, no sufren un exceso de mortalidad respecto a la población general y no hay muertes relacionadas con el tumor. Sin embargo, en el grupo de tumores de alto riesgo se registra un 50% de muertes en un plazo de 2,5 años, con un 68% de estas muertes directamente relacionadas con el tumor. Estos datos confirman la nítida separación entre el grupo de alto riesgo y los demás.

V.5 MARCADORES DEL CICLO CELULAR Y LA APOPTOSIS

Actualmente no se conocen al detalle las alteraciones de los delicados mecanismos implicados en el ciclo celular y el control de la apoptosis que juegan un papel relevante en el desarrollo del GIST. No obstante, se sabe que la activación constitutiva de una proteín-quinasa – habitualmente KIT – observada en todos los GISTs, conduce a una cascada de señales intracelulares en las que están implicadas diferentes proteínas: STAT 1 y 3, MAPK p42/43 y otras. Estas proteínas actúan a nivel nuclear como factores de transcripción sobre los promotores de diferentes genes, a partir de los cuales se sintetizan mediadores del ciclo celular y de la apoptosis, con un resultado final global de proliferación acelerada e inhibición de la apoptosis (Duensing *et al.*, 2004). Así, se ha demostrado que STAT 1 y, en menor medida STAT 3, activan la transcripción de genes que codifican proteínas que median en el proceso de la muerte celular programada, tales como Bcl-xL, caspasas, etc., así como algunos reguladores de la progresión del ciclo celular como p21 (Battle y Frank, 2002).

Se han estudiado de manera limitada las diferentes dianas moleculares sobre las que pueden actuar estos factores de transcripción en el caso de los GISTs. La proteína protectora frente a la apoptosis BCL-2 es una de las más evaluadas en las diferentes

series. En uno de los primeros trabajos publicados, de Suster y colaboradores (Suster *et al.*, 1998), se constata que BCL-2 es expresado inmunohistoquímicamente por los 47 GISTs incluidos en una serie de 380 tumores fusocelulares, y afirman que parece haber una estrecha correlación de la expresión de BCL-2 y CD34 en todos estos tumores. Tras esta observación de la expresión casi universal de BCL-2 en los GISTs, Panizo-Santos y colaboradores defienden que la inmunotinción para BCL-2 tiene valor pronóstico y, en sus manos, se expresa en el 93% de los GISTs clínicamente malignos, mientras que solo tiñe el 30% de los tumores benignos (Panizo-Santos *et al.*, 2000). Cunningham y colaboradores encuentran también que la expresión de BCL-2 se asocia a un pronóstico peor, pero sin alcanzar un nivel de significación estadística en el modelo univariante (Cunningham *et al.*, 2001). Noguchi y colaboradores, en una serie muy corta de solo 20 GISTs, apoyan la afirmación de que la sobreexpresión de BCL-2 predice el potencial maligno (Noguchi *et al.*, 2002). Por el contrario, Wong y colaboradores, en una serie mucho más numerosa que las anteriores, describen una inmunotinción positiva para BCL-2 en 56 de 108 GISTs, sin que este hallazgo guarde una relación con la evolución clínica de los pacientes (Wong *et al.*, 2003). Para añadir confusión a este asunto, en el estudio más reciente, Kontogianni y colaboradores refieren un pronóstico mejor en los tumores que expresan BCL-2 (Kontogianni *et al.*, 2003). En este trabajo nosotros encontramos una expresión de BCL-2 en 41 de los 83 tumores valorables (49,4%), sin que este dato aporte información pronóstica relevante. También se constata un estrecho vínculo, significativo estadísticamente ($p < 0,001$), entre la inmunotinción de BCL-2 y la de su antagonista proapoptótico BAX. En relación con esta última proteína, solo hemos hallado un estudio en el que se menciona la expresión inmunohistoquímica de BAX en el GIST (Kontogianni *et al.*, 2003). Es este artículo los autores refieren una inmunotinción positiva en el 80% de los tumores, una cifra idéntica a la que encontramos nosotros (67 de 84 tumores, 78,8%). Esta expresión tan generalizada de BAX tampoco se relaciona con la evolución clínica de los pacientes. Por ello creemos que BCL-2 y BAX deben jugar en el GIST su habitual papel fisiológico en los mecanismos de la apoptosis, pero en estos tumores no deben intervenir en la adquisición de un fenotipo maligno.

La proteína c-myc es un factor de transcripción que está involucrado en muchas funciones celulares tales como la regulación del ciclo celular, la apoptosis, el crecimiento celular, la adhesión y la diferenciación celular, y estas funciones están alteradas en muchas neoplasias, en particular en los linfomas (Sánchez-Beato *et al.*, 2003). Hasta donde nosotros sabemos, c-myc sólo fue valorado inmunohistoquímicamente en el GIST en un trabajo previo (Panizo-Santos *et al.*, 2000). Estos autores encontraron que una expresión sustancial de este marcador, en más del 25% de las células tumorales, se observaba en el 86,6% de los tumores clínicamente malignos, situación que se daba sólo

en el 20% de los benignos ($p = 0,0002$), y este parámetro permanecía como variable independiente tras aplicar un análisis multivariante, junto con el tamaño tumoral y el índice MIB1. Sin embargo, nosotros en este estudio observamos expresión de c-myc, por lo general muy intensa, en 70 de los 83 GISTs valorables (84,3%), sin que su presencia guarde ninguna relación con la evolución clínica de los pacientes.

La ciclina D1, sobre la que – entre otros factores – actúa el c-myc, es un regulador positivo de la progresión de la fase G1 del ciclo celular a la fase S. En estudios de sarcomas de partes blandas, se ha comprobado que un inmunofenotipo positivo para ciclina D1 predice una evolución desfavorable (Kim SH *et al.*, 1998). Tan solo existe una publicación previa en la que se explora la expresión de ciclina D1 en una serie de 108 GISTs gástricos, con el resultado paradójico de que el mejor pronóstico correspondía a los tumores que eran positivos para la ciclina D1, aunque este dato no alcanzaba el nivel de significación estadística ($p = 0,0717$) (Wong *et al.*, 2003). Nosotros observamos un inmunofenotipo positivo para este marcador en 24 de los 84 GISTs (28,6%), y tampoco resulta informativo sobre la evolución clínica de los pacientes, pero es mayor el porcentaje de tumores benignos que expresan ciclina D1 (30%) que el de tumores malignos (26,3%).

La proteína pRb es, al contrario que la ciclina D1, un regulador negativo en el punto de restricción del ciclo celular. La integridad de la cascada reguladora denominada “ruta de la pRb” (INK4-CDK4,6/ciclina D-Rb-E2F) está comprometida en muchos cánceres humanos (Ortega *et al.*, 2002; Sánchez-Beato *et al.*, 2003). No hemos encontrado ningún estudio que abordara la expresión inmunohistoquímica de este marcador en el GIST, aunque sí se ha estudiado la metilación del promotor de muchos genes supresores de tumores, entre ellos el gen Rb, observándose que en sus promotores no existía una hipermetilación que anulara su transcripción (House *et al.*, 2003). Nosotros observamos un inmunofenotipo positivo para pRb en 27 de los 83 tumores valorables (32,5%). De nuevo, la evaluación de pRb no aporta información pronóstica, aunque se detecta una relación significativa ($p = 0,004$) de la expresión de pRb con el grado de la neoplasia, con un mayor porcentaje de GISTs de grado alto expresando este marcador (59,1%) respecto a su expresión en los tumores de bajo grado (23%).

Las proteínas p21 y p27 pertenecen a la familia CIP/KIP de los CKI (*cyclin-dependent kinase inhibitors*) y actúan como genes supresores de tumores (Lloyd *et al.*, 1999). La expresión de p27 está inversamente relacionada con la proliferación y, de esta manera, en el tejido linfóide se tiñen fuertemente las células quiescentes (linfocitos del manto) mientras que las células proliferantes del centro germinal muestran un inmunofenotipo negativo (Sánchez-Beato *et al.*, 2003). También en tumores se ha

observado una relación inversa entre la tasa de proliferación y la expresión de p27, con repercusión sobre el pronóstico (Lloyd *et al.*, 1999). Solo hay dos trabajos publicados que exploran la utilidad del estudio inmunohistoquímico de p27 en el GIST. El primero, de Gelen y colaboradores (Gelen *et al.*, 2003), llega a la conclusión de que un inmunofenotipo positivo para p27 es un factor de buen pronóstico, tanto en el análisis univariante como en el multivariante, y refieren una relación inversa con el número de mitosis y el índice MIB1. El segundo, de Pruneri y colaboradores (Pruneri *et al.*, 2003), también encuentra una asociación inversa de la expresión de p27 con la tasa de proliferación, medida a través del índice MIB1, pero no alcanza un nivel de significación cuando se evalúa su vinculación a la supervivencia, probablemente debido al pequeño tamaño de la serie (21 tumores). En este estudio, 59 de 83 GISTs han sido negativos para p27 (71%), y en los restantes 24 (29%) se ha observado expresión de este marcador. No hemos encontrado que exista una asociación con la evolución clínica de los pacientes, y tampoco se establece con la tasa de proliferación, ya se exprese como el número de mitosis o como el índice MIB1. El gen que codifica la proteína p21 es activado por p53 e inhibe las CDKs, regulando de este modo el ciclo celular al bloquear la transición de la fase G1 a la fase S (Pindzola *et al.*, 1998; Sánchez-Beato *et al.*, 2003). Solo hemos localizado un trabajo que explora la expresión inmunohistoquímica de p21 en el GIST, englobado en una serie de 66 sarcomas de tejidos blandos (Pindzola *et al.*, 1998). Todos los GISTs expresaban p21, sin que los autores refieran la importancia pronóstica de este hallazgo. En este estudio, el porcentaje de GISTs con un inmunofenotipo positivo para p21 es de 44,6% (37 de 83 tumores) y este parámetro no es relevante en los análisis de supervivencia. Sin embargo, la expresión de p21 si se correlaciona con la de otros marcadores que participan en las mismas vías moleculares del ciclo celular: p27 y p53.

De todas las proteínas evaluadas en este trabajo, la que ha suscitado un mayor interés en éste y en todos los demás campos de la patología oncológica es p53, el producto del más importante de los genes supresores de tumores. La proteína p53 es un factor de transcripción que induce el bloqueo del ciclo celular o desencadena la apoptosis en respuesta al daño del ADN y a una gran variedad de estímulos tóxicos. Como se dijo antes, la regulación negativa de p53 en la progresión del ciclo celular está mediada por la inducción del gen *p21* (Bury y Cross, 2003). El gen *p53* es el que más frecuentemente muestra mutaciones en el cáncer humano (Ortega *et al.*, 2002), aunque su anulación funcional también puede alcanzarse por otras vías como la hiperactivación de sus antagonistas (*MDM2*) o la inactivación de sus agonistas (*p14*) (Sánchez-Beato *et al.*, 2003).

Son cinco los principales trabajos que han evaluado la expresión inmunohistoquímica de p53 en el GIST, generalmente combinada con otros marcadores (Cunningham *et al.*, 2001; Noguchi *et al.*, 2002; Panizo-Santos *et al.*, 2000; Wang X *et al.*, 2002; Wong *et al.*, 2003), con unos resultados no homogéneos. En dos de estos trabajos (Cunningham *et al.*, 2001; Noguchi *et al.*, 2002) no se encuentra relación entre la inmunoreactividad a p53 y el pronóstico, mientras que en los tres restantes sí que se alcanza un nivel de significación estadística en el análisis univariante, pero la expresión de p53 pierde su valor como parámetro independiente de predicción pronóstica cuando se aplica un modelo multivariante de análisis de la supervivencia. En esta serie de GISTs, nosotros sí observamos que un inmunofenotipo positivo para p53 se correlaciona claramente con una evolución clínica desfavorable y, lo que es más importante, permanece en el análisis multivariante del modelo de Cox como parámetro informativo sobre el pronóstico, junto con un tamaño superior a los 10 cm de diámetro, y la localización del tumor en el intestino delgado. La intensidad de la inmunotinción es raramente fuerte y el porcentaje de células teñidas suele ser bajo, y creemos que un caso de GIST debe ser considerado positivo incluso con tinciones débiles y focales para p53. Es muy interesante reseñar que el único paciente con un GIST clínicamente maligno que inicialmente no se asignó a la categoría de alto riesgo, y que, como se relató anteriormente, se presentó con metástasis hepáticas 17 años después de la cirugía inicial, expresa la proteína p53 en el estudio inmunohistoquímico del tumor resecado el año 1987. Por todo esto creemos que la inmunotinción para p53 debe ser evaluada sistemáticamente en los GISTs y, si se expresa en tumores de riesgo muy bajo, bajo o intermedio, el paciente debe ser vigilado más estrechamente pues se incrementan las posibilidades de que la evolución posterior sea desfavorable, y es recomendable que este seguimiento sea prolongado pues no son raras en el GIST las recidivas muy tardías (Miettinen *et al.*, 2003). Alternativamente, podría considerarse la opción de instaurar un tratamiento adyuvante con imatinib en los tumores de alto riesgo que, además, expresan p53. Hasta donde nosotros sabemos, no se han realizado estudio mutacionales de *p53* en el GIST, y es probable que la proteína p53 acumulada en los núcleos celulares de los GISTs que la expresan sea funcional, y esté sintetizada a partir del gen *wild-type*, en un intento de bloquear la proliferación celular acelerada por la activación de otros factores de transcripción.

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

1. Los GISTs gástricos son a menudo de tipo histológico epitelioide, sufren degeneración quística, y expresan con mayor frecuencia CD34; mientras que los del intestino delgado son fusocelulares y muestran frecuentemente fibras esquenoides.

2. La aplicación de los *tissue microarrays* al estudio de los GISTs es una técnica informativa y robusta, con resultados óptimos tanto en el estudio histológico convencional como en la aplicación de las tinciones inmunohistoquímicas.

3. La inmunotinción positiva para la proteína KIT (CD117) es recomendable pero no exigible para el diagnóstico de GIST. Si todas las demás características clínico-patológicas son compatibles con esta entidad, debe mantenerse el diagnóstico.

4. Los mejores resultados en la tinción inmunohistoquímica para la proteína KIT (CD117) se obtienen con el anticuerpo policlonal A4502 (DAKO) a una dilución de 1:100, con pretratamiento basado en calor. El pretendido incremento en la especificidad logrado con otros procedimientos (prescindiendo de la recuperación antigénica o a mayores diluciones del primario) es a costa de un inaceptable descenso en la sensibilidad.

5. Los marcadores de mayor rendimiento para resolver los problemas de diagnóstico diferencial en el GIST son CD117, desmina, S-100 y β -catenina, que tiñen positivamente los GISTs, los tumores de músculo liso, los schwannomas, y las fibromatosis mesentéricas, respectivamente, atendiendo siempre a las positividades cruzadas. A estos anticuerpos es posible que deba añadirse el CD34, el marcador positivo de los infrecuentes tumores fibrosos solitarios de la cavidad abdominal, que no hemos encontrado en esta serie. La actina y la vimentina son poco útiles por su amplio espectro de expresión, y la GFAP complementa a la S-100 en la identificación de los schwannomas.

6. En los análisis univariante de supervivencia, por el método de Kaplan-Meier y por el modelo de regresión de Cox, los parámetros que muestran relevancia pronóstica son el tamaño tumoral, la proliferación celular – evaluada a través de la contabilidad de las mitosis o de los núcleos teñidos con MIB-1 -, el órgano en el que asienta el tumor (estómago vs. intestino

delgado), la presencia de necrosis, el grado histológico, y la inmunoreactividad para p53.

7. La mejor forma de evaluar la tasa de proliferación en el GIST es a través del índice MIB-1. Un porcentaje igual o superior a un 5% de núcleos teñidos con MIB-1 en las células neoplásicas se asocia a una mala evolución clínica, con mayor nivel de significación estadística que el número de mitosis por 50 CGA, independientemente de los puntos de estratificación que se empleen.

8. La asignación de un GIST a la categoría de alto riesgo, aplicando la clasificación pronóstica vigente basada en la combinación de los datos de tamaño tumoral y número de mitosis por 50 campos de gran aumento, es la variable con una mayor odds ratio. Todos los tumores malignos de esta serie, excepto uno, eran de alto riesgo.

9. La estratificación de la puntuación o *score* resultado de la suma directa del diámetro máximo de cada tumor, expresado en centímetros, y su índice MIB-1 desplaza en el análisis de regresión multivariante de Cox a la clasificación pronóstica vigente. La estratificación propuesta define tres categorías de GISTs: bajo riesgo (*score*: 1-7), riesgo intermedio (*score*: 8-15), y alto riesgo (*score*: mayor de 15).

10. En el análisis multivariante, permanecen como parámetros que aportan información pronóstica independiente el tamaño, el órgano y la inmunotinción para p53. Los GISTs mayores de 10 cm, los situados en el intestino delgado y los que expresan p53, tendrán más probablemente una evolución desfavorable.

11. Hay asociaciones estadísticamente significativas y mutuas entre tres de las proteínas implicadas en el control del ciclo celular que hemos evaluado: p21, p27 y p53. Sin embargo, sólo la expresión de p53 mostró una asociación sólida con la malignidad clínica. Creemos aconsejable añadir sistemáticamente la inmunotinción de p53 al estudio pronóstico de todos los GISTs y, en caso de resultar positivo, mantener un seguimiento más estrecho de los pacientes.

VII. ANEXOS

VII. ANEXOS

VII.1 ANEXO 1. DATOS CLÍNICOS

GIST	SEXO	EDAD	PRESENTACIÓN	LOC	MALIG	SEG	I/R/M	SITUACIÓN
1	F	80	HEMOPERITONEO	DEL		12		VSE
2	M	64	HDB-A	EST		16		VSE
3	M	78	HDA	EST		17		VSE
4	M	42	HDB-A	EST		19		VSE
5	F	70	CAS Técnicas de imagen	DEL		21		VSE
6	F	82	CAS Cáncer gástrico	EST		0		MOC Dehiscencia anastomosis
7	M	75	HDB-A	DEL	CM	21	0	VCE Glivec
8	F	46	HDA	EST		21		VSE
9	F	72	HDA	EST	CM	22	22	VCE Glivec
10	M	72	CAS Cáncer colorrectal	DEL	CM	4	0	MOC Carcinomatosis Implantes
11	M	28	HDB-A	DEL		22		VSE
12	F	71	DOLOR	EST		23		VSE
13	M	83	HDA-UR	EST		7		MOC Prótesis cadera infectada
14	M		CAS Donante órganos	EST		0		MOC Donante órganos
15	F	51	MET	MUL	CM	39	0	MPE Metástasis hepáticas
16	M	69	HDB-A	DEL	CM	96	60	MPE Metástasis hepáticas
17	M	70	CAS Hernia estrangulada	DEL		32		VSE
18	M	64	CAS Cáncer gástrico	EST		14		MOC Carcinomatosis peritoneal
19	F	73	CAS Enf. de Crohn	EST		0		MOC Shock séptico
20	M	63	DOLOR	EXT	CM	18	18	MPE Recidiva abdominal masiva
21	M	69	MASA	EST		33		VSE
22	F	77	CAS Cáncer colorrectal	EST		27		MOC Insuficiencia respiratoria
23	M	81	CAS Cáncer colorrectal	EST		42		VSE
24	M	55	CAS Cáncer colorrectal	DEL		42		MOC Metástasis masivas
25	M	54	OBS-UR	DEL	CM	47	16	MPE Recidiva masiva abdominal
26	F	57	HDB-A	EST		51		VSE
27	M	72	MASA	DEL	CM	37	0	MPE Recidiva masiva abdominal
28	F	72	CAS Técnicas de imagen	EST	CM	13	0	MPE Recidiva masiva abdominal
29	M	71	HDB-A	DEL	CM	24	17	MPE Recidiva masiva abdominal
30	F	67	HDB-UR	EST		59		VSE
31	F	30	OBS-UR	DEL		60		VSE
32	M	54	DOLOR	EST	CM	60	34	MPE Metástasis hepáticas Glivec
33	F	74	CAS Cáncer colorrectal	EST		61		VSE
34	F	67	CAS Colectomía	EST		66		VSE
35	F	77	CAS Cáncer gástrico	EST		1		MOC Infarto de miocardio
36	M	58		DEL				PERDIDO
37	M	86	MASA	DEL		4		MOC Neumonía
38	M	69	CAS Perforación intestinal	EST		70		VSE
39	M	61	DOLOR	DEL	CM	37	35	MPE Recidiva masiva abdominal
40	F	67	DOLOR	EST		74		VSE
41	F	59	CAS Cáncer gástrico	DEL		19		MOC Carcinomatosis peritoneal
42	M	65	DOLOR	ESO		76		VSE
43	F	70	CAS Cáncer colorrectal	DEL		79		VSE
44	M	63	HDB-A	DEL	CM	52	34	MPE
45	M	63	HDB	DEL		80		VSE
46	M	52	HDB-A	DEL	CM	63	52	MPE Metástasis hepáticas
47	M	87	HDB-UR	EST		78		MOC Neumonía
48	F	69	CAS Cáncer colorrectal	EST		86		VSE
49	F	72		EST				PERDIDO
50	M	80	HDB-A	DEL		90		MOC Neumonía
51	F	65	HDB-A	EST		90		VSE
52	F	80	DOLOR	EST		93		MOC Sepsis
53	F	66	CAS Perforación intestinal	DEL		94		VSE
54	M	56	HDB-A	DEL		96		VSE
55	M	88	HDB	DEL		48		MOC Insuficiencia vascular
56	F	40	HDB-A	EST		97		VSE
57	F	55	HDB-A	EXT	CM	34		MPE Metástasis hepáticas
58	F	69	CAS Estenosis pilórica péptica	EST		98		VSE
59	F	64	HDB-A	DEL	CM	14	6	MPE Recidiva masiva abdominal
60	F	45	HDB-A	EST		100		VSE

GIST	SEXO	EDAD	PRESENTACIÓN	LOC	MALIG	SEG	I/R/M	SITUACIÓN
61	F	66	OBS-UR	DEL		100		VSE
62	F	68	MASA	DEL	CM	18		MPE Metástasis hepáticas
63	F	78	CAS Cáncer colorrectal	REC		64		MOC Carcinomatosis peritoneal
64	M	79	CAS Cáncer gástrico	EST		15		MOC Metástasis hepáticas
65	M	47	CAS Hernia inguinal	DEL		105		VSE
66	F	62	CAS Técnicas de imagen	EST		109		VSE
67	M	74	HDA-A	EST		84		MOC Leucemia aguda
68	M	53	HDB	EST		117		VSE
69	F	60	CAS Endoscopia	EST		120		VSE
70	M	73	HDB-A	EST		126		VSE
71	M	70	HDB-A	EST		64		MOC Cáncer colorrectal disem.
72	F	52		COL				PERDIDO
73	F	78		EST				PERDIDO
74	M	60	MASA	EXT		1		MOC Neumonía
75	M	60	MASA	EST		96		MOC Infarto de miocardio
76	F	66	MASA	EST	CM	108	45	MPE Metástasis hepáticas
77	M	76	MASA	EST		146		MOC Cáncer próstata diseminado
78	M	47	HDB-A	DEL	CM	186	188	VCE Metástasis hepáticas Glivec
79	F	65	HDB-A	EST		200		VSE
80	M	47		EST		60		MOC Cáncer colorrectal diseminado
81	F	78	MASA	EST		12		MOC Neumonía
82	F	70	CAS Técnicas de imagen	EST	CM	13	13	MPE Recidiva masiva abdominal
83	F	70	MASA	EXT				PERDIDO
84	F	55		EST		200		VSE

Abreviaturas: M sexo masculino, F sexo femenino, CAS descubrimiento casual, HMA hemorragia digestiva alta, HDB hemorragia digestiva baja, A anemia, OBS obstrucción, ESO esófago, EST estómago, DEL intestino delgado, COL colon, EXT extradigestivo, CM comportamiento clínico maligno, SEG seguimiento (en meses), I/R/M momento de aparición de implantes tumorales, recidivas locales o metástasis a distancia, VSE vivo sin enfermedad, VCE vivo con enfermedad, MPE muerto por enfermedad, MOC muerto otras causas.

VII.2 ANEXO 2. CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS

GIST	LOC	RIESGO	MALIG	TAMAÑO	M/50	TIPO	NEC	HEM	ULC	QUIS	ESQ	INF	GR	M	ELEC
1	DEL	INT		5,5	2	FUS	1	1		0	0		2		
2	EST	INT		6 X 5	1	MIXTO	0	1	1	1	0	0	1	Dif.	Dual
3	EST	BAJO		3,5	1	FUS	0	1	1	0	0	0	1		
4	EST	BAJO		4,5	0	EPIT	0	0		1	0	0	1		
5	DEL	INT		6 X 5	0	FUS	0	1	0	0	1	0	2		
6	EST	M BAJ		0,4	0	MIXTO	0	0	0	0	0	0	1		
7	DEL	ALTO	CM	6,5	12	FUS	1	1		0	0		2		
8	EST	BAJO		4 X 3	1	MIXTO	0	1	1	1	0	0	1		
9	EST	ALTO	CM	10,5 X 10	0	FUS	0	0		0	0		1		
10	DEL	ALTO	CM	3,5 X 3	110	FUS	1	1		0	0		2		
11	DEL	BAJO		2,6 X 2,4	0	FUS	0	0	1	0	0	0	1		
12	EST	M BAJ		0,5	0	MIXTO	0	0	0	0	0	0	1		
13	EST	INT		9 X 5	1	FUS	1	1	0	1	0	0	1		
14	EST	BAJO		2,5 X 2,4	0	FUS	0	0	0	0	0	0	1		
15	MUL	ALTO	CM	HASTA 20	2	MIXTO	0	0	1	1	0	0	2	Dif.	Neural
16	DEL	ALTO	CM	?	10	FUS	0	1		0	0		2		
17	DEL	M BAJ		0,7	0	FUS	0	0	0	0	0	0	1		
18	EST	INT		6 X 3	2	FUS	0	0	1	0	0	1	1		
19	EST	M BAJ		1,3	0	FUS	0	0	0	0	0	0	1		
20	EXT	ALTO	CM	22 X 18	11	FUS	0	0		0	0		2		
21	EST	INT		9 X 7,5	1	EPIT	1	1	1	1	0	0	2		
22	EST	M BAJ		1 X 0,9	0	EPIT	0	0	0	0	0	0	2		
23	EST	M BAJ		1,1 X 1	0	MIXTO	0	0	0	0	0	0	1		
24	DEL	BAJO		2,3	0	FUS	0	0	0	0	0	0	1		
25	DEL	ALTO	CM	HASTA 10	16	FUS	0	1	1	0	0	0	2	Dif.	Dual
26	EST	M BAJ		2 X 1,8	1	MIXTO	0	1	1	1	0	0	1		
27	DEL	ALTO	CM	?	3	MIXTO	0	1		0	0		1		
28	EST	ALTO	CM	6 X 4	7	FUS	0	1	1	0	0	0	1		
29	DEL	ALTO	CM	16 X 11	2	FUS	1	1	0	0	1	0	2		
30	EST	M BAJ		1,8 X 1,5	1	FUS	0	0	0	0	0	0	1		
31	DEL	BAJO		4	0	FUS	0	0		0	0	0	1		
32	EST	ALTO	CM	26 X 16	17	FUS	0	1	1	0	0	0	1	Dif.	Muscular
33	EST	BAJO		4 X 2	0	FUS	0	0	0	0	0	0	1		
34	EST	M BAJ		1 X 0,8	1	EPIT	0	0	0	0	0	0	2		
35	EST	M BAJ		0,6	0	FUS	0	0	0	0	0	0	1		
36	DEL	INT		10	1	FUS	1	1					1	Dif.	Neural
37	DEL	ALTO		13 X 12	1	FUS	1	1			1		1		
38	EST	INT		4,3 X 2,8	6	FUS	0	1	0	0	0	0	1		
39	DEL	ALTO	CM	13	2	MIXTO	1	1	1		0	0	1		
40	EST	INT		6 X 4	3	FUS	0	1	1	0	0	0	1	Dif.	Neural
41	DEL	M BAJ		1 X 0,8	0	FUS	0	0	0	0	0	0	1		
42	ESO	M BAJ		1,5 X 1	0	FUS	0	0	0	0	1	0	1		
43	DEL	M BAJ		1,2	2	FUS	0	0	0	0	1	0	1		
44	DEL	ALTO	CM	10,5	93	FUS	0	1		0	0	0	2	Dif.	Dual
45	DEL	INT		5,7 Y 2,4	2	FUS	1	1	0	0	1	0	1	Dif.	Dual
46	DEL	ALTO	CM	10 X 6	7	MIXTO	0	1	0	0	0	0	1	Dif.	Muscular
47	EST	BAJO		4 X 3	0	FUS	0	0	1	0	0	0	1	Dif.	Neural
48	EST	M BAJ		2 X 1,2	0	FUS	0	1	0	0	0	0	1		
49	EST	BAJO		3,5 X 2,5	1	MIXTO	0	0	0	0	0	0	1	Dif.	Muscular
50	DEL	BAJO		4,3 X 3	1	FUS	0	1	0	0	0	0	2		
51	EST	BAJO		2,7 X 1,6	2	FUS	0	1	0	0	0	0	1	Dif.	Neural
52	EST	ALTO		11 X 7	3	EPIT	1	1	1	1	0	0	1	Dif.	Muscular
53	DEL	M BAJ		1,3 X 0,8	2	FUS	0	0	0	0	0	0	2		
54	DEL	INT		6 X 5	0	FUS	0	0	1	1	0	0	1		
55	DEL	BAJO		3,2	0	FUS	0	0	1	0	0	0	1		

GIST	LOC	RIESGO	MALIG	TAMAÑO	M/50	TIPO	NEC	HEM	ULC	QUIS	ESQ	INF	GR	M	ELEC
56	EST	BAJO		4 X 4	3	MIXTO	0	0	1	0	0	0	1		Dif. Muscular
57	EXT	ALTO	CM	15 X 12	2	FUS	0	1		1	0		2		Dif. Neural
58	EST	M BAJ		0,5	0	FUS	0	0	0	0	0	0	1		
59	DEL	ALTO	CM	32 X 28	4	FUS	0	1	0	0	0	0	1		
60	EST	INT		4,9 X 4	10	FUS	0	0	0	0	0	0	1		
61	DEL	INT		5,2 X 2,5	0	FUS	0	0	1	0	0	0	1		
62	DEL	ALTO	CM	20	32	FUS	1	1	0	1	0	0	2		
63	REC	ALTO		5 X 4	6	MIXTO	0	1	0	0	0	0	1		
64	EST	BAJO		5	4	FUS	0	1	0	0	0	0	1		
65	DEL	M BAJ		0,8	0	FUS	0	0	0	0	1	0	1		
66	EST	BAJO		2 X 1,5	1	FUS	0	0	0	0	0	0	1		
67	EST	INT		5 X 3,5	1	FUS	0	1	0	0	0	0	1		Dif. Neural
68	EST	BAJO		4 X 3,5	4	FUS	1	1	0	1	0	0	2		
69	EST	BAJO		4 X 2	3	FUS	0	1	0	0	0	0	1		
70	EST	INT		7 X 6	1	FUS	0	1	0	0	0	0	1		
71	EST	INT		7 X 3,5	1	EPIT	0	0	0	0	0	0	1		
72	COL	M BAJ		1,2 X 1	0	FUS	0	0	0	0	1	0	1		
73	EST	BAJO		5	1	FUS	0	1	1	0	0	0	1		
74	EXT	ALTO		20	99	FUS	1	1	0	0	0	0	2		
75	EST	ALTO		26 X 23	1	EPIT	0	1	0	1	0	0	2		
76	EST	ALTO	CM	14 X 13	32	FUS	1	1	1	0	0	0	2		
77	EST	ALTO		21 X 16	1	EPIT	0	1	0	1	0	0	1		
78	DEL	BAJO	CM	5 X 3,5	2	FUS	0	0	0	0	1	0	1		
79	EST	INT		6 X 5	2	MIXTO	0	1	1	1	0	0	1		
80	EST	ALTO		15 X 11	1	EPIT	0	1	0	1	0	0	2		
81	EST	ALTO		26 X 15	12	EPIT	1	1	0	1	0	0	2		
82	EST	ALTO	CM	30 X 22	1	EPIT	0	0	0	1	0	0	1		
83	EXT	INT		2,5	2	EPIT	0	1	0	1	0	0	1		
84	EST	BAJO		6	1	MIXTO	0	1	0	1	0	0	1		

Abreviaturas: M/50 número de mitosis por 50 campos de gran aumento, FUS tumor fusocelular, EPIT tumor epitelioide, NEC necrosis, HEM hemorragia, ULC ulceración, QUIS degeneración quística, ESQ fibras esquenoides, INF infiltración de la lámina propia de la mucosa, GR grado histológico (1, 2 y 3), M ELEC microscopía electrónica.

Los rasgos morfológicos evaluados (NEC, HEM, ULC, QUIS, ESQ e INF) se tabulan como 0 (ausencia del rasgo) y 1 (presencia del rasgo).

VII.3 ANEXO 3. DATOS INMUNOHISTOQUÍMICOS

GIST	KIT	CD34	S100	GFAP	DES	AME	βCAT	VIM	Ki67	p53	Bax	bcl-2	CicD1	pRb	p21	c-myc	p27
1	2	0	0	0	0	0	0	2	13	1	2	1	0	0	0	2	0
2	1	1	0	0	0	0	0	2	8	1	2	1	0	0	0	2	0
3	2	2	0	0	0	0	0	2	10,5	0	2	0	0	0	0	2	0
4	1	1	0	0	0	0	0	2	8	1	2	1	0	0	1	2	1
5	2	2	0	0	0	0	0	2	0	0	2	1	0	0	1	2	0
6	2	2	1	0	0	1	0	2	4,5	0	2	0	0	0	0	2	0
7	2	1	1	0	0	0	0	2	36	1	2	1	0	0	2	2	2
8	1	1	0	0	0	0	0	2	4,5	0	2	1	0	0	0	2	0
9	2	2	0	0	0	0	0	2	9	1	2	0	1	0	2	2	0
10	2	2	0	0	0	0	0	2	189	2	2	0	0	1	2	2	2
11	2	2	0	0	0	0	0	2	5	1	2	2	1	0	0	1	0
12	1	2	0	0	0	0	0	2	9,5	1	2	0	0	0	0	2	0
13	1	2	0	0	0	0	0	2	62	1	2	0	0	1	0	1	0
14	0	0	0	0	0	0	0	2	3	0	1	0	0	0	1	2	0
15	2	2	0	0	0	0	0	2	15,5	2	2	0	0	0	0	2	0
16	2	0	1	0	0	0	0	2	62,5	0	2	1	0	0	1	2	1
17	2	1	0	0	0	0	0	2	3	1	2	2	0	0	1	1	1
18	2	2	0	0	0	0	0	2	21	0	2	0	0	0	0	2	0
19	2	2	0	0	0	0	0	2	2	2	2	0	0	0	0	2	1
20	2	2	0	0	0	0	0	2	39,5	2	2	1	0	0	0	2	1
21	1	1	0	0	0	0	0	2	5	0	2	1	1	0	1	2	1
22	1	1	1	0	0	0	0	2	2	1	2	1	0	0	0	2	0
23	1	1	0	0	0	0	0	2	2,5	1	1	0	0	0	1	2	1
24	2	1	0	0	0	0	0	2	1	0	2	0	0	0	0	1	0
25	2	2	2	0	0	0	0	2	50,5	1	2	2	0	0	0	2	0
26	1	1	0	0	0	0	0	2	5	0	2	2	0	0	1	2	0
27	2	2	1	1	1	1	0	2	25	2	2	1	0	0	1	2	0
28	2	2	0	0	0	0	0	2	10	1	2	0	1	0	1	2	0
29	2	0	0	0	0	0	0	2	2	0	2	1	0	0	1	2	0
30	2	1	1	0	1	0	0	2	0	0	2	0	1	0	0	1	1
31	0	0	1	0	0	0	0	2	7	0	2	0	1	0	0	2	0
32	2	2	0	0	0	0	0	2	42	0	1	0	0	0	0	1	0
33	2	2	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	1	0	1	2	0
34	2	0	1	0	0	0	0	2	5	2	2	2	1	1	2	2	2
35	2	2	1	0	1	1	0	2	3,5	0	2	0	1	0	0	1	0
36	2	0	0	0	0	0	0	2	7	0	2	2	0	0	1	1	1
37	2	1	0	0	0	0	0	2	1,5	0	2	0	0	0	0	1	0
38	2	2	0	0	0	0	0	2	10	0	2	1	1	0	1	2	0
39	2	0	0	0	0	0	0	2	11	0	2	1	1	0	0	2	1
40	2	2	0	0	0	0	0	2	13	0	1	0	0	0	0	2	0
41	2	1	2	0	0	0	0	2	1	0	2	1	0	0	0	1	0
42	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
43	2	0	1	0	0	0	0	2	0,5	0	2	1	0	0	0	1	0
44	2	0	0	0	0	0	0	2	58		2		0	0	1	2	1
45	2	1	0	0	0	0	0	2	0	1	2	2	0	0	0	2	1
46	2	1	0	0	0	0	0	2	18	1	2	1	0	0	0	1	0
47	2	2	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	0	0	2	0
48	2	2	0	0	0	0	0	2	0,5	0	1	0	0	0	0	2	0
49	1	1	0	0	0	0	0	2	5	1	1	0	0	0	1	1	1
50	2	0	0	0	0	0	0	2	10	0	2	2	0	0	1	2	1
51	2	2	0	0	0	0	0	2	8	1	2	0	0	1	0	2	0
52	1	1	0	0	1	0	0	2	14	2	2	2	0	0	0	2	1
53	2	0	0	0	0	0	0	2	3	0	2	2	0	0	0	1	0
54	1	1	0	0	0	0	0	2	0	0	2	1	0	0	0	1	0
55	2	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	1	0	0	0	1	0

GIST	KIT	CD34	S100	GFAP	DES	AME	βCAT	VIM	Ki67	p53	Bax	bcl-2	CicD1	pRb	p21	c-myc	p27
56	1	2	0	0	0	0	0	2	1,5	1	2	1	1	0	2	2	1
57	2	0	0	0	0	0	0	2	35	1	2	2	1	0	1	2	2
58	2	2	1	0	1	1	0	1	4	0	2	0	1	0	1	1	0
59	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	1	0	0	0	0	2	0
60	2	2	0	0	0	0	0	2	10,5	1	2	0	1	0	0	2	0
61	2	1	0	0	0	0	0	2	0	0	2	2	0	0	0	2	0
62	1	2	0	0	1	1	0	2	46	1	2	0	0	0	1	1	1
63	2	2	0	0	0	0	0	2	18	2	2	1	0	0	1	2	1
64	2	2	0	0	0	0	0	2	3	1	1	0	1	0	0	2	0
65	0	0	0	0	0	0	0	2	1		1	0	0	0	0	2	
66	2	2	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	1	0	0	2	0
67	2	2	0	0	0	0	0	2	1	2	2	0	0	0	1	2	1
68	2	2	0	0	0	0	0	2	1,5	1	2	0	1	0	1	2	1
69	2	2	0	0	0	0	0	2	3	0	2	1	1	0	1	2	0
70	2	2	0	0	0	0	0	2	0	1	2	0	1	0	1	2	0
71	2	2	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	0	0	2	0
72	0	1	0	0	2	2	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0
73	2	2	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	0	0	2	0
74	2	2	0	0	0	0	0	2	35	2	1	1	0	0	0	2	0
75	1	2	0	0	0	0	0	2	0	0	1	1	0	1	0	2	0
76	2	2	0	0	0	0	0	2	18	2	2	2	0	1	0	2	0
77	1	2	0	0			0	2	0	0	2	1	0	0	0	2	0
78	2	1	0	0	0	0	0	2	0	1	2	0	0	0	0	2	0
79	1	2	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	0	0	2	0
80	1	2	0	0	0	0	0	2	0	0	2	1	0	0	1	2	0
81	2	2	0	0	0	0	0	2	9	1	2	0	1	0	0	2	0
82	1	2	0	0	0	0	0	2	0	0	2	2	0	0	0	2	0
83	1	2	0	0	0	0	0	2	0	1	2	1	1	0	0	2	0
84	1	0	0	0	1	2	0	1	0	0	2	1	0	0	1	2	0

Abreviaturas: DES desmina, AME actina músculo específica, VIM vimentina, CicD1 ciclina D1.

La intensidad de las inmunotinciones se gradúa de la siguiente manera:

- 0: Tinción negativa.
- 1: Expresión débil.
- 2: Expresión intensa.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Abdulkader I, Cameselle-Teijeiro J, Gude F, Fraga M, Varela-Durán J, Barreiro F y Forteza J. Predictors of malignant behaviour in gastrointestinal stromal tumors: a clinicopathological study of 34 cases. *Eur J Surg* 2002; **168**: 288-296.

Allander SV, Nupponen NN, Ringnér M, Hostetter G, Maher GW, Goldberger N, Chen Y, Carpten J, Elkahloun AG y Meltzer PS. Gastrintestinal stromal tumors with KIT mutations exhibit a remarkably homogeneous gene expression profile. *Cancer Res* 2001; **61**: 8624-8628.

Alman BA, Pajerski ME, Diaz-Cano S y Wolfe HJ. Increased beta-catenin protein and somatic APC mutations in sporadic aggressive fibromatoses (desmoid tumors). *Am J Pathol* 1997; **151**: 329-334.

Amin MB, Ma CK, Linden MD, Kubus JJ y Zarbo RJ. Prognostic value of proliferating cell nuclear antigen index in gastric stromal tumors. Correlation with mitotic count and clinical outcome. *Am J Clin Pathol* 1993; **100**: 428-432.

Andersson J, Sjogren H, Meis-Kindblom JM, Stenman G, Aman P y Kindblom LG. The complexity of KIT gene mutations and chromosome rearrangements and their clinical correlation in gastrointestinal stromal (pacemaker cell) tumors. *Am J Pathol* 2002; **160**: 15-22.

Antonescu CR, Viale A, Sarran L, Tschernyavsky SJ, Gonen M, Segal NH, Maki RG, Succi ND, DeMatteo RP y Besmer P. Gene expression in gastrointestinal stromal tumors is distinguished by KIT genotype and anatomic site. *Clin Cancer Res* 2004; **10**: 3282-3290.

Appelman HD y Helwig EB. Sarcomas of the stomach. *Am J Clin Pathol* 1977; **67**: 2-10.

Apperley JF, Gardembas M, Melo JV, Russell-Jones R, Bain BJ, Baxter EJ, Chase A, Chessells JM, Colombat M, Dearden CE, Dimitrijevic S, Mahon FX, Marin D, Nikolova Z, Olavarria E, Silberman S, Schultheis B, Cross NC y Goldman JM. Response to imatinib mesylate in patients with chronic myeloproliferative diseases with rearrangements of the platelet-derived growth factor receptor beta. *N Engl J Med* 2002; **347**: 481-487.

Au NH, Cheang M, Huntsman DG, Yorida E, Coldman A, Elliott WM, Bebb G, Flint J, English J, Gilks CB y Grimes HL. Evaluation of immunohistochemical markers in non-small cell lung cancer by unsupervised hierarchical clustering analysis: a tissue microarray study of 284 cases and 18 markers. *J Pathol* 2004; **204**: 101-109.

Bates AW, Feakins RM y Scheimberg I. Congenital gastrointestinal stromal tumor is morphologically indistinguishable from the adult form, but does not express CD117 and carries a favourable prognosis. *Histopathology* 2000; **37**: 316-322.

Battle TE y Frank DA. The role of STATs in apoptosis. *Curr Mol Med* 2002; **2**: 381-392.

Bell SW, Kempson RL y Hendrickson MR. Problematic uterine smooth muscle neoplasms. A clinicopathologic study of 213 cases. *Am J Surg Pathol* 1997;

21: 252-255.

Berman J y O'Leary TJ. Gastrointestinal stromal tumor workshop. *Hum Pathol* 2001; **32:** 578-582.

Berthet B, Sugarbaker TA, Chang D y Sugarbaker PH. Quantitative methodologies for selection of patients with recurrent abdominopelvic sarcoma for treatment. *Eur J Cancer* 1999; **35:** 413-419.

Blay P, Astudillo A, Buesa JM, Campo E, Abad M, Garcia-Garcia J, Miquel R, Marco V, Sierra M, Losa R, Lacave A, Brana A, Balbin M y Freije JM. Protein kinase C theta is highly expressed in gastrointestinal stromal tumors but not in other mesenchymal neoplasias. *Clin Cancer Res* 2004; **10:** 4089-4095.

Bloom HJG y Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer. A study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer* 1957; **11:** 359-367.

Brainard JA y Goldblum JR. Stromal tumors of the jejunum and ileum. A clinicopathologic study of 39 cases. *Am J Surg Pathol* 1997; **21:** 407-416.

Bromberg J. Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest* 2002; **109:** 1139-1142.

Brumming P, Andersson J, Meis-Kindblom JM, Klingenstierna H, Engstrom K, Stierner U, Wangberg B, Jansson S, Ahlman H, Kindblom LG y Nilsson B. Neoadjuvant, adjuvant and palliative treatment of gastrointestinal stromal tumors (GIST) with imatinib: a centre-based study of 17 patients. *Br J Cancer* 2003; **89:** 460-464.

Bucher P, Taylor S, Villiger P, Morel P y Brundler MA. Are there any prognostic factors for small intestinal stromal tumors?. *Am J Surg* 2004; **187:** 761-766.

Bury J y Cross S. Molecular biology in diagnostic histopathology: Part I – The cell cycle. *Current Diag Pathol* 2003; **9:** 266-275.

Cáceres N, Estévez A, González-Carreró J, Fernández R, López A, Toscano A, Piñeiro H y Gil P. Leiomioblastomas gástricos. *Cir Esp* 1992; **51:** 44-49.

Carney JA. Gastric stromal sarcoma, pulmonary chondroma, and extra-adrenal paraganglioma (Carney Triad): natural history, adrenocortical component, and possible familial occurrence. *Mayo Clin Proc* 1999; **74:** 543-552.

Carney JA y Stratakis CA. Familial paraganglioma and gastric stromal sarcoma: a new syndrome distinct from Carney triad. *Am J Med Genet* 2002; **108:** 132-139.

Carrillo R, Candía A, Rodríguez-Peralto JL y Caz V. Prognostic significance of DNA ploidy and proliferative index (MIB-1 index) in gastrointestinal stromal tumors. *Hum Pathol* 1997; **28:** 160-165.

Chompret A, Kannengiesser C, Barrois M, Terrier P, Dahan P, Tursz T, Lenoir GM y Bressac-De Paillerets B. PDGFRA germline mutation in a family with multiple cases of gastrointestinal stromal tumor. *Gastroenterology* 2004; **126:** 318-

321.

Coltrera M, Skelly M y Gown A. Anti-PCNA antibody PC10 yields unreliable proliferation indexes in routinely processed, deparaffinized, formalin-fixed tissue. *Appl Immunohistochem* 1993; **1**: 193-200.

Conlon KC, Casper ES y Brennan MF. Primary gastrointestinal sarcomas: analysis of prognostic variables. *Ann Surg Oncol* 1995; **2**: 26-31.

Cooper PN, Quirke P, Hardy GJ y Dixon MF. A flow cytometric, clinical, and histological study of stromal neoplasms of the gastrointestinal tract. *Am J Surg Pathol* 1992; **16**: 163-170.

Corless CL. Editorial: Assessing the prognosis of gastrointestinal stromal tumors. A growing role for molecular testing. *Am J Clin Pathol* 2004; **122**: 11-13.

Corless CL, Fletcher JA y Heinrich MC. Biology of gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* 2004; **22**: 3813-3825.

Corless CL, McGreevey L, Haley A, Town A y Heinrich MC. KIT mutations are common in incidental gastrointestinal stromal tumors one centimeter or less in size. *Am J Pathol* 2002; **160**: 1567-1572.

Costa J. The grading and staging of soft tissue sarcomas. En: Fletcher CD y McKee PH, eds. *Pathobiology of Soft Tissue Tumors*. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1990: 221-238.

Cross SS. Grading and scoring in histopathology. *Histopathology* 1998; **33**: 99-106.

Cunningham RE, Abbondanzo SL, Chu W, Emory TS, Sobin LH y O'Leary TJ. Apoptosis, bcl-2 expression, and p53 expression in Gastrointestinal stromal/smooth muscle tumors. *Appl Immunohistochem* 2001; **9**: 19-23.

Cunningham RE, Federspiel BH, McCarthy WF, Sobin LH y O'Leary TJ. Predicting prognosis of gastrointestinal smooth muscle tumors. Role of clinical and histologic evaluation, flow cytometry, and image cytometry. *Am J Surg Pathol* 1993; **17**: 588-594.

Cypriano MS, Jenkins JJ, Pappo AS, Rao Bn y Daw NC. Pediatric gastrointestinal stromal tumors and leiomyosarcoma. *Cancer* 2004; **101**: 39-50.

Dagher R, Cohen M, Williams G, Rothmann M, Gobburu J, Robbie G, Rahman A, Chen G, Staten A, Griebel D y Pazdur R. Report from FDA. Approval summary: Imatinib mesylate in the treatment of metastatic and/or unresectable malignant gastrointestinal stromal tumors. *Clinical Cancer Res* 2002; **8**: 3034-3038.

Daimaru Y, Kido H, Hashimoto H y Enjoji M. Benign schwannoma of the gastrointestinal tract. A clinicopathologic and immunohistochemical study. *Hum Pathol* 1988; **19**: 257-264.

Debiec-Rytcher M, Dumez H, Judson I, Wasag B, Verweij J, Brown M, Dimitrijevic S, Sciot R, Stul M, Vranck H, Scurr M, Hagemeijer A, van Glabbeke M y van Oosterom. Use of c-KIT/PDGFR α mutational analysis to predict the clinical response to imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumors entered on phase I and II studies of the EORTC Soft Tissue and Bone

Sarcoma Group. Eur J Cancer 2004^a; **40**: 689-695.

Debiec-Rychter M, Wasag B, Stul M, De Wever I, Van Oosterom A, Hagemeyer A y Sciot R. Gastrointestinal stromal tumors (GISTs) negative for KIT (CD117 antigen) immunoreactivity. J Pathol 2004^b; **202**: 430-438.

DeMatteo RP, Heinrich MC, El-Rifai WM y Demetri G. Clinical management of gastrointestinal stromal tumors: Before and after STI-571. Hum Pathol 2002; **33**: 466-477.

DeMatteo RP, Lewis JJ, Leung D, Mudan SS, Woodruff JM y Brennan MF. Two hundred gastrointestinal stromal tumors: recurrence patterns and prognostic factors for survival. Ann Surg 2000; **231**: 51-58.

Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, Van den Abeele AV, Eisenberg B, Roberts PJ, Heinrich MC, Tuveson DA, Singer S, Janicek M, Fletcher JA, Silverman SG, Silberman SL, Capdeville R, Kiese B, Peng B, Dimitrijevic S, Druker BJ, Corless C, Fletcher CDM y Joensuu H. Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. N Engl J Med 2002; **347**: 472-480.

Donner LR. Gastrointestinal autonomic nerve tumor: a common type of gastrointestinal stromal neoplasm. Ultrastruct Pathol 1997; **21**: 419-424.

Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S y Sawyers CL. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. N Eng J Med 2001; **344**: 1031-1037.

Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmerman J y Lydon NB. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. Nat Med 1996; **2**: 561-566.

Duensing A, Joseph NE, Medeiros F, Smith F, Hornick JL, Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, Fletcher CD y Fletcher JA. Protein Kinase C theta (PKC θ) expression and constitutive activation in gastrointestinal stromal tumors (GISTs). Cancer Res 2004^a; **64**: 5127-5131.

Duensing A, Medeiros F, McConarty B, Joseph NE, Panigrahy, Singer S, Fletcher CD, Demetri GD y Fletcher JA. Mechanisms of oncogenic KIT signal transduction in primary gastrointestinal stromal tumors (GISTs). Oncogene 2004^b; **23**: 3999-4006.

Eisenberg BL y Judson I. Surgery and imatinib in the management of GIST: emerging approaches to adjuvant and neoadjuvant therapy. Ann Surg Oncol 2004; **11**: 465-475.

El-Naggar AK, Ro JY, McLemore D, Garnsey L, Ordóñez N y Mackay B. Gastrointestinal stromal tumors: DNA flow-cytometric study of 58 patients with at least five years of follow-up. Mod Pathol 1989; **2**: 511-515.

El-Rifai W, Sarlomo-Rikala M, Andersson LC, Knuutila S y Miettinen M. DNA sequence copy number changes in gastrointestinal stromal tumors: Tumor progression and prognostic significance. Cancer Res 2000; **60**: 3899-3903.

El-Rifai W, Sarlomo-Rikala M, Miettinen M, Knuutila S y Andersson LC.

DNA copy number losses in chromosome 14: an early change in Gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 1996; **56**: 3230-3233.

Elston CW y Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grades in breast cancer. Experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991; **19**: 403-410.

Emory TS, Derringer GA, Sobin LH y O'Leary TJ. Ki-67 (MIB-1) immunohistochemistry as a prognostic factor in gastrointestinal smooth-muscle tumors. *J Surg Pathol* 1997; **2**: 239-242.

Emory TS, Sobin LH, Lukes L, Lee DH y O'Leary TJ. Prognosis of gastrointestinal smooth-muscle (stromal) tumors: Dependence on anatomic site. *Am J Surg Pathol* 1999; **23**: 82-87.

Erlandson RA, Klimstra DS y Woodruff JM. Subclassification of gastrointestinal stromal tumors based on evaluation by electron microscopy and immunohistochemistry. *Ultrastruct Pathol* 1996; **20**: 373-394.

Evans HL. Smooth muscle tumors of the gastrointestinal tract. A study of 56 cases followed for a minimum of 10 years. *Cancer* 1985; **56**: 2242-2250.

Eyden B, Chorneyko KA, Shanks JH, Menasce LP y Banerjee SS. Contribution of electron microscopy to understanding cellular differentiation in mesenchymal tumors of the gastrointestinal tract: a study of 82 tumors. *Ultrastruct Pathol* 2002; **26**: 269-285.

Fletcher CDM. News in brief. KIT (CD117) immunostaining and treatment with STI-571. *Adv Anat Pathol* 2001; **8**: 304.

Fletcher CDM, Berman JJ, Corless C, Gorstein F, Lasota J, Longley BJ, Miettinen M, O'Leary TJ, Remotti H, Rubin BP, Shmookler B, Sobin LH y Weiss SW. Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: A consensus approach. *Hum Pathol* 2002^a; **33**: 459-465.

Fletcher CDM y Fletcher JA. Editorial: Testing for KIT (CD117) in gastrointestinal stromal tumors: another Herceptest ?. *Appl Immunohistochem* 2002; **10**: 197-198.

Fletcher CDM, Sindaram M, Rydholm A, Coindre JM y Singer S. Soft Tissue Tumors: epidemiology, clinical features, histopathological typing and grading. En: *Pathology and Genetics. Tumors of Soft Tissue and Bone*, eds: Fletcher CDM, Unni KK y Mertens F, IARC Press, Lyon (Francia), 2002^b: 12-18.

Foucar K. Editorial: Application of tissue microarrays to hematolymphoid specimens: the minimalist perspective. *Hum Pathol* 2002; **33**: 951-952.

Franquemont DW. Differentiation and risk assessment of gastrointestinal stromal tumors. *Am J Clin Pathol* 1995, **103**: 41-47.

Franquemont DW y Frierson HF Jr. Proliferating cell nuclear antigen immunoreactivity and prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Mod Pathol* 1995; **8**: 473-477.

Fuller CE y Williams GT. Gastrointestinal manifestations of type I neurofibromatosis (von Recklinghausen's disease). *Histopathology* 1991; **19**: 1-11.

García JF, Camacho FI, Morente M, Fraga M, Montalbán C, Álvaro T, Bellas C, Castaño A, Díez A, Flores T, Martín C, Martínez MA, Mazorra F, Menárguez J, Mestre MJ, Mollejo M, Sáez AI, Sánchez L y Piris MA; Spanish Hodgkin Lymphoma Study Group. Hodgkin and Reed-Sternberg cells harbor alterations in the major tumor suppressor pathways and cell-cycle checkpoints: analyses using tissue microarrays. *Blood* 2003; **101**: 681-689.

Gelen T, Elpek GO, Aksoy NH, Ogus M y Keles N. p27 labeling index and proliferation in gastrointestinal stromal tumors: correlations with clinicopathologic factors and recurrence. *Jpn J Clin Oncol* 2003; **33**: 346-352.

Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E y Flad HD. Immunohistochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 1991; **138**: 867-873.

Gibson PC y Cooper K. CD117 (KIT): A diverse protein with selective applications in surgical pathology. *Adv Anat Pathol* 2002; **9**: 65-69.

Goldblum JR y Appelman HD. Stromal tumors of the duodenum: a histologic and immunohistochemical study of 20 cases. *Am J Surg Pathol* 1995; **19**: 71-80.

Greenson JK. Gastrointestinal stromal tumors and other mesenchymal lesions of the gut. *Mod Pathol* 2003; **16**: 366-375.

Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, Muller-Hermelink HK, Campo E, Braziel RM, Jaffe ES, Pan Z, Farinha P, Smith LM, Falini B, Banham AH, Rosenwald A, Staudt LM, Connors JM, Armitage JO y Chan WC. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004; **103**: 275-282.

Hasegawa T, Matsuno Y, Shimoda T y Hirohashi S. Gastrointestinal stromal tumor: Consistent CD117 immunostaining for diagnosis, and prognostic classification based on tumor size and MIB-1 grade. *Hum Pathol* 2002; **6**: 669-676.

Hedvat CV, Hegde A, Chaganti RSK, Chen B, Qin J, Flippa DA, Nimer SD y Teruya-Feldstein J. Application of tissue microarray technology to the study of non-Hodgkin's and Hodgkin's lymphoma. *Hum Pathol* 2002; **33**: 968-974.

Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, Blanke CD, von Mehren M, Joensuu H, McGreevey LS, Chen CJ, Van den Abbeele A, Druker BJ, Kiese B, Eisenberg B, Roberts PJ, Singer S, Fletcher CDM, Silberman S, Dimitrijevic S y Fletcher JA. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* 2003^a; **21**: 4342-4349.

Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, McGreevey L, Chen CJ, Joseph N, Singer S, Griffith DJ, Haley A, Town A, Demetri GD, Fletcher CDM y Fletcher JA. PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* 2003^b; **299**: 708-710.

Heinrich MC, Rubin BP, Longley BJ y Fletcher JA. Biology and genetic aspects of gastrointestinal stromal tumors: KIT activation and cytogenetic alterations. *Hum Pathol* 2002; **33**: 484-495.

Herrera GA, Cerezo L, Jones JE, Sack J, Grizzle WE, Pollack WJ y Lott

RL. Gastrointestinal autonomic nerve tumors. "Plexosarcomas". Arch Pathol Lab Med 1989; **113**: 846-853.

Herrera GA, Pinto de Moraes H, Grizzle WE y Han SG. Malignant small bowel neoplasm of enteric plexus derivation (plexosarcoma). Light and electron microscopic study confirming the origin of the neoplasm. Dig Dis Sci 1984; **29**: 275-284.

Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S, Kawano K, Hanada M, Kurata A, Takeda M, Tunio GM, Matsuzawa Y, Kanakura Y, Shinomura Y y Kitamura Y. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. Science 1998; **279**: 577-580.

Hirota S, Ohashi A, Nishida T, Isozaki K, Kinoshita K, Shinomura Y y Kitamura Y. Gain-of-function mutations of platelet-derived growth factor receptor α gene in gastrointestinal stromal tumors. Gastroenterology 2003; **125**: 660-667.

Hirota S, Okazaki T, Kitamura Y, O'Brien P, Kapusta L y Dardick I. Cause of familial and multiple gastrointestinal autonomic nerve tumors with hyperplasia of interstitial cells of Cajal is germline mutation of the c-kit gene. Letters to the editor. Am J Surg Pathol 2000; **24**: 326-327.

Hornick JL y Fletcher CDM. Immunohistochemical staining for KIT (CD117) in soft tissue sarcomas is very limited in distribution. Am J Clin Pathol 2002; **117**: 188-193.

Hornick JL y Fletcher CDM. Validating immunohistochemical staining for KIT (CD 117). Am J Clin Pathol 2003; **119**: 325-327.

Hou Y, Tan Y, Sun M, Wei Y, Xu J, Lu S, Su S, Zhou Y, Gao F, Zheng A, Zhang T, Hou W, Wang J, Du X y Zhu X. C-kit mutation in human gastrointestinal stromal tumors. World J Gastroenterol 2004; **10**: 1310-1314.

House MG, Guo M, Efron DT, Lillemoe KD, Cameron JL, Syphard JE, Hooker CM, Abraham SC, Montgomery EA, Herman JG y Brock MV. Tumor suppressor gene hypermethylation as a predictor of gastric stromal tumor behavior. J Gastrointest Surg 2003; **7**: 1004-1014.

Hu X, Forster J y Damjanov I. Primary malignant gastrointestinal stromal tumor of the liver. Arch Pathol Lab Med 2003; **127**: 1606-1608.

Huizinga JD, Thuneberg L, Klüppel M, Malysz J, Mikkelsen HB y Bernstein A. W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. Nature 1995; **373**: 347-349.

Hurlimann J y Gardiol D. Gastrointestinal stromal tumors. An immunohistochemical study of 165 cases. Histopathology 1991; **19**: 311-320.

Igney FH y Krammer PH. Death and anti-death: tumor resistance to apoptosis. Nat Rev Cancer 2002; **2**: 277-288.

Joensuu H y Kindblom LG. Gastrointestinal stromal tumors – a review. Acta Orthop Scand Suppl. 2004; **75**: 62-71.

Joensuu H, Roberts PJ, Sarlomo-Rikala M, Andersson LC, Tervahartiala P, Tuveson D, Silberman SL, Capdeville R, Dimitrijevic S, Druker B y

Demetri GD. Effect of the tirosin kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor. *N Engl J Med* 2001; **344**: 1052-1056.

Kim SH, Lewis JJ, Brennan MF, Woodruff JM, Dudas M y Cordon-Cardo C. Overexpression of cyclin D1 is associated with poor prognosis in extremity soft-tissue sarcomas. *Clin Cancer Res* 1998; **4**: 2377-2382.

Kim TW, Lee H, Kang YK, Choe MS, Ryu MH, Chang HM, Kim JS, Yook JH, Kim BS y Lee JS. Prognostic significance of c-kit mutation in localized gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 2004; **10**: 3076-81.

Kim HC, Lee JM, Kim KW, Park SH, Kim SH, Lee JY, Han HK y Choi BI. Gastrointestinal stromal tumors of the stomach: CT findings and prediction of malignancy. *AJR Am J Roentgenol* 2004; **183**: 893-898.

Kindblom LG. Comunicación personal. 2004.

Kindblom LG, Meis-Kindblom J, Bumming P, Dimitrijevic S, Miret M, Dortok A et al. Incidence, prevalence, phenotype and biologic spectrum of gastrointestinal stromal cell tumors (GIST). A population-based study of 600 cases. *Ann Oncol* 2002; **13** (Suppl 5): 157.

Kindblom LG, Remotti HE, Aldenborg F y Meis-Kindblom JM. Gastrointestinal pacemaker cell tumor (GIPACT): Gastrointestinal stromal tumors show phenotypic characteristics of the interstitial cells of Cajal. *Am J Pathol* 1998; **152**: 1259-1269.

Kinoshita K, Hirota S, Isozaki K, Ohashi A, Nishida T, Kitamura Y, Shinomura Y y Matsuzawa Y. Absence of c-kit gene mutations in gastrointestinal stromal tumours from neurofibromatosis type 1 patients. *J Pathol* 2004; **202**: 80-85.

Kiyabu MT, Bishop PC, Parker JW, Turner RR y Fitzgibbons PL. Smooth muscle tumors of the gastrontestinal tract. Flow cytometric quantitation of DNA and nuclear antigen content and correlation with histologic grade. *Am J Surg Pathol* 1988; **12**: 954-960.

Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schrami P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G y Kallioniemi OP. Tissue microarrays for high-througput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998; **4**: 844-847.

Kontogianni K, Demonakou M, Kavantzias N, Lazaris A Ch, Leriou K, Vourlakou C y Davaris P. Prognostic predictors of gastrointestinal stromal tumors: a multi-institutional analysis of 102 patients with definition of a prognostic index. *Eur J Surg Oncol* 2003; **29**: 548-556. 72 casos con seguimiento. Criterios clásicos e IHQ para PCNA, Ki67, bcl-2 y bax.

Koon N, Schneider-Stock R, Sarlomo-Rikala M, Smolkin M, Petroni G, Zaika A, Boltze C, Meyer F, Andersson L, Knuutila S, Miettinen M y El-Rifai W. Molecular targets for tumor progression in gastrointestinal stromal tumours. *Gut* 2004; **53**: 235-240.

Kuhn T. La Estructura de las Revoluciones Científicas. 1ª edición. Fondo de Cultura Económica, México, 2000. Traducción española de *The Structure of Scientific Revolutions*, University of Chcago Press, Chicago, 1962.

Lasota J, Jasinski M, Sarlomo-Rikala M y Miettinen M. Mutations in exon

11 of c-kit occur preferentially in malignant *versus* benign gastrointestinal stromal tumors and do not occur in leiomyomas and leiomyosarcomas. *Am J Pathol* 1999; **154**: 53-60.

Lauwers GY, Erlandson RA, Casper ES, Brennan MF y Woodruff JM. Gastrointestinal autonomic nerve tumors. A clinicopathologic, immunohistochemical and ultrastructural study of 12 cases. *Am J Surg Pathol* 1993; **17**: 887-897.

Lee CM, Chen HC, Leung TK y Chen YY. Gastrointestinal stromal tumor: computed tomographic features. *World J Gastroenterol* 2004; **10**: 2417-2418.

Lee JR, Joshi V, Griffin Jr. JW, Lasota J y Miettinen M. Gastrointestinal autonomic nerve tumor. Immunohistochemical and molecular identity with gastrointestinal stromal tumor. *Am J Surg Pathol* 2001; **25**: 979-987.

Lerma E, Lee SJ, Tugues D, Oliva E, Gich I y Prat J. Ploidy of 36 stromal tumors of the gastrointestinal tract. A comparative study with flow cytometry and image analysis. *Anal Quant Cytol Histol* 1994; **16**: 435-440.

Lloyd RV, Erickson LA, Jin L, Kulig E, Qian X, Cheville JC y Scheithauer BW. p27^{kip1}: a multifunctional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancers. *Am J Pathol* 1999; **154**: 313-323.

Lucas DR, Al-Abbadi M, Tabaczka P, Hamre MR, Weaver DW y Mott MJ. c-kit expression in desmoid fibromatosis. Comparative immunohistochemical evaluation of two commercial antibodies. *Am J Clin Pathol* 2003; **119**: 339-345.

Ma CK, Amin MB, Kintanar E, Linden MD y Zarbo RJ. Immunohistologic characterization of gastrointestinal stromal tumors: a study of 82 cases compared with 11 cases of leiomyomas. *Mod Pathol* 1993; **6**: 139-144.

Maeda H, Yamagata A, Nishikawa S, Yoshinaga K, Kobayashi S, Nishi K y Nishikawa S. Requirement of c-kit for development of intestinal pacemaker system. *Development* 1992; **116**: 369-375.

Maeyama H, Hidaka E, Ota H, Minami S, Kajiyama M, Kuraishi A, Mori H, Matsuda Y, Wada S, Sodeyama H, Nakata S, Kawamura N, Hata S, Watanabe M, Iijima Y y Katsuyama T. Familial gastrointestinal stromal tumor with hyperpigmentation: association with a germline mutation of the c-kit gene. *Gastroenterology* 2001; **120**: 210-215.

Mazur MT y Clark HB. Gastric stromal tumors: Reappraisal of histogenesis. *Am J Surg Pathol* 1983; **7**: 507-519.

Medeiros F, Corless CL, Duensing A, Hornick JL, Oliveira AM, Heinrich MC, Fletcher JA y Fletcher CDM. Kit-negative gastrointestinal stromal tumors: proof of concept and therapeutic implications. *Am J Surg Pathol* 2004; **28**: 889-894.

Mengel M, Kreipe H y von Wasiliewski R. Rapid and large-scale transition of new tumor biomarkers to clinical biopsy material by innovative tissue microarray systems. *Appl Immunohistochem Mol Mophol* 2003; **11**: 261-268.

Miettinen M, Blay JY y Sobin LH. Mesenchymal tumours of the stomach. En: *Tumours of the Digestive System*, eds: Hamilton SR y Aaltonen LA. IARC press, Lyon, 2000^a: 62-65.

Miettinen M, El-Rifai W, Sobin LH y Lasota J. Evaluation of malignancy and prognosis of gastrointestinal stromal tumors: A review. *Hum Pathol* 2002^a; **33**: 478-483.

Miettinen M, Furlong M, Sarlomo-Rikala M, Burke A, Sobin LH y Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors, intramural leiomyomas, and leiomyosarcomas in the rectum and anus. A clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 144 cases. *Am J Surg Pathol* 2001^a; **25**: 1121-1133.

Miettinen M, Kopczynski J, Makhlof HR, Sarlomo-Rikala M, Gyorffy H, Burke A, Sobin LH y Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors, intramural leiomyomas, and leiomyosarcomas in the duodenum. A clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 167 cases. *Am J Surg Pathol* 2003; **27**: 625-641.

Miettinen M y Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: definition, clinical, histological, immunohistochemical and molecular genetic features and differential diagnosis. *Virchows Arch* 2001; **438**: 1-12.

Miettinen M, Monihan JM, Sarlomo-Rikala M, Kovatich AJ, Carr NJ, Emory TS y Sobin LH. Gastrointestinal stromal tumors/smooth muscle tumors (GISTs) primary in the omentum and mesentery: clinicopathologic and immunohistochemical study of 26 cases. *Am J Surg Pathol* 1999^a; **23**: 1109-1118.

Miettinen M, Paal E, Lasota J y Sobin LH. Gastrointestinal glomus tumors. A clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 32 cases. *Am J Surg Pathol* 2002^b; **26**: 301-311.

Miettinen M, Sarlomo-Rikala M, Kovatich AJ y Lasota J. Calponin and h-caldesmon in soft tissue tumors: consistent h-caldesmon immunoreactivity in gastrointestinal stromal tumors indicates traits of smooth muscle differentiation. *Mod Pathol* 1999^b; **12**: 756-762.

Miettinen M, Sarlomo-Rikala M y Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: recent advances in understanding of their biology. *Hum Pathol* 1999^c; **30**: 1213-1220.

Miettinen M, Sarlomo-Rikala M y Sobin LH. Mesenchymal tumors of muscularis mucosae of colon and rectum are benign leiomyomas that should be separated from gastrointestinal stromal tumors: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 88 cases. *Mod Pathol* 2001^b; **14**: 950-956.

Miettinen M, Sarlomo-Rikala M, Sobin LH y Lasota J. Esophageal stromal tumors. A clinicopathologic, immunohistochemical and molecular genetic study of 17 cases and comparison with esophageal leiomyomas and leiomyosarcomas. *Am J Surg Pathol* 2000^b; **24**: 211-222.

Miettinen M, Sarlomo-Rikala M, Sobin LH y Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors and leiomyosarcomas in the colon. A clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 44 cases. *Am J Surg Pathol* 2000^c; **24**: 1339-1352.

Miettinen M, Shekitka KM y Sobin LH. Schwannomas in the colon and rectum: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 20 cases. *Am J Surg Pathol* 2001^c; **25**: 846-855.

Miettinen M y Sobin LH. Gastrointestinal stromal tumors in the appendix. A clinicopathologic and immunohistochemical study of four cases. *Am J Surg Pathol* 2001; **25**: 1433-1437.

Miettinen M, Sobin LH y Sarlomo-Rikala M. Immunohistochemical spectrum of GISTs at different sites and their differential diagnosis with a reference to CD 117 (KIT). *Mod Pathol* 2000^d; **13**: 1134-1142.

Miettinen M, Virolainen M y Sarlomo-Rikala M. Gastrointestinal stromal tumors. Value of CD34 antigen in their identification and separation from true leiomyomas and schwannomas. *Am J Surg Pathol* 1995; **19**: 207-216.

Mikhael AI, Bacchi CE, Zarbo RJ, Ma CK y Gown AM. CD34 expression in stromal tumors of the gastrointestinal tract. *Appl Immunohistochem* 1994; **2**: 89-93.

Min KW. Small intestinal stromal tumors with skeinoid fibers. Clinicopathological, immunohistochemical, and ultrastructural investigations. *Am J Surg Pathol* 1992; **16**: 145-155.

Montgomery E, Torbenson MS, Kaushal M, Fisher C y Abraham SC. Beta-catenin immunohistochemistry separates mesenteric fibromatosis from gastrointestinal stromal tumor and sclerosing mesenteritis. *Am J Surg Pathol* 2002; **26**: 1296-1301.

Nishida T, Hirota S, Taniguchi M, Hashimoto K, Isozaki K, Nakamura H, Kanakura Y, Tanaka T, Takabayashi A, Matsuda H y Kitamura Y. Familial gastrointestinal stromal tumors with germline mutation of the KIT gene. *Letter. Nat Genet* 1998; **19**: 323-324.

Noguchi T, Sato T, Takeno S, Uchida Y, Kashima K, Yokoyama S y Muller W. Biological analysis of gastrointestinal stromal tumors. *Oncol Rep* 2002; **9**: 1277-1282.

O'Brien P, Kapusta L, Dardick I, Axler J y Gnidec A. Multiple familial gastrointestinal stromal tumors and small intestinal neuronal dysplasia. *Am J Surg Pathol* 1999; **23**: 198-204.

O'Leary T y Berman JJ. Gastrointestinal Stromal Tumors: answers and questions. *Hum Pathol* 2002; **33**:456-458.

Ortega S, Malumbres M y Barbacid M. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochem Biophys Acta* 2002; **1602**: 73-87.

Palazzo L, Landi B, Cellier C, Cuillerier E, Roseau G y Barbier JP. Endosonographic features predictive of benign and malignant gastrointestinal stromal cell tumors. *Gut* 2000; **46**: 88-92.

Panizo-Santos A, Sola I, Vega F, de Alava E, Lozano MD, Idoate MA y Pardo-Mindán J. Predicting metastatic risk of gastrointestinal stromal tumors: role of cell proliferation and cell cycle regulatory proteins. *Int J Surg Pathol* 2000; **8**: 133-144.

Peerlink ID, Irvin TT, Sarsfield PT y Harington JM. GIST (gastro-intestinal stromal tumor) of the gallbladder: a case report. *Acta Chir Belg* 2004; **104**: 107-109.

Pidhorecky I, Cheney RT, Kraybill WG y Gibbs JF. Gastrointestinal stromal

tumors: current diagnosis, biologic behavior, and management. *Ann Surg Oncol* 2000; **7**: 705-712.

Pindzola JA, Palazzo JP, Kovatich AJ, Tuma B y Nobel M. Expression of p21^{WAF1/CIP1} in soft tissue sarcomas: a comparative immunohistochemical study with p53 and Ki-67. *Pathol Res Pract* 1998; **194**: 685-691.

Prevot S, Bienvenu L, Vaillant JC y de Saint-Maur PP. Benign schwannoma of the digestive tract: a clinicopathologic and immunohistochemical study of five cases, including a case of esophageal tumor. *Am J Surg Pathol* 1999; **23**: 431-436.

Pruneri G, Mazzarol G, Fabris S, Del Curto B, Bertolini F, Neri A y Viale G. Cyclin D3 immunoreactivity in gastrointestinal stromal tumors is independent of cyclin D3 amplification and is associated with nuclear p27 accumulation. *Mod Pathol* 2003; **16**: 886-892.

Ray R, Tahan SR, Andrews C y Goldman H. Stromal tumors of the stomach: prognostic value of the PCNA index. *Mod Pathol* 1994; **7**: 26-30.

Reith JD, Goldblum JR, Lytes RH y Weiss SW. Extragastrointestinal stromal (soft tissue) tumors: an analysis of 48 cases with emphasis on histologic predictors of outcome. *Mod Pathol* 2000; **13**: 577-585.

Ricci R, Arena V, Castri F, Martini M, Maggiano N, Murazio M, Pacelli F, Potenza AE, Vecchio FM y Larocca LM. Role of p16/INK4a in gastrointestinal stromal tumor progression. *Am J Clin Pathol* 2004; **122**: 35-43.

Robinson TL, Sircar K, Hewlett BR, Chorneyko K, Riddel RH y Huizinga JD. Gastrointestinal stromal tumors may originate from a subset of CD34-positive interstitial cells of Cajal. *Am J Pathol* 2000; **156**: 1157-1163.

Rodríguez JA, Guarda LA y Rosai J. Mesenteric fibromatosis with involvement of the gastrointestinal tract. A GIST simulator: a study of 25 cases. *Am J Clin Pathol* 2004; **121**: 93-98.

Rosai J. Gastrointestinal tract. En: *Ackerman's Surgical Pathology*, ed.: Rosai J, 8th edition. Mosby, St. Louis, 1996: 589-814.

Rosai J. Gastrointestinal tract. En: *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology*, ed: Rosai J, 9th edition. Mosby, St. Louis, 2004: 674-680.

Rubin BP, Singer S, Tsao C, Duensing A, Lux ML, Ruiz R, Hibbard MK, Chen C, Xiao S, Tuvesos DA, Demetri GD, Fletcher CDM y Fletcher JA. KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 2001; **61**: 8118-8121.

Rudolph P, Chiaravalli AM, Pauser U, Oschlies I, Hillemanns M, Gobbo M, Marichal M, Eusebi V, Hofler H, Capella C y Kloppel G. Gastrointestinal mesenchymal tumors: immunophenotypic classification and survival analysis. *Virchows Arch* 2002; **441**: 238-248.

Rudolph P, Gloeckner K, Parwaresch R, Harms D y Schmidt D. Immunophenotype, proliferation, DNA ploidy, and biological behavior of gastrointestinal stromal tumors: a multivariate clinicopathologic study. *Hum Pathol* 1998; **29**: 791-800.

Sakurai S, Fukayama M, Kaizaki Y, Saito K, Kanazawa K, Kitamura M, Iwasaki Y, Hishima T, Hayashi Y y Koike M. Telomerase activity in gastrointestinal stromal tumors. *Cancer* 1998; **83**: 2060-2066.

Sakurai S, Hishima T, Takazawa Y, Sano T, Nakajima T, Saito K, Morinaga S y Fukayama M. Gastrointestinal stromal tumors and KIT-positive mesenchymal cells in the omentum. *Pathol Int* 2001; **51**: 524-431.

Sánchez-Beato M, Sánchez-Aguilera A y Piris MA. Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas. *Blood* 2003; **101**: 1220-1235.

Sanders KM. A case for interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 1996; **111**: 492-515.

Sarlomo-Rikala M, Kovatich AJ, Barusevicius A y Miettinen M. CD117: a sensitive marker for gastrointestinal stromal tumors that is more specific than CD34. *Mod Pathol* 1998; **11**: 728-734.

Sarlomo-Rikala M y Miettinen M. Gastric schwannoma. A clinicopathological analysis of six cases. *Histopathology* 1995; **27**: 355-360.

Sarlomo-Rikala M, Tsujimura T, Lendahl U y Miettinen M. Patterns of nestin and other intermediate filament expression distinguish between gastrointestinal stromal tumors, leiomyomas and schwannomas. *APMIS* 2002; **110**: 499-507.

Sbaschnig RJ, Cunningham RE, Sobin LH y O'Leary TJ. Proliferating-cell nuclear antigen immunocytochemistry in the evaluation of gastrointestinal smooth-muscle tumors. *Mod Pathol* 1994; **7**: 780-783.

Schaldenbrand JD y Appelman HD. Solitary solid stromal gastrointestinal tumors in von Recklinghausen's disease with minimal smooth muscle differentiation. *Hum Pathol* 1984; **15**: 229-232.

Schmid S y Wegmann W. Gastrointestinal pacemaker cell tumor: clinicopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study with special reference to c-kit receptor antibody. *Virchows Arch* 2000; **436**: 234-242.

Schneider-Stock R, Boltze C, Lasota J, Miettinen M, Peters B, Pross M, Roessner A y Günther T. High prognostic value of p16^{INK4} alterations in gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* 2003; **21**: 1688-1697.

Schwartz R. Perspective. A molecular star in the wars against cancer. *N Engl J Med* 2002; **347**: 462-463.

Segal A, Carello S, Caterina P, Papadimitriou JM y Spagnolo DV. Gastrointestinal autonomic nerve tumors: a clinicopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of 10 cases. *Pathology* 1994; **26**: 439-447.

Seidal T y Ervardsson H. Expression of c-kit (CD117) and Ki67 provides information about the possible cell origin and clinical course of gastrointestinal stromal tumors. *Histopathology* 1999; **34**: 416-424.

Sheehan KM, Sabah M, Cummins RJ, O'Grady A, Murray FE, Leader MB y Kay EW. Cyclooxygenase-2 expression in stromal tumors of gastrointestinal tract.

Hum Pathol 2003; **34**: 1242-1246.

Sherr CJ. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. Cancer Res 2000; **60**: 3689-3685.

Shidham VB, Chivukula M, Gubta D, Rao RN y Komorowski R. Immunohistochemical comparison of gastrointestinal stromal tumor and solitary fibrous tumor. Arch Pathol Lab Med 2002; **126**: 1189-1192.

Siddiq MA, East D, Hock YL y Warfield AT. Gastrointestinal stromal tumor of the pharynx. J Laryngol Otol 2004; **118**: 315-316.

Singer S, Rubin BP, Lux ML, Chen C, Demetri GD, Fletcher CDM y Fletcher JA. Prognostic value of KIT mutation type, mitotic activity, and histologic subtype in gastrointestinal stromal tumors. J Clin Oncol 2002; **20**: 3898-3905.

Sircar K, Hewlett BR, Huizinga JD, Chorneyko K, Berezin I y Ridell RH. Interstitial cells of Cajal as precursors of gastrointestinal stromal tumors. Am J Surg Pathol 1999; **23**: 377-389.

Stout AP. Bizarre smooth muscle tumors of the stomach. Cancer 1962; **15**: 400-409.

Suster S, Fisher C y Moran CA. Expression of bcl-2 oncoprotein in benign and malignant spindle cell tumors of soft tissue, skin, serosal surfaces, and gastrointestinal tract. Am J Surg Pathol 1998; **22**: 863-872.

Suster S y Fletcher CD. Gastrointestinal stromal tumors with prominent signet-ring cell features. Mod Pathol 1996; **9**: 609-613.

Taniguchi M, Nishida T, Hirota S, Isozaki K, Ito T, Nomura T, Matsuda H y Kitamura Y. Effect of c-kit mutation on prognosis of gastrointestinal stromal tumors. Cancer Res 1999; **59**: 4297-4300. ADN de parafina de 124 casos: secuenciación tras PCR de exones 11 (dominio yuxtamembrana) y 17 (dominio kinasa). Mutaciones missense exón 11: 71/124 (57%), no mutaciones en exón 17.

Tejpar S, Nollet F, Li C, Wunder JS, Michils G, di Cin P, Van Cutsem E, Bapat B, van Roy F, Cassiman JJ y Alman BA. Predominance of beta-catenin mutations and beta-catenin dysregulation in sporadic aggressive fibromatosis (desmoid tumor). Oncogene 1999; **18**: 6615-6620.

Thunnissen FB, Ambergen AW, Koss M, Travis WD, O'Leary TJ y Ellis IO. Mitotic counting in surgical pathology: sampling bias, heterogeneity and statistical uncertainty. Histopathology 2001; **39**: 1-8.

Torhorst J, Bucher C, Kononen J, Haas P, Zuber M, Kochli O, Mross F, Dieterich H, Moch H, Mihatsch M, Kallioniemi O y Sauter G. Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical end-points. Am J Pathol 2001; **159**: 2249-2256.

Trojani M, Contesso G, Coindre JM, Rouesse J, Bui NB, de Mascarel A, Goussot JF, David M, Bonichon F y Lagarde C. Soft-tissue sarcomas of adults: study of pathological prognostic variables and definition of a histopathological grading system. Int J Cancer 1984; **33**: 37-42.

Trupiano JK, Stewart RE, Misick C, Appelman HD y Goldblum JR. Gastric

stromal tumors. A clinicopathologic study of 77 cases with correlation of features with nonaggressive and aggressive clinical behaviors. *Am J Surg Pathol* 2002; **26**: 705-714.

Tsujimura T, Makiishi-Shimobayashi C, Lundkvist J, Lendahl U, Nakasho K, Sugihara A, Iwasaki T, Mano M, Yamada N, Yamashita K, Toyosaka A y Terada N. Expression of the intermediate filament nestin in gastrointestinal stromal tumors and interstitial cells of Cajal. *Am J Pathol* 2001; **158**: 817-823.

Tsushima K, Rainwater LM, Goellner JR, van Heerden JA y Lieber MM. Leiomyosarcomas and benign smooth muscle tumors of the stomach: nuclear DNA patterns studied by flow cytometry. *Mayo Clin Proc* 1987; **62**: 275-280.

Ueyama T, Guo KJ, Hashimoto H, Daimaru Y y Enjoji M. A clinicopathologic and immunohistochemical study of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer* 1992; **69**: 947-955.

Vander Noot MR 3rd, Eloubeidi MA, Chen VK, Eltoum I, Jhala D, Jhala N, Syed S y Chhieng DC. Diagnosis of gastrointestinal tract lesions by endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration biopsy. *Cancer* 2004; **25**: 157-163.

Vanderwinden JM, Rumessen JJ, De Laet MH, Vanderhaeghen JJ y Schiffmann SN. CD34+ cells in human intestine are fibroblasts adjacent to but distinct from interstitial cells of Cajal. *Lab Invest* 1999; **79**: 59-65.

Van Oosterom AT, Judson I, Verweij J, Stroobants S, di Paola ED, Dimitrijevic S, Martens M, Webb A, Scot R, Van Glabbeke M, Silberman S y Nielsen OE. Safety and efficacy of imatinib (STI571) in metastatic gastrointestinal stromal tumours: a phase I study. *Lancet* 2001; **358**: 1421-1423.

Wang L, Vargas H y French SW. Cellular origin of gastrointestinal stromal tumors: a study of 27 cases. *Arch Pathol Lab Med* 2000; **124**: 1471-1475.

Wang X, Mori I, Tang W, Utsunomiya H, Nakamura M, Nakamura Y, Zhou G y Kennichi K. Helpful parameters for malignant potential of gastrointestinal stromal tumors (GIST). *Jpn J Clin Oncol* 2002; **32**: 347-351.

Wardelmann E, Neidt I, Bierhoff E, Speidel N, Manegold C, Fisher H-P, Pfeifer U y Pietsch T. c-kit mutations in gastrointestinal stromal tumors occur preferentially in the spindle rather than in the epithelioid cell variant. *Mod Pathol* 2002; **15**: 125-136.

Weiss S y Goldblum JR, eds. *Enzinger and Weiss's Soft Tissue Tumors*. 4th edition. St. Louis, MO: Mosby; 2001: 309-346.

West RB, Corless CL, Chen X, Rubin BP, Subramanian A, Montgomery K, Zhu S, Ball CA, Nielsen TO, Patel R, Goldblum JR, Brown PO, Heinrich MC y Van De Rijn M. The novel marker, DOG1, is expressed ubiquitously in gastrointestinal stromal tumors irrespective of KIT or PDGFRA mutation status. *Am J Pathol* 2004; **165**: 107-113.

Williams DE, Eisenman J, Baird A, Rauch C, Van Ness K, March CJ, Park LS, Martin U, Mochizuki DY y Boswell HS. Identification of a ligand for the c-kit proto-oncogene. *Cell* 1990; **63**: 167-174.

Wong NA, Young R, Malcomson RDG, Nayer AG, Jamieson LA, Save VE,

Carey FA, Brewster DH, Han C y Al-Nafussi A. Prognostic indicators for gastrointestinal stromal tumors: a clinicopathological and immunohistochemical study of 108 resected cases of the stomach. *Histopathology* 2003; **43**: 118-126.

Yamaguchi U, Hasegawa T, Masuda T, Sekine S, Kawai A, Chuman H y Shimoda T. Differential diagnosis of gastrointestinal stromal tumor and other spindle cell tumors in the gastrointestinal tract based on immunohistochemical analysis. *Virchows Arch* 2004; **445**: 142-150.

Yamamoto H, Oda Y, Kawaguchi K, Nakamura N, Takahira Y, Tamiya S, Saito T, Oshiro Y, Ohta M, Yao T y Tsuneyoshi M. C-kit and PDGFRA mutations in extragastrointestinal stromal tumor (gastrointestinal stromal tumor of the soft tissue). *Am J Surg Pathol* 2004; **28**: 479-488.

Yamaura K, Kato K, Miyazawa M, Haba Y, Muramatsu A, Miyata K y Koide N. Stromal tumor of the pancreas with expression of c-kit protein: report of a case. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; **19**: 467-470.

Yan H, Marchettini P, Acherman YI, Gething SA, Brun E y Sugarbaker PH. Prognostic assessment of gastrointestinal stromal tumor. *Am J Clin Oncol* 2003; **26**: 221-228.

Yantiss RK, Nielsen GP, Lauwers GY y Rosenberg AE. Reactive nodular fibrous pseudotumor of the gastrointestinal tract and mesentery. *Am J Surg Pathol* 2003; **27**: 532-540.

Yantiss RK, Rosenberg AE, Selig MK y Nielsen GP. Gastrointestinal stromal tumors: an ultrastructural study. *Int J Surg Pathol* 2002; **10**: 101-113.

Yantiss RK, Spiro IJ, Compton CC y Rosenberg AE. Gastrointestinal stromal tumor versus intra-abdominal fibromatosis of the bowel wall: a clinically important differential diagnosis. *Am J Surg Pathol* 2000; **24**: 947-957.

Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T, Coussens L, Munemitsu S, Dull TJ, Chen E, Schlessinger J, Francke U y Ullrich A. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J* 1987; **6**: 3341-3351.

Zhang D, Salto-Télliez M, Do E, Putti TC y Koay ES. Evaluation of HER-2/neu oncogene status in breast tumors on tissue microarrays. *Hum Pathol* 2003; **34**: 362-368.