

IDENTIFICACIÓN DE UNA DELECIÓN CAUSANTE DE TUMOR DEL ESTROMA GASTROINTESTINAL (GIST) POR EL ANÁLISIS DE LOS GENES KIT Y PDGFRA.

José Buleje-Sono^{1,a}, Oscar Acosta^{1,4,b}, María Luisa Guevara-Fujita^{1,c}, Luis Taxa^{2,d}, Ricardo Fujita^{1,e}.

RESUMEN

Objetivo: Optimizar la detección de mutaciones en los genes *KIT* y *PDGFRA* en una muestra de tumor del estroma gastrointestinal (GIST).

Material y Métodos: Se analizó una muestra de tumor GIST fijada y embebida en parafina. Mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se amplificaron los exones 9, 11, 13 y 17 del gen *KIT* y los exones 12 y 18 del gen *PDGFR* que contienen las mutaciones causales de GIST. Se confirmó la amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Los fragmentos amplificados fueron purificados y secuenciados en un analizador genético. Se detectó una sobreposición de bases propio de una delección por lo que se tuvo que clonar los productos del exón 11 para identificar el alelo mutado.

Resultados: Se determinó la presencia de una mutación patogénica en el exón 11 del gen *KIT*. Dicha mutación es una delección de 15 pares de bases que genera la pérdida de 5 aminoácidos en el receptor tirosina kinasa *KIT*. Además se encontraron polimorfismos neutrales en los exones 11 del gen *KIT* y en el exón 18 del gen *PDGFRA*.

Conclusiones: El análisis molecular mediante secuenciación automática, permitió identificar una mutación en el gen *KIT* en una muestra de tumor GIST. Esta técnica puede ser aplicada para caracterizar las mutaciones genéticas de casos peruanos de GIST y así poder establecer un tratamiento adecuado según su perfil mutacional.

Palabras clave: Proteína Proto-Oncogénica c-KIT, Receptor alfa de Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas, Tumores del Estroma Gastrointestinal. (Fuente: DeCS BIREME).

Identification of a causative deletion of gastrointestinal tumor (GIST) by the analysis of the *KIT* and *PDGFRA* genes.

ABSTRACT

Objective: To optimize the detection of mutations in the genes *KIT* and *PDGFRA* in a sample of gastrointestinal stromal tumor (GIST).

Material and Methods: We analyzed a GIST tumor sample fixed and embedded in paraffin. Using the technique of the polymerase chain reaction (PCR) amplified exons 9, 11, 13 and 17 of the *KIT* gene and exons 12 and 18 *PDGFR* gene. PCR amplification was confirmed by gel electrophoresis on 2% agarose. The amplified fragments were purified and cloned for subsequent sequencing.

Results: We determined the presence of a pathogenic mutation in exon 11 of *KIT* gene. The mutation is a deletion of 15 base pairs and generates a loss of 5 amino acids. Neutral polymorphisms were also found in exon 11 of *KIT* gene and exon 18 of *PDGFRA* gene.

Conclusions: Molecular analysis by automatic sequencing identified a mutation in the *KIT* gene in a tumor sample GIST. This technique can be applied to characterize genetic mutations Peruvian cases of GIST and thus establish adequate treatment by mutational profile.

Keywords: Proto-Oncogene Protein c-KIT, Receptor Platelet-Derived Growth Factor Alpha, Gastrointestinal Stromal Tumors. (Source: MeSH NLM)

¹ Centro de Genética y Biología Molecular. Facultad de Medicina Humana. Universidad San Martín de Porres. Lima, Perú.

² Laboratorio de Patología. Facultad de Medicina Humana. Universidad San Martín de Porres. Lima, Perú.

³ Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. Lima, Perú.

⁴ Laboratorio de Biología Molecular. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

INTRODUCCIÓN

Los tumores del estroma gastrointestinal (GIST, *Gastrointestinal Stromal Tumors*) son las neoplasias mesenquimales más comunes del tracto gastrointestinal ⁽¹⁾, ubicándose principalmente dentro de la pared muscular del estómago y del intestino delgado y otros sitios anatómicos en la cavidad abdominal ⁽²⁾. Aproximadamente el 95% de los GISTs expresan el receptor Tirosina quinasa KIT (CD117), el cual es utilizado en la discriminación de estos tumores de otros sarcomas que se desarrollan en el abdomen ^(3,4).

Se piensa que los tumores GIST se originan de las células intersticiales de Cajal (ICCs).

Las ICCs están localizadas dentro y alrededor del plexo mientérico y funcionarían como células marcapasos intestinales que regulan la motilidad intestinal. Históricamente, los GISTs eran mal clasificados como leiomiomas o leiomiomasarcomas.

Posteriormente, se ha determinado que los GISTs tienen diferentes características ultraestructurales y marcadores inmunofenotípicos, comparados con células normales y tumores de músculo liso ⁽⁵⁾.

Los GISTs a menudo portan mutaciones que activan el receptor tirosina quinasa KIT o el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFRA). En el caso del gen KIT los cuatro exones involucrados 9, 11, 13 y 17, corresponden a los dominios extracelular, juxtamembranoso, tirosina quinasa 1 y tirosina quinasa 2 de la proteína KIT, respectivamente.

Mutaciones en estos exones generan una activación constitutiva de la actividad tirosina quinasa de la proteína KIT, el principal evento oncogénico en estos tumores ^(6,7,8,9).

En aquellos casos que no presentan mutaciones en el gen *KIT*, se ha encontrado que algunos presentan mutaciones en el gen *PDGFRA*, el cual también es un miembro de la familia Tirosina quinasa tipo III. Mutaciones en este gen en GISTs resultan en la activación constitutiva de esta actividad tirosina quinasa, la cual contribuye a la formación del tumor ⁽¹⁰⁾. La mayoría de mutaciones en el gen *PDGFRA* relacionadas con tumores GISTs, han sido reportadas en los exones 12 y 18. Hay que tener en cuenta que las mutaciones en los exones de estos genes son mutuamente excluyentes en la mayoría de tumores GISTs ⁽¹⁰⁾. Aproximadamente el 75% de las mutaciones en el gen *KIT* involucran el exón 11, agrupándose en los extremos 5' y 3' de dicho exón, que codifica el dominio Juxtamembranoso (citósólico) de la proteína KIT. Las mutaciones en el extremo 5' frecuentemente incluyen deleciones internas y sustituciones de un solo aminoácido, mientras que en el extremo 3' se observa una mayor proporción de duplicaciones. Clínicamente, estos pacientes tienen tumores GIST gástricos con un curso

indolente ⁽¹¹⁾.

En comparación, un curso clínico agresivo con un elevado riesgo de recurrencia y corta supervivencia, se ha observado en pacientes con tumores GIST portadores de deleciones en el exón 11, mientras que en pacientes GIST con otro tipo de mutaciones e inclusive sin mutación, se ha observado una muy baja supervivencia libre de enfermedad ^(12,13).

El objetivo del presente trabajo fue optimizar la detección de mutaciones en los genes KIT y PDGFRA en una muestra de GIST.

MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTRA

Se evaluó una muestra de GIST fijado en formalina al 10% e incluido en bloque de parafina. Se realizaron cortes histológicos de 5 µm y tinción con hematoxilina-eosina. El análisis inmunohistoquímico indicó que la muestra era positiva para la expresión de CD117.

EXTRACCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DEL DNA GENÓMICO.

El DNA genómico fue extraído usando el kit *High Pure PCR Template Preparation kit (ROCHE)* siguiendo las indicaciones del fabricante. La cuantificación del DNA se realizó mediante el uso del fluorómetro *Qubit™* (Invitrogen™).

El DNA extraído fue amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando primers diseñados para los exones 9, 11, 13 y 17 del gen *KIT* y los exones 12 y 18 del gen *PDGFRA* (Tabla 1). Las condiciones de PCR fueron: 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos a 95°C por 45 segundos, 55°C a 57°C durante 45 segundos (temperaturas específicas de hibridación en la tabla 1) y 72°C por 1 minuto. Finalmente una etapa de extensión a 72°C durante 10 minutos. La comprobación del proceso de amplificación se realizó mediante una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2% (Figura 1a). Los tamaños relativos de cada exón de ambos genes se encuentran detallados en la Tabla 1.

Tabla 1. Lista de primers usados y condiciones para amplificación de los genes KIT y PDGFRA.

Gen	Exón	Primer (5' → 3')	Ampl (bp)	Tm
KIT	9	F: 5'- tcctagagtaagccagggctt - 3' R: 5'- tggtagacagagcctaacaatc - 3'	284	55°C
	11	F: 5'- ctctctccagagtctctaatgac - 3' R: 5'- gttccttaaagtcactgttatgtgtacc - 3'	267	57°C
	13	F: 5'- gacatcagtttgccagttgt - 3' R: 5'- Tgttttgataacctgacagac - 3'	214	57°C
	17	F: 5'- atggttttctttctctccc - 3' R: 5'- tacattatgaaaatcacagg - 3'	243	57°C
PDGFRA	12	F: 5'- ctggtgcactgggactttggtaat - 3' R: 5'- gttgtgcaagggaaggaggtct - 3'	235	55°C
	18	F: 5'- gggatgatctattcagctacagatgg - 3' R: 5'- ccgaatctctagaagcaacacctgac - 3'	267	55°C

Identificación de una deleción causante de tumor del estroma gastrointestinal (Gist) por el análisis de los genes KIT y PDGFRA

SECUENCIACIÓN DEL DNA.

Los 6 fragmentos amplificados por PCR fueron purificados con el kit *QIAquick PCR Purification* (QIAGEN). Posteriormente fueron amplificados con el kit *BigDye Terminator versión 3.1 Cycle sequencing* y secuenciados en ambas direcciones (*forward* y *reverse*) en un analizador genético *ABI 3500* (*Applied Biosystems*).

Se realizaron dos procesos de secuenciación. La primera sirvió para determinar la presencia de mutaciones en los genes *KIT* y *PDGFRA*. Una posible mutación se encontró en el exón 11 del gen *KIT* con una sobreposición de bases típico de una deleción/inserción en uno de los alelos.

ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

El análisis de las secuencias se realizó mediante el uso del software *SerialCloner* (V1.3r11) (<http://www.serialbasics.com>). Las mutaciones se describieron en base a las secuencias de referencia NM_000222 y NM_006206 para los genes *KIT* y *PDGFRA*, respectivamente.

CLONACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR

Para diferenciar entre la secuencia normal y mutada (posible deleción/duplicación), se clonó el fragmento amplificado correspondiente al exón 11 del gen *KIT* utilizando el set de reactivos *pCR8/GW/TOPO Cloning* (*Invitrogen*) y siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, los productos de PCR se ligaron en el vector plasmídico *pCR8/GW/TOPO*, las células *ElectroMax™ DH10B™-T1* fueron transformadas con los constructos generados, estas células se cultivaron en medio LB con el antibiótico espectinomicina e incubadas a 37C.

El ADN del plásmido se extrajo usando el método modificado de lisis alcalina/PEG y luego se sometió a digestión con la enzima *EcoR1*, electroforesis en agarosa 1% y tinción con bromuro de etidio para confirmar la presencia del fragmento clonado. Los plásmidos obtenidos fueron secuenciados en ambos sentidos para confirmar las variaciones de la secuencia.

RESULTADOS

Se analizó una muestra de GIST fijada y embebida en parafina. En el análisis inmunohistoquímico se determinó la sobreexpresión del marcador CD117 (datos no mostrados). La muestra provenía de una paciente de 67 años con tumoración a nivel de estómago.

El análisis molecular de los exones 9, 11, 13 y 17 del gen *KIT* y los exones 12 y 18 del gen *PDGFRA*, permitió la detección de una mutación heterocigota (deleción/inserción) en el exón 11 del gen *KIT*. Después de la clonación con el kit *pCR8/GW/TOPO Cloning* para individualizar y secuenciar separadamente los alelos se encontró la mutación, denominada p.K550_E554del, que corresponde a una deleción

de 15 pares de bases a nivel del extremo 5' del exón 11 (Figura 1b), generando una pérdida de cinco aminoácidos (Lys-Pro-Met-Tyr-Glu) entre los codones 550 y 554. Esta mutación afecta la secuencia aminoacídica del dominio yuxtamembranoso del receptor tirosina kinasa. También se encontró un cambio puntual (c.1752T>C) en el codón 584 del exón 11, que no genera un cambio de aminoácido, por lo que se considera un polimorfismo neutral.

En el caso de los exones 12 y 18 del gen *PDGFRA* no se encontraron mutaciones patogénicas, sólo en el codón 824 del exón 18 se encontró un polimorfismo neutral (c.2472C>T) que no genera un cambio de aminoácido.

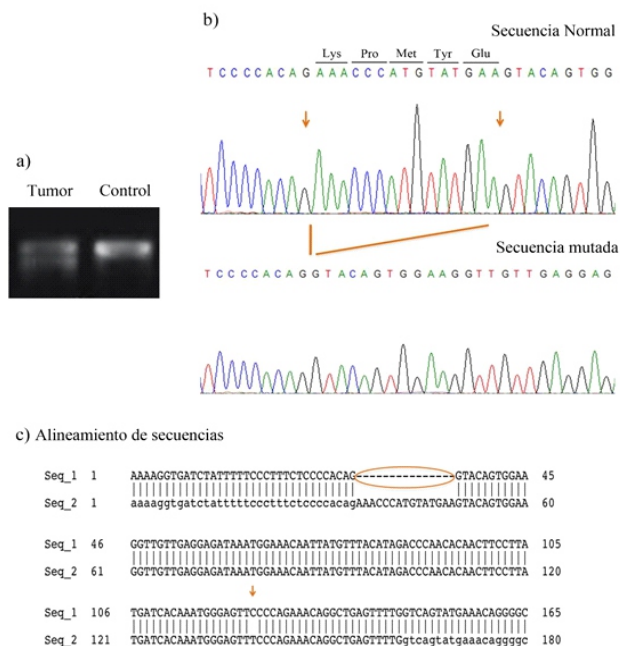


Figura 1. a) Electroforesis en gel de agarosa con patrón de migración alterado en la muestra tumoral. b) Secuencias parciales del exón 11 del gen *KIT* del tumor en la cual se muestra la secuencia normal y la deleción de 15 pb, que genera la pérdida de 5 aminoácidos (Lys-Pro-Met-Tyr-Glu) entre los codones 550 y 554 a nivel de la proteína. c) Alineamiento de secuencias donde se muestra la deleción de 15 pb al inicio del exón 11 del gen *KIT*, además del polimorfismo neutral (c.1752T>C) (Seq_1: secuencia mutada; Seq_2: secuencia normal).

DISCUSIÓN

Las mutaciones en los genes *KIT* y *PDGFRA* en tumores del estroma gastrointestinal pueden causar una proliferación celular descontrolada y una inhibición de la apoptosis mediante producción de señales continuas. En orden de frecuencia decreciente, estas mutaciones están presentes en los exones 11, 9, 13 y 17 del gen *KIT*, y en los exones 18 y 12 del gen *PDGFRA*^(14,15).

En el gen *KIT*, estas mutaciones resultan en la activación del dominio quinasa de la proteína KIT, independientemente del ligando. La mutación p.K550_E554del encontrada en nuestro estudio ya ha sido reportada y estaría afectando la estructura del dominio juxtamembranoso de la proteína que tiene como función prevenir la activación constitutiva de la quinasa^(16, 17). Esta mutación es una delección de 15 pares de bases que estaría asociada con una corta sobrevida libre de progresión⁽¹⁸⁾. Las delecciones que implican el codón 557 y/o codón 558 están asociadas con un comportamiento maligno⁽¹⁹⁾. También se han reportado casos en las que la delección se ubica entre los codones 550 y 558 (p.K550_K558del), con una frecuencia variable (1.4 a 1.6%) y estaban asociadas con un comportamiento agresivo^(10,20), por lo que podemos esperar que en nuestro caso las características del tumor deberían ser similares, ya que la mutación se encuentra en la misma región.

El estado mutacional del gen *KIT* es también un factor predictivo de respuesta a tratamiento con imatinib (Glivec®), un inhibidor selectivo de tirosina quinasa⁽²⁰⁾. Existe correlación entre el tipo de mutación con la respuesta clínica al imatinib. Los pacientes portadores de una mutación en el exón 11, muestran especial sensibilidad al imatinib (69%) y mayor tiempo de sobrevida libre de progresión de la enfermedad que los pacientes con la mutación en el exón 9 o sin mutación *KIT* detectable (40 y 39% respectivamente)^(21, 22), por lo que en nuestro caso el paciente podría ser beneficiado con el tratamiento de imatinib.

La ausencia de mutaciones en el gen *PDGFRA* en la muestra analizada se corresponde con el hecho de que las vías oncogénicas de *KIT* y *PDGFRA* son alternativas y mutuamente excluyentes en el desarrollo de GISTs⁽¹⁴⁾.

Finalmente, en la versión 2012 de las Guías de Práctica Clínica de la ESMO (*European Society for Medical Oncology*) para GIST, se indica que la caracterización molecular de la mutación debe ser obligatoria para todos los pacientes con GIST, con el fin de orientar en la administración de un tratamiento adyuvante con imatinib^(23,24).

En conclusión, el análisis molecular mediante secuenciación automática, permitió identificar una mutación en el gen *KIT* en una muestra de tumor GIST. Esta técnica puede ser aplicada para caracterizar las mutaciones genéticas de casos peruanos de tumores GIST para establecer un tratamiento y pronóstico adecuados según el perfil mutacional.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agaimy A. Gastrointestinal stromal tumors (GIST) from risk stratification systems to the new TNM proposal: more questions than answers? A review emphasizing the need for a standardized GIST reporting. *Int J Clin Exp Pathol* 2010; 3:461-471.
2. Joensuu H, Kindblom LG. Gastrointestinal stromal tumors: a review. *Acta Orthop Scand Suppl* 2004; 75:62-71.
3. Miettinen M, Lasota J, Sobin LH. Gastrointestinal stromal tumors of the stomach in children and young adults: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 44 cases with long-term follow-up and review of the literature. *Am J Surg Pathol* 2005; 29:1373-1381.
4. Tzen C, Mau B. Analysis of CD117-negative gastrointestinal stromal tumors. *World J Gastroenterol* 2005; 11:1052-1055.
5. Gold J, Dematteo R. Combined Surgical and Molecular Therapy: The Gastrointestinal Stromal Tumor Model. *Ann Surg* 2006; 244: 176 -184.
6. Corless CL, Fletcher JA, Heinrich MC. Biology of gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* 2004; 22:3813-25.
7. Tornillo L, Terracciano L. An update on molecular genetics of gastrointestinal stromal Tumours. *J Clin Pathol* 2006; 59:557-563.
8. Debiec-Rychter M, Dumez H, Judson I, et al. Use of c-KIT/PDGFRα 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; 40:689-95.
9. Rubin BP, Singer S, Tsao C, et al. KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 2001; 61:8118-21.
10. Corless CL, Schroeder A, Griffith D, et al. PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors: frequency, spectrum and in vitro sensitivity to imatinib. *J Clin Oncol* 2005; 23:5357-64.
11. Kontogianni-Katsarou K, Dimitriadis E, Lariou C, Kairi-Vassilatou E, Pandis N, Kondi-Paphiti A. KIT exon 11 codon 557/558 deletion/insertion mutations define a subset of gastrointestinal stromal tumors with malignant potential. *World J Gastroenterol* 2008; 14:1891-1897.
12. Michelucci A, Chiappetta C, Cacciotti J, Vecchia N, Astri E, Leopizzi M, et al. The KIT Exon 11 Stop Codon Mutation in Gastrointestinal Stromal Tumors: What Is the Clinical Meaning? *Gut Liver* 2013; 7:35-40
13. Dematteo RP, Gold JS, Saran L, Gönen M, Liau KH, Maki RG, et al. Tumor mitotic rate, size, and location independently predict recurrence after resection of primary gastrointestinal stromal tumor (GIST). *Cancer* 2008; 112:608-615.
14. Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal Stromal Tumors Review on Morphology, Molecular Pathology, Prognosis, and Differential Diagnosis. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130:1466-78.
15. Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, et al. PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* 2003; 299:708-10.
16. Agaram NP, Besmer P, Wong GC, Guo T, Socci ND, Maki RG, et al. Pathologic and molecular heterogeneity in imatinib-stable or imatinib-responsive gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 2007; 13(1):170-81.
17. Mol CD, Dougan DR, Schneider TR, Skene RJ, Kraus ML, Scheibe DN et al. Structural basis for the autoinhibition and STI-571 inhibition of c-Kit tyrosine kinase. *J Biol Chem* 2004; 279: 31655-31663.

18. Corless CL, Barnett CM, Heinrich MC. Gastrointestinal stromal tumors: origin and molecular oncology. *Nat Rev Cancer* 2011; 11(12):865-878.
19. Martin-Broto J, Gutierrez A, Garcia-del-Muro X, Lopez-Guerrero JA, Martinez-Trufero J, de Sande LM, et al. Prognostic time dependence of deletions affecting codons 557 and/or 558 of KIT gene for relapse-free survival (RFS) in localized GIST: a Spanish Group for Sarcoma Research (GEIS) Study. *Ann Oncol* 2010; 21(7):1552-1557.
20. Wozniak A, Rutkowski P, Piskorz A, Ciwoniuk M, Osuch C, Bylina E, et al. Prognostic value of KIT/PDGFR mutations in gastrointestinal stromal tumours (GIST): Polish Clinical GIST Registry experience. *Ann Oncol* 2012; 23(2):353-60.
21. Muñoz C, Sabah S, Navarro A, Planzer M, Silva C, Santander R. Tumores del estroma gastrointestinal (GIST): Revisión de la literatura. *Gastr Latinoam* 2006; 17(1): 43-51.
22. Heinrich MC, Maki RG, Corless CL, Antonescu CR, Harlow A, Griffith D, et al. Primary and secondary kinase genotypes correlate with the biological and clinical activity of sunitinib in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* 2008; 26(33):5352-5359.
23. Blay JY, Le Cesne A, Cassier PA, Ray-Coquard IL. Gastrointestinal stromal tumors (GIST): a rare entity, a tumor model for personalized therapy, and yet ten different molecular subtypes. *Discov Med*.2012; 13(72):357-67.
24. ESMO/European Sarcoma Network Working Group. Gastrointestinal stromal tumors: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2012; 23 (7): vii49 - vii55.

Fuentes de financiamiento

El estudio ha sido financiado por el laboratorio de Genética y Biología Molecular de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad de San Martín de Porres.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

Correspondencia:

José Luis Buleje Sono, PhD.

Dirección: Av. Alameda del Corregidor 1531, Urb. Los Sirius, Las Viñas, La Molina, Lima 12. Teléfono: 985225663. Email: jbulajes@usmp.pe

Recibido: 29 de Agosto de 2014
Aprobado: 06 de Octubre de 2014