

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA

DETERMINACIÓN DE MUTACIONES EN LOS GENES DE LOS RECEPTORES
TIROSINA CINASA (KIT Y PDGFR α) ASOCIADOS A TUMORES DEL ESTROMA
GASTROINTESTINAL (GIST)



LIC. YAXELIS GRIZEL MENDOZA HERNÁNDEZ

CED. 9-216-107

COMO REQUISITO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS CON ESPECIALIZACIÓN EN GENÉTICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

JULIO 2009

10

UNIVERSIDAD

Vicerrectoría de Investigación y Postgrado
Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología

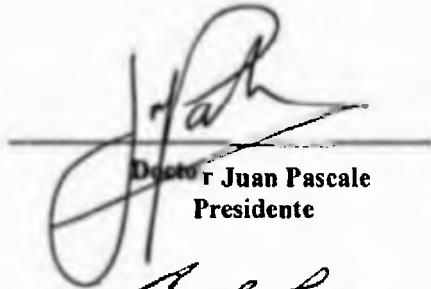
Título de la Tesis: *“Determinación de Mutaciones en los Genes de los Receptores Tirosina Kinasa (KIT y PDGFRa) Asociados a Tumores del Estroma Gastrointestinal (GIST)”*

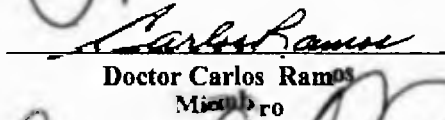
Nombre de la Estudiante: YAXELIS GRIZEL MENDOZA HERNÁNDEZ Cédula: 9-216-107

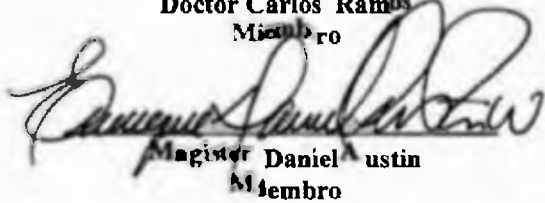
Tesis sometida para optar al título de Maestría en Ciencias Biológicas, con énfasis en Genética y Biología Molecular.

comprobar del curso

APROBADO POR:


Doctor Juan Pascale
Presidente


Doctor Carlos Ramos
Miembro


Magister Daniel Austin
Miembro

REFRENDADO POR:


REPRESENTANTE DE LA VICERRECTORÍA
DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO

FECHA: 24 de Julio de 2009.

AGRADECIMIENTO

A toda mi familia

María Azucena Hernández de Mendoza

Patricia Mendoza

Evelise Fonseca y Juan Castillo por su apoyo en el procesamiento de las muestras

Dr. Carlos Singh (Investigador Principal del Proyecto) y al Instituto Oncológico Nacional

Dr. Juan M. Pascale y al Departamento de Genómica y Proteómica, ICGES

Prof. Carlos Ramos

Novartis Panamá por el financiamiento parcial al Proyecto

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS.....	5
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	6
1. MUTACIÓN Y CÁNCER.....	6
2. RECEPTORES TIROSINA CINASA.....	10
a. ESTRUCTURA DEL RECEPTOR KIT Y PDGFR α	11
b. ESTRUCTURA DEL LIGANDO DE C-KIT.....	11
c. PROCESO DE ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR	12
d. SITIOS DE ANCLAJE DE LAS PROTEÍNAS A KIT Y LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES	14
e. C-KIT: EXPRESIÓN Y MUTACIONES.....	16
3. GIST: GENERALIDADES.....	22
4. GIST Y MUTACIONES EN RECEPTORES TIROSINA CINASA.....	25
5. MUTACIONES EN GIST Y EFICIENCIA DE LAS DROGAS.....	26
METODOLOGÍA.....	31
a. SELECCIÓN DE MUESTRAS	31
b. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS	32
c. AMPLIFICACIÓN DEL ADN	32

d. SECUENCIACIÓN	35
e. DETERMINACIÓN DE LAS MUTACIONES	35
f. CLONACIÓN.....	35
RESULTADOS.....	38
a. AMPLIFICACIÓN DE EXONES.....	38
b. SECUENCIACIÓN.....	39
c. DETERMINACIÓN DE LAS MUTACIONES.....	39
DISCUSIÓN.....	58
CONCLUSIONES.....	67
BIBLIOGRAFÍA CITADA	68

INDICE DE TABLAS

Tabla No.1. Sitios de fosforilación de las tirosinas en KIT humano y ratón, nombre de la proteína que el KIT recluta y el posible efecto biológico de dicha interacción.....	17
Tabla No.2. Mutaciones en el gen <i>c-kit</i> más frecuentemente asociadas a enfermedades.....	19
Tabla No.3. Estimación del grado de riesgo de un GIST en base a su tamaño y tasa mitótica según Fletcher y Miettinen.....	24
Tabla No.4. Resumen de las mutaciones más frecuentes del <i>c-kit</i> y <i>pdgfra</i> encontradas en GIST no-hereditario (esporádico)	28
Tabla No.5. Secuencias y tiempo de anidamiento de los cebadores utilizados.....	34
Tabla No.6. Distribución de las mutaciones en los genes <i>c-kit</i> y <i>pdgfra</i> encontrados en los tumores de este estudio.	47
Tabla No.7. Características clínicas y patológicas de los pacientes que presentaron ambos genes tipo silvestre.....	48

Tabla No.8. Características clínicas y patológicas de los pacientes que presentaron sustituciones simples en el exón 11 del gen <i>c-kit</i>	50
Tabla No.9. Características clínicas y patológicas de los pacientes que presentaron sustituciones y deleciones simples en el exón 11 del gen <i>c-kit</i>	51
Tabla No.10. Características clínicas y patológicas de los pacientes que presentaron múltiples mutaciones (deleciones y sustituciones) en el exón 11 del gen <i>c-kit</i>	52
Tabla No.11. Características clínicas y patológicas de los casos T08 y T11 que presentaron sustitución del aminoácido W ⁵⁵⁷ por un codón de parada más deleciones; y el caso T32 que presentó sustitución (Q575E) y duplicación de 3 aminoácidos en el exón 11 del gen <i>c-kit</i>	53
Tabla No.12. Características clínicas y patológicas de los pacientes que presentaron duplicaciones en el exón 9 del gen <i>c-kit</i>	55
Tabla No.13. Características clínicas y patológicas de los pacientes que presentaron mutaciones en el exón 18 del gen <i>pdgfra</i>	57

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Capacidades adquiridas del Cáncer durante su desarrollo a través de varios mecanismos básicos cuyo orden varía dependiendo del tipo de cáncer.....	9
Figura 2. Estructura los receptores tirosina cinasa, KIT y PDGFRA.....	13
Figura 3. Esquema simplificado que muestra las vías de transducción de señales activadas al fosforilar los diferentes residuos de Tirosina (Y) encontrados en los receptores tirosina cinasa tipo III.	18
Figura 4. Frecuencia de mutaciones encontrados en los exones de <i>c-kit</i> y <i>pdgfra</i>	27
Figura 5. Exones con mutaciones primarias y secundarias en <i>c-kit</i>	30
Figura 6. Vector de clonación pGem-T-easy (Promega) utilizado.....	37
Figura 7. Tamaños de banda aproximados para cada uno de los exones estudiados en <i>c-kit</i> y <i>pdgfra</i>	42

Figura 8. Gel de agarosa al 2% en 0.5X TBE mostrando las bandas amplificadas para los exones 9 y 11.....	43
Figura 9. La identificación de clones con inserto se hizo amplificando directamente de la colonia de bacterias.....	44
Figura 10. Ventana del Programa Sequencher donde muestra los cromatogramas de las secuencias mostrando mutación	45
Figura 11. Cromatograma de secuencias en ambas cadenas mostrando dobles picos en una misma posición nucleotídica	46
Figura 12. Tipo y posición de las mutaciones dentro del exón 11 del gen <i>c-kit</i>	49
Figura 13. Tipo y posición de las mutaciones dentro del exón 9 del gen <i>c-kit</i>	54
Figura 14. Tipo y posición de las mutaciones dentro del exón 18 del gen <i>pdgfra</i>	54
Figura 15. Sitio de unión y anclaje del imatinib a la cinasa del <i>c-kit</i>	65
Figura 16. Efectos <i>in Vitro</i> del Imatinib y Sunitinib en mutantes de KIT.	66

RESUMEN

Las alteraciones moleculares en los oncogenes *c-kit* y *pdgfra*, que codifican para los receptores de membrana tirosina cinasas, se asocian con características clínico-patológicas de pacientes con tumores del estroma gastrointestinal (GIST). Actualmente, los medicamentos están siendo desarrollados para inhibir, a nivel molecular, la acción de los oncogenes que desencadenan el desarrollo del cáncer. En este estudio caracterizamos las mutaciones de los genes *c-kit* y *pdgfra* en pacientes con diagnóstico de GIST para determinar las mutaciones que pudieran estar asociadas a la proliferación tumoral y/o a una respuesta terapéutica específica. Se aisló el ADN de 44 tejidos de tumor fijados en formalina con diagnóstico de GIST. Los exones con mayor frecuencia de mutaciones reportadas para los genes *c-kit*, y *pdgfra*, fueron amplificados y evaluados por secuenciación directa. Experimentos de clonación fueron realizados para caracterizar todos los posibles alelos mutantes presentes en las células tumorales. Las secuencias de aminoácidos fueron inferidas y alineadas a una secuencia de referencia del Genbank para determinar el sitio y el tipo de mutación. Encontramos la mayor frecuencia de mutaciones en el exón 11 (77%) del gen *c-kit*. Las mutaciones encontradas en el exón 11 fueron heterogéneas mientras que, el exón 9 presentó un único tipo de mutación (p.A502_Y503dup). En el gen *pdgfra* se observó sustituciones y deleciones, siendo la más frecuente p.D842V. Todas las mutaciones encontradas han sido previamente asociadas a GIST, inclusive se observaron mutaciones asociadas a GIST con síndromes familiares. Un 66% de los pacientes de alto riesgo presentaron mutaciones entre los residuos 556-560 del exón 11 del gen *c-kit*. Es interesante observar que las mutaciones entre los residuos 556-560 comprenden la región de la yuxtamembrana que regula entre la conformación activa e inactiva del receptor. Nuestros resultados sugieren que el sitio y tipo de mutación activan constitutivamente a los receptores KIT y PDGFR α . Estudios clínicos han determinado cómo el tipo y sitio de mutación en estos genes, influyen en la respuesta objetiva y la resistencia a las drogas que actualmente se emplean. Una evaluación a nivel molecular de los casos con GIST permite una mejor interpretación del pronóstico y evolución clínica del proceso tumoral al determinar las mutaciones que desencadena una inadecuada señalización intracelular y por ende un descontrol del ciclo celular.

ABSTRACT

Mutations found in tyrosine kinase membrane receptor oncogenes, *c-kit* and *pdgfra*, are associated with clinical and pathological characteristics of gastrointestinal stromal tumors (GIST). New drugs have been developed to inhibit these oncogenes at a molecular level. In this study, we determined the *c-kit* y *pdgfra* gene mutations in 39 GIST to analyze those mutations associated with tumor proliferation and specific therapeutic response. We isolated DNA from 44 paraffin-embedded tumor tissues and amplified the exons associated with a high frequency of mutations. Direct PCR sequencing of these exons were made and those with different alleles were cloned and re-sequenced. Amino acids sequences were inferred from DNA sequences and were aligned to a Genebank reference sequence to determine the position and type of mutation. We found the higher frequency of mutations in *c-kit* gene exon 11 (90%). The mutations found in *c-kit* exon 11 were heterogeneous while in *c-kit* exon 9, there was only one mutation type (p.A502_Y503dup). Mutations on *pdgfra* gen showed several substitutions and deletions being the more frequent p.D842V. All mutations found have been previously associated to GIST, and we also found mutations associated to familiar GIST. A 66% of patients with mutations within residues 556-560 (exon 11) were considered high risk. We identified a region of high frequency mutations that would primarily affect the KIT receptor auto-inhibited conformation. Our results suggest that the site and type of mutation maintain receptors KIT and PDGFRA constitutively activated. A molecular evaluation of KIT and PDGFRA receptors mutations permits a better prognostic interpretation and clinical evolution of tumor proliferation. Characterized mutations will lead to a better knowledge for drugs design and to specific therapy applications to block molecular process of tumor proliferation.

INTRODUCCIÓN

Los Tumores del Estroma Gastrointestinal (GIST según siglas en inglés) y algunos tipos de mastocitosis y leucemias presentan mutaciones en los genes *c-kit* y *pdgfra* (Ikeda *et al.*, 1991; Nagata *et al.*, 1995; Kimura *et al.*, 1997; Corless *et al.*, 2004). Estos genes codifican para las proteínas KIT (receptor del factor de células madres) y PDGFR α (receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas), que son receptores de membrana con actividad tirosina cinasa involucrados en las principales vías de señalización celular que determinan crecimiento y proliferación de las células (Yarden *et al.*, 1986, 1987; Roskoski, 2005). Estudios recientes han revelado que medicamentos como STI-571 (Imatinib, Novartis) tienen un efecto anti-tumor que interrumpe la acción de la tirosina cinasa sobreactivada (Debiec-Rychter *et al.*, 2004). Estos mismos autores demostraron que la eficacia en la regresión del tumor a la acción de la droga Imatinib esta en un 50-70%, mientras que en un 85-90% en la detención de la progresión. El nivel de respuesta al tratamiento, junto con otros parámetros clínico-patológico, están relacionados con el tipo de mutación (sustitución, duplicación, delección, inserción) y la localización de la misma (codón del exón, intrón, región reguladora) (Corless *et al.*, 2004). Las células tumorales en respuesta al tratamiento con Imatinib desarrollan mecanismos alternos (c.p.e, mutaciones secundarias o, activaciones de otros receptores cinasas) para crear la resistencia a medicamentos inhibidores de cinasas (Heinrich *et al.*, 2006). La resistencia al

Imatinib se ha observado en un 14% en pacientes que experimentan una progresión del tumor a los 6 meses y en un 50% a los 2 años de iniciado el tratamiento (Demetri *et al.*, 2002, Verweij *et al.*, 2004).

Por lo tanto, debido al proceso intrínseco de la proteína para activarse y autoinhibirse, la importancia que una mutación confiere a este proceso, demanda la determinación a nivel molecular de las mutaciones observadas en pacientes con tumores y su efecto patológico, en relación al tratamiento. Cuanto más se documente sobre las mutaciones observadas en los pacientes, más contribuimos al desarrollo de nuevos medicamentos inhibidores de la actividad cinasa.

En este estudio determinamos las mutaciones en los genes *c-kit* y *pdgfr α* en pacientes con diagnóstico de GIST y las asociamos con la activación constitutiva del receptor. Los resultados de esta investigación permitirán identificar si los mecanismos moleculares de la terapia con drogas que inhiben la acción tirosina cinasa del receptor son de beneficio a los pacientes con GIST en Panamá. Conociendo la biología del GIST y sus bases moleculares, podríamos comprender los mecanismos de la alteración genética asociados a la formación de cánceres.

OBJETIVO GENERAL

- Determinar las mutaciones en los residuos de aminoácidos de los genes *c-kit* y *pdgfr α* asociadas a la activación constitutiva del receptor.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar las mutaciones de los genes *c-kit* y *pdgfr α* de tejidos preservados en bloques de parafina de pacientes con GIST.
- Asociar las mutaciones del paciente con el grupo de riesgo.
- Predecir la respuesta terapéutica según el patrón de mutaciones presentes.

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

1. MUTACIÓN Y CÁNCER

Las mutaciones pueden ser causadas por agentes que dañan al ADN y son comúnmente llamadas mutaciones inducidas. Los mutágenos, agentes que inducen la mutación, pueden ser de dos tipos, químicos tóxicos (nitritos, bromouracilos, naranja acridino) y radiación (rayos gamma, luz ultravioleta, partículas alfa y beta). Por el contrario, las mutaciones espontáneas, que ocurren sin químicos ni radiación, son debidas a errores en la replicación y reparación del ADN (Griffiths *et al.*, 2000; Lodish *et al.*, 2000).

El cáncer puede originarse por 1) agentes ambientales (radiaciones) o por sustancias químicas que tienen la facultad de dañar al ADN llamados carcinógenos; 2), el resultado de mutaciones a nivel somático y/o de la línea germinal en genes que regulan y controlan el crecimiento y división celular, éstos son los oncogenes y los genes supresores de tumores; 3) y retrovirus que pueden generar células cancerosas por su facultad de capturar oncogenes de una célula huésped animal, insertarlos en su genoma y expresarlos al infectar otros individuos (Lodish *et al.*, 2000; Clark & Russell, 2000). Existe una nomenclatura para diferenciar a un oncogen proveniente de un virus de aquel localizado en la célula. A la versión del oncogen que proviene de un virus se le nombra con la letra *v* (minúscula) seguida del nombre del gen (en minúscula y cursiva); ejemplo, *v-kit*. La

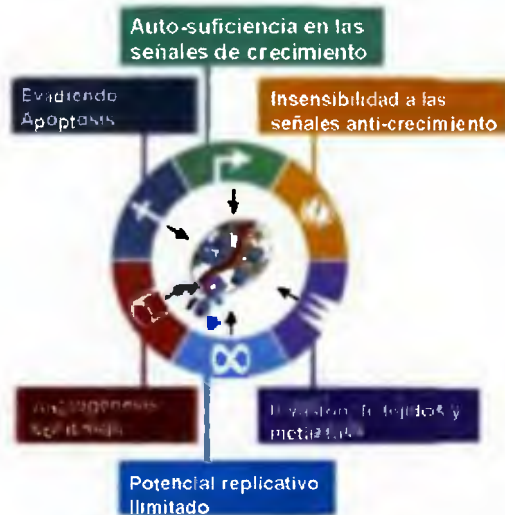
versión del oncogen presente en el cromosoma se le designa con la letra *c* seguida del nombre del gen; ejemplo, *c-kit* (Clark & Russell, 2000).

Un proto-oncogen es una versión no mutada de un oncogén y tienen como función regular procesos de división y crecimiento celular. Ejemplos de proto-oncogenes son **1)**, receptores de membrana celular, los cuales llevan el mensaje externo hacia el interior de la célula (Chabot *et al.*, 1988); **2)**, los factores de crecimiento, los cuales son proteínas que viajan por el torrente sanguíneo, llevando mensajes a la superficie celular (Baserga, 1994); **3)**, proteínas de transmisión de señales, las cuales pasan las señales extracelulares recibidas a enzimas o genes necesarios para la división celular (ejemplo, proteínas cinasas; Karin & Hunter, 1995); **4)** y los factores de transcripción, proteínas que se unen y activan los genes (Dang, 1999). Mientras que los genes supresores de tumores o anti-oncogen ayudan a mantener el control del ciclo celular codificando proteínas que se enlazan a una secuencia específica del ADN (zinc fingers) en la región reguladora de los genes a expresarse como ocurre con el Retinoblastoma (Weinberg, 1995).

Algunos oncogenes son el resultado de mutaciones que alteran su regulación, mientras que otros son el resultado de mutaciones en su porción estructural (Clark & Russell, 2000). Si la mutación en solo uno de los dos alelos de un oncogen es suficiente para generar un cambio en la función del gen, se considera el alelo mutado como el alelo dominante. Por el contrario, y como ocurre en la mayoría de los genes supresores de tumores, se requiere la mutación de ambos alelos para generar un cambio, considerando los alelos mutados como recesivos (Lodish *et al.*, 2000; Clark & Russell, 2000).

Hanahan y Weinberg (2000) sugieren que el cáncer es una manifestación de seis alteraciones esenciales en la fisiología celular que colectivamente dictaminan el crecimiento de células malignas. Estas alteraciones son 1), señales de autosuficiencia para crecer 2), insensibilidad a las señales inhibitorias del crecimiento 3), evasión de la muerte celular programada (apoptosis) 4), ilimitado potencial replicativo 5), se mantiene la angiogénesis (habilidad de vascularización) 6) y la invasión tisular seguido de metástasis (Figura 1). Aunque el orden en que éstas seis alteraciones se adquieren varía dependiendo del tipo de cáncer y del mecanismo que generó el cambio genético en la célula. La mutación de un proto-oncogen y/o de un gen supresor del tumor puede afectar el funcionamiento de otros genes (Lengauer *et al.*, 1998). La pérdida de función de la proteína supresora de tumor *p53*, por ejemplo, se encuentra asociada a diferentes cánceres (Levine, 1997). De hecho se ha observado que la pérdida en función del *p53* altera el funcionamiento de genes involucrados en la transducción de señales para la reparación del ADN o en los genes encargados de la segregación cromosomal durante la mitosis (Lengauer *et al.*, 1998; Hanahan & Weinberg, 2000).

A.



B.

Componente	Capacidades Adquiridas	Ejemplos de Mecanismos
	Auto-suficiencia en las señales de crecimiento	Activación del oncogen <i>H-Ras</i>
	Insensibilidad a las señales de auto-crecimiento	Pérdida del gen supresor retinoblastoma
	Evadiendo apoptosis	Produce los factores de supervivencia IGF
	Potencial replicativo ilimitado	Activación de la telomerasa
	Angiogénesis sostenida	Produce al inductor VEGF
	Invasión de tejidos y metástasis	Inactivación de E-cadherin

Figura 1. Capacidades adquiridas del Cáncer durante su desarrollo a través de seis mecanismos básicos (A) cuyo orden varía dependiendo del tipo de cáncer. Ejemplos de genes asociados a cada mecanismo se muestran (B) algunos de los cuales pueden estar asociados a varios cánceres (Hanahan & Weinberg, 2000).

2. LOS RECEPTORES TIROSINA CINASA

Besmer *et al.* (1986) identificaron un oncogen viral en el virus del sarcoma felino Hardy-Zuckerman (HZ4-FeSV) que había sido aislado de un fibrosarcoma felino. La secuencia de aminoácidos de este oncogen reveló una homología con la familia de genes de la tirosina cinasa y por ende se le designó *v-kit* (Besmer *et al.*, 1986). Posteriormente, *c-kit*, el homólogo humano de *v-kit*, fue identificado y se encontró que estaba ubicado en el cromosoma 4q12 en humanos (el cual corresponde al cromosoma 5 en ratón) (Yarden *et al.*, 1987; Chabot *et al.*, 1988; Spritz *et al.*, 1994). Yarden *et al.* (1987) determinaron que el gen *c-kit* codificaba para una glicoproteína transmembranal de 145-kDa, la cual era capaz de autofosforilar los residuos de tirosina, y relacionó a *c-kit*, por su similitud en estructura y función proteica, con los miembros de la familia tirosina cinasa subfamilia III, encontrando una mayor homología con los receptores PDGF y CSF-1 que son receptores del factor de crecimiento. Dentro de esta subfamilia se incluyen los receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor-1 estimulador de la colonia de macrófago (CSF-1 o c-fms), y el receptor Flt-3 (Sherr *et al.*, 1985; Coussens *et al.*, 1986; Yarden *et al.*, 1986; Rosnet *et al.*, 1993). Tiempo después un nuevo factor de crecimiento celular de mastocitos (MGF, mast cell growth factor) fue identificado y se demostró que era el ligando para el receptor *c-kit* (Williams *et al.*, 1990). MGF también se conoce con los siguientes nombres en inglés: Stem Cell Factor (SCF), Kit Ligand (KL) y Steel Factor (SF) (Chan, 1999).

a. Estructura del receptor KIT y PDGFR α

Los receptores KIT y PDGFR α se caracterizan porque actúan como dímeros y presentan tres regiones: extracelular, transmembranal y citoplasmático. La región extracelular está constituida por cinco dominios similares a inmunoglobulinas (similar a Ig), en donde el segundo y tercer dominio constituyen en conjunto el sitio de anclaje del ligando mientras que el cuarto dominio contiene el sitio de dimerización. La región transmembranal consta de una alfa hélice mientras que la región citoplasmática está compuesta por el dominio adyacente a la membrana (denominado juxtamembrana) y por dos dominios cinasas dividido por un segmento hidrofílico (Figura 2) (Sherr *et al.*, 1985; Coussens *et al.*, 1986; Yarden *et al.*, 1986; Rosnet *et al.*, 1993; Lev *et al.*, 1993; Roskoski, 2005; Lemmon *et al.*, 1997).

El gen *c-kit* puede generar también formas truncadas de la proteína KIT, formada por un solo dominio cinasa, resultado del ajuste (corte y empalme) alternativo del mRNA. Estas isoformas son solubles y se expresan en células germinales masculinas (Rossi *et al.*, 1992), pero debido a que está severamente truncada, no presenta una actividad cinasa, aunque puede mediar señales demostrándose su importancia en la espermatogénesis y la fertilización (Sette *et al.*, 2000).

b. Estructura del ligando de *c-kit*: Stem Cell Factor (SCF)

SCF presenta dos isoformas, una soluble y la otra anclada a la membrana, que se generan como resultado del ajuste alternativo del mRNA y de los procesos proteolíticos (Lu *et al.*, 1991). La forma soluble tiene 165 aminoácidos y funciona como un homodímero (Zhang

et al., 2000). Los dímeros de las isoformas SCF se anclan al *c-kit* con alta especificidad y afinidad (Lev *et al.*, 1993; Lemmon *et al.*, 1997):

c. Proceso de activación del receptor

La activación de los receptores tirosina cinasa se inicia con la interacción de un ligando, como el Factor de Célula Madre (stem cell factor) con el segundo y tercer dominio similar a Ig provocando la dimerización de los receptores de tal forma que los dominios de cinasa intracelulares de cada receptor interactúen en *trans* uno con el otro (Zhang *et al.*, 2000; Mol *et al.*, 2003; Yuzawa *et al.*, 2007). Un cuarto dominio similar a Ig defectuoso resulta en una disociación acelerada del ligando, indicando que la afinidad del ligando es dependiente de la dimerización de los receptores (Blechman *et al.*, 1995; Yuzawa *et al.*, 2007).

En proteínas cinasas, generalmente los primeros residuos de tirosina que se fosforilan son aquellos localizados en el lazo de activación, localizado en el segundo dominio cinasa, lo cual promueve la estabilización del receptor en su forma más activa (Huse & Kuriyan, 2002; Roskoski, 2004). A diferencia de las proteínas cinasas, los receptores tirosina cinasa de la subfamilia III, fosforilan primeramente los residuos de tirosina localizados en las tirosinas 568 y 570 de la juxtamembrana en vez de la tirosina 823 del loop de activación; generando un cambio en la configuración estática que bloquea estéricamente el lazo de activación y evitando que el receptor se mantenga en conformación activa indefinidamente (Mol *et al.*, 2003).

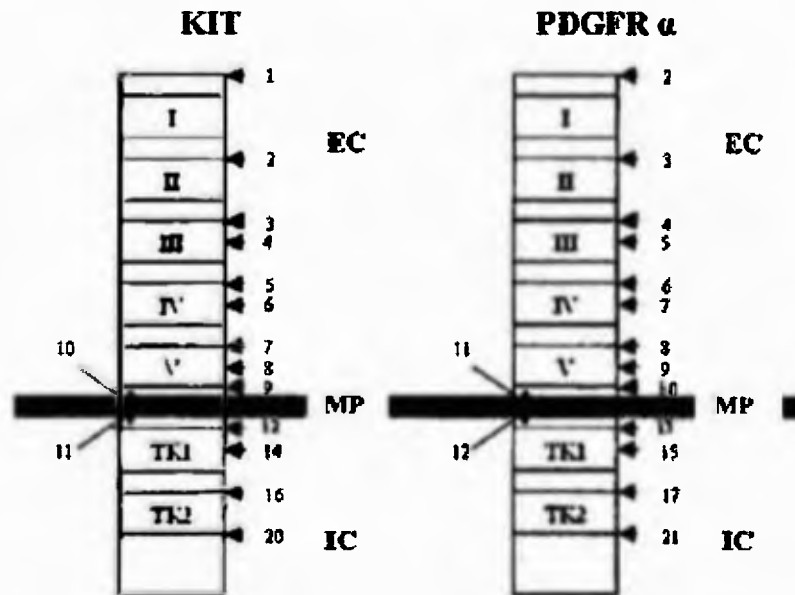


Figura 2. Estructura de los receptores tirosina cinasa KIT y PDGFR α indicando cada dominio similar a Ig en la región extracelular (EC) en números romanos (I, II, III, IV y V), la región transmembranal con un segmento que atraviesa la membrana plasmática (MP) y la región intracelular (IC) con dos dominios cinasas (TK1 y TK2). KIT es codificado por 20 exones y PDGFR α es codificado por 21 exones. La posición de los exones se indican con flechas según el segmento de la proteína que codifican en cada receptor (Edling, 2006).

La juxtamembrana es por ende importante en el proceso de activación, una delección del dominio causa un incremento en el tiempo de activación y una duplicación inhibe la transfosforilación (Chan *et al.*, 2003). Luego de la fosforilación inicial el residuo de tirosina 823, en la segunda región cinasa se fosforila para estabilizar la forma activa del receptor (Mol *et al.*, 2003, Mol *et al.*, 2004). Por consiguiente, el residuo de tirosina 568 localizado en la juxtamembrana del receptor es el sitio primario de la autofosforilación *in vivo* (Mol *et al.*, 2004). El cambio de conformación del lazo de activación permite que el ATP unido al receptor se exponga y que los residuos de tirosina 823, en el segundo dominio cinasa, catalicen la transferencia del grupo fosfato gamma (ATP) al grupo hidroxilo del sustrato con un dominio SH2 (Src homology 2) (Roskoski, 2005). La activación del receptor inicia una cascada de señales en el citoplasma promoviendo el crecimiento y proliferación de las células (Roskoski, 2005; Lennartsson *et al.*, 2005; Edling, 2006).

d. Sitios de anclaje de las proteínas al KIT y la transducción de señales

Después de la activación del receptor KIT diversas proteínas son reclutadas directa o indirectamente para tomar parte en los complejos procesos de transducción de señales (Tabla 1). Algunas de las funciones de estas proteínas reclutadas dentro de las células aún son desconocidas, aunque individualmente tengan funciones específicas como es el caso de Cbl, cuya función enzimática es transferir ubiquitina-conjugada al sustrato promoviendo su degradación en el proteosoma (Zeng *et al.*, 2005). Las proteínas reclutadas del grupo Src, de la familia de las cinasas, están relacionadas con diferentes funciones biológicas, incluyendo sobrevivencia, proliferación, diferenciación y movilidad (Roskoski, 2004). En el caso de las proteínas Shp1 y Shp 2, dos proteínas reclutadas tipo

fosfatasa fosfotirosil citosólicas regulan negativamente la señalización de los factores de crecimiento y varían según el tipo de célula donde se expresan. Ambas Shp actúan desfosforilando al receptor directamente o inhibiendo las señales de *c-kit* indirectamente al desfosforilar a otros receptores asociados (KozBajoski *et al.*, 1998). Las vías de señalización más importantes se observan en la figura 3. Entre las vías de señalización asociadas a los receptores KIT y PDGFR α están:

- Vía fosfoinositol 3 -cinasa (PI3K) que ha sido relacionada a la síntesis de ADN, supervivencia celular, ensamblaje de actinas y membranas, quimiotaxis y tráfico vesicular (Vosseller *et al.*, 1997). En células hematopoyéticas progenitoras, Wandzioch (2004), encontró que la vía MAPK es dependiente de la activación de PI3K, estableciendo que la actividad de PI3K es requerida para la viabilidad y proliferación de éstas células.
- Vía Janus Cinasas JAK-STAT, regula la expresión de los genes y su actividad transcripcional (Steelman *et al.*, 2004).
- Vía Ras-Erk, su acción es responsable de la división celular y la supervivencia (Steelman *et al.*, 2004). La activación de Erk 1/2 en células hematopoyéticas es importante para su diferenciación (Uchida *et al.*, 2001).
- Vía SFK, las proteínas SFK están asociadas a un amplio rango de funciones celulares que incluyen progresión del ciclo celular, quimiotaxis, adhesión, supervivencia y tráfico de proteínas (Thomas & Brugge, 1997).
- Vía de la Fosfolipasa C γ (PLC γ), induce en presencia del ligando SCF la proliferación y supervivencia celular. Esta vía tiene relación con la descarga de Ca²⁺ a la célula, y bajo la acción del ligando SCF induce protección en contra de la apoptosis cuando se

irradia la célula o bajo la acción de un agente citotóxico como el daunorubicina (Carpino *et al.*, 1997; Plo *et al.*, 2001).

e. *c-kit*: expresión y mutaciones

La expresión del *c-kit* es observada en diferentes tipos celulares: mastocitos, células madres hematopoyéticas, células madres progenitoras, en las células intersticiales de Cajal (ICC) del tracto gastrointestinal, melanocitos coroidales, células germinales y neuronas (Heinrich *et al.*, 2002a; Miettinen & Lasota, 2005). Una expresión inapropiada del gen o una activación/desactivación ineficiente están asociadas a una variedad de enfermedades hasta ahora estudiadas en mamíferos superiores (Tabla 2).

Un mecanismo que conlleva a una activación inapropiada del KIT es la irregularidad en la secreción autocrina del ligando SCF, ocasionando la aparición de carcinomas de células pequeñas del pulmón (SCLC), carcinoma colorectal, carcinoma de mama, tumores ginecológicos y neuroblastomas (Heinrich *et al.*, 2002a). Los mastocitos y las células hematopoyéticas progenitoras expresan KIT en su superficie, mientras que las células hematopoyéticas más diferenciadas, carecen de la expresión de KIT (Edling, 2006). Sin embargo, ciertas células leucémicas humanas (c.p.e. Leucemia mieloide aguda, AML) y ciertos tumores no-hematopoyéticos, como los tumores del estroma gastrointestinal (GIST) y los seminoma de células germinales, expresan en su superficie celular a KIT (Ikeda *et al.*, 1991; Strohmeyer *et al.*, 1995; Theou *et al.*, 2004).

Tabla No.1. Sitios de fosforilación de las Tirosinas en KIT humano y ratón, nombre de la proteína que el KIT recluta y el posible efecto biológico de dicha interacción:

Sitio de Fosforilación de las Tirosinas (Y)	Proteínas Reclutadas	Efecto Biológico	Referencia
Y567 (ratón)	Lyn, Src, SI, Fyn	Quimiotaxis en células hematopoyéticas primarias y movilización de Ca ²⁺	Ueda <i>et al.</i> , 2002
Y567 (ratón)	SHP2	Regulador negativo de proliferación	KozBajoski <i>et al.</i> , 1998
Y568 (humano)	Src familia de cinasas	Proliferación	Linnekin <i>et al.</i> , 1997; Price <i>et al.</i> , 1997; Roskoski, 2004
Y568 (humano)	APS		Wollberg <i>et al.</i> , 2003
Y568/570 (humano)	Shc, CHK		Price <i>et al.</i> , 1997
Y569 (ratón)	SHP1	Regulador negativo de proliferación	KozBajoski <i>et al.</i> , 1998
Y703 (humano)	Grb2		Thommes <i>et al.</i> , 1999
Y719 (ratón) Y721 (humano)	P85 (subunidad de PI3K)	Adhesión, supervivencia, proliferación, fertilidad en ratones	Blume-Jensen <i>et al.</i> , 1998; Kissel <i>et al.</i> , 2000; Serve <i>et al.</i> , 1994 y 1995
Y728 (ratón) Y730 (humano)	PLC γ	Proliferación, supervivencia (cuando se une el ligando SCF)	Gommerman <i>et al.</i> , 2000
Y746 (humano)	cPKC	Negativamente regula la activación del receptor	Edling, 2006
Y821 (ratón)	----	Proliferación y supervivencia	Serve <i>et al.</i> , 1995
Y823 (humano)	Loop de activación	----	
Y900 (humano)	P85 (PI3K), Crk Fosforilación por Src	Proliferación	Lennartsson <i>et al.</i> 2003
Y936 (humano)	Grb2/7, APS, Cbl		Thommes <i>et al.</i> , 1999; Wollberg <i>et al.</i> 2003

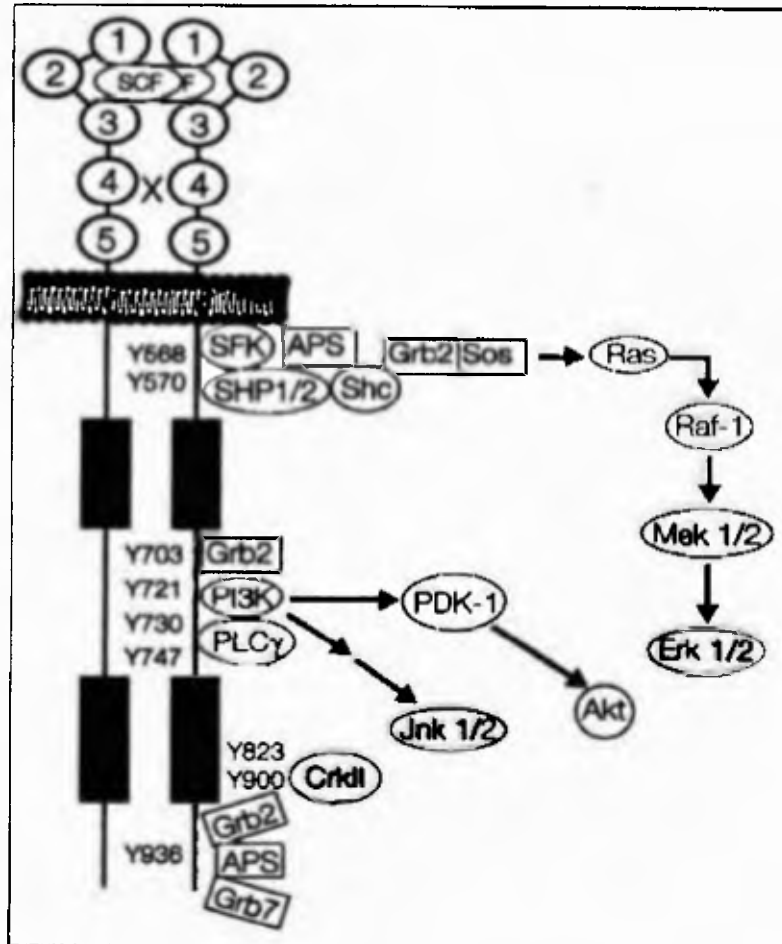


Figura 3. Esquema simplificado que muestra las vías de transducción de señales activadas al fosforilar los diferentes residuos de Tirosina (Y) encontrados en los receptores tirosina cinasa tipo III (Lennartsson *et al.*, 2005).

Tabla No. 2. Mutaciones en el gen *c-kit* más frecuentemente asociadas a enfermedades.

Mutaciones	Enfermedad Asociada	Células afectadas	Referencia
D816V	Mastocitosis con desorden hematológico asociado	Sangre periférica, linfocitos	Nagata (2005)
D816V	Mastocitosis agresiva	Mastocitos de piel y riñón	Nagata <i>et al.</i> , 1995, Longley <i>et al.</i> , 1996
D816Y	Leucemia aguda no-linfocítica-M2 con mastocitos involucrados	Blastocitos	Ashman, 1999, Ning, 2001
D816H	Tumores de células germinales	Células germinales	Tian, 1999
D820G	Enfermedad sistémica agresiva de mastocitos	Blastocitos	Nagata <i>et al.</i> , 1995, Longley <i>et al.</i> , 1996
D816V+V560G	Leucemia humana de mastocitos, Human mast cell line HMC-1	Mastocitos	Furitsu, 1993
E561	Linfomas Sinonasal de células T	Células T	Hongyo, 2000
D52N	Enfermedad mieloproliferativa (aún sin explicación)	Células madres mieloides	Nakata, 1995 Kimura, 1997
A533N	mastocitosis cutánea difusa	mastocitos	Tang, 2004
V559A	Tumores del Estroma Gastrointestinal	Células intersticiales de Cajal	Hirota, 2002, 1998

D=Acido Aspartico, V=Valina, Y=Tirosina, H=Histidina, G=Glicina, E=ácido Glutámico,

N=Asparagina

Los melanocitos cutáneos y coroidales también expresan KIT en su superficie, sin embargo, se ha observado que un 70% de los melanomas cutáneos no expresan niveles detectables de KIT (Easty & Bennett, 2000). Como la ausencia en expresión de KIT se correlaciona con el potencial de metástasis en melanomas, ciertos estudios demostraron que una expresión positiva de KIT en líneas de células con melanoma inducía la apoptosis más no la proliferación de melanocitos (Huang *et al.*, 1996). La pérdida en expresión de KIT, en ciertos melanomas, sugiere que las células malignas escapan de la apoptosis mediada por KIT, permitiendo al tumor crecer y generar metástasis (Gutman *et al.*, 1994). Por consiguiente, una ganancia-en-función o pérdida-en-función de esta proteína, está relacionada con los tejidos en los cuales ésta se expresa.

En ratones se ha observado que las anomalías debida a una pérdida/ganancia-en-función del gen *c-kit* sería la reducción en los mastocitos, y en las células intersticiales de Cajal, severa anemia debido a daños en la eritropoyésis, piebaldismo y esterilidad en hembras y machos (Kitamura *et al.*, 1978; Russell, 1979; Maeda *et al.*, 1992; Cable, 1992; Huilzinga *et al.*, 1995). El piebaldismo, por ejemplo, es un desorden hereditario autosómico dominante caracterizado por leucodermia congénita. En un 75% de los pacientes esta condición está asociado a mutaciones que ocasionan pérdida-en-función del *c-kit* y en menor proporción se debe a mutaciones en el ligando del factor de células madres (SCF) y/o el gen para el factor de transcripción (SLUG) (Ezoe *et al.*, 1995). Deleciones enteras o parciales del gen *c-kit* (Ezoe *et al.*, 1995), deleciones en los genes tanto en *c-kit* como en *pdgfra* (Fleischman *et al.*, 1991; Spritz *et al.*, 1992), y deleciones del gen SLUG han sido asociados a piebaldismo en humanos. Los pacientes con

piebaldismo presentan mutaciones en el exón 3 del gen *c-kit*, con sustituciones y deleciones, sustituciones en los exones 6, 13 y 17; en el intrón 3 se observa una sustitución que afecta al sitio de ajuste de los exones 2 y 3 (Murakami *et al.*, 2005).

La ganancia-en-función del gen *c-kit* se debe a mutaciones que pueden variar desde mutaciones puntuales con sentido y sin sentido, deleciones y duplicaciones. Estas mutaciones tienen un potencial oncogénico fuerte si consideramos su función para la señalización intracelular. En base a estas funciones, Longley *et al.* (2001) clasificaron a las mutaciones activadoras del KIT en reguladoras o enzimáticas. Dentro de las mutaciones puntuales los residuos de valina 560, en el dominio de la juxtamembrana, y asparagina 816, en el dominio cinasa, son las que ocurren más frecuentemente. Los mutantes del *c-kit* activados presentan fosforilación constitutiva de la tirosina activando las vías de señalización independientemente del anclaje del ligando.

Las mutaciones encontradas en la juxtamembrana son reguladoras debido a su función en la dimerización y activación del receptor, mientras que las mutaciones en los dominios cinasa, son enzimáticas debido a su función de fosforilación. Las mutaciones enzimáticas están asociadas con mastocitosis, leucemia mieloide aguda y tumores de células germinales (Nagata *et al.*, 1995, Longley *et al.*, 1996; Ashman *et al.*, 1999; Ning *et al.*, 2001; Tian *et al.*, 1999). Las mutaciones de la región reguladora son frecuentemente asociadas a tumores del estroma gastrointestinal (GIST) (Duensing *et al.*, 2004). Las mutaciones en la región reguladora y enzimática también han sido identificadas en receptores tirosina cinasas relacionados al KIT, como el Flt3 (mutaciones con repeticiones

internas en tandem en la juxtamembrana de pacientes con Leucemia Mielode Aguda o AML), c-Met (mutaciones sin sentido, o inserciones en la juxtamembrana en pacientes con Cáncer de Células Pequeñas de Pulmón o SCLC) (Reilly, 2003; Ma *et al.*, 2003).

La activación constitutiva del *c-kit* esta asociada a neoplasias en Mastocitos, tumores del Estroma Gastrointestinal (GIST), tumores de células germinales y algunas leucemias. Recientemente, se ha observado una expresión aberrante del *c-kit* en carcinomas de pulmón (Miettinen & Lasota, 2005). El estudio de las mutaciones en los genes de los receptores tirosina cinasa en humanos, ha demostrado que esta proteína es esencial para la hematopoyésis, melanogénesis, gametogénesis, crecimiento de mastocitos y en la diferenciación y desarrollo de las células intersticiales de Cajal (Loveland & Schlatt, 1997; Tian *et al.*, 1999). Existe una base de datos de mutaciones de genes en humanos designada como Human Gene Mutation Database del Instituto de Genética Médica de Cardiff (www.hgmd.ct.ac.uk). En esta base de datos se describen las diferentes mutaciones puntuales, inserciones, deleciones y las mutaciones por ajuste que se dan en los genes *c-kit* y *pdgfra*, asociados a los diferentes tipos de tumores.

3. GIST: GENERALIDADES

Los GIST son un cáncer relativamente raro, sin embargo, son los tumores mesenquimales primarios más comunes del tracto digestivo, con una incidencia cercana a 20/1 000 000 por año (Kindblom *et al.*, 1998; Miettinen *et al.*, 2001). Su naturaleza es difícil de predecir, algunos pueden ser tumores benignos y otros malignos. Entre los factores de pronóstico, que más ayudan a predecir la evolución del tumor son el tamaño y el índice de

divisiones mitóticas. En base a estos parámetros, se ha propuesto una clasificación de riesgo (Tabla 3; Fletcher *et al.*, 2002; Miettinen *et al.*, 2005 a, b).

Los GIST fueron inicialmente clasificados como tumores de músculo liso (leiomioma, leiomioblastoma o leiomiosarcoma) hasta que la microscopía electrónica y los análisis inmuno-histoquímicos mostraran que solo una fracción pequeña de éstos mostraban una diferenciación de músculo liso (Miettinen *et al.*, 2001; Fletcher *et al.* 2002). Esta clasificación errónea permitió por muchos años estadísticas irreales de GIST. A finales de la década de los 90, se demostró que los GIST compartían características morfológicas, inmuno-histoquímicas y genéticas con las células intersticiales de Cajal (ICC), que son las células marcapaso del esófago-tracto gastrointestinal (Kindblom *et al.*, 1998; Sircar *et al.*, 1999).

La mayoría de los GIST expresan la oncoproteína tirosina cinasa KIT, la cual también se utiliza como marcador inmunohistoquímico de las células intersticiales de Cajal (Hirota *et al.*, 1998). La expresión de KIT es fuerte y tan específica que actualmente se utiliza como diagnóstico, aunque hay una pequeña fracción (5-10%) de las células del tumor que son KIT negativo (Corless *et al.*, 2004; Medeiros *et al.*, 2004).

Tabla No.3. Estimación del grado de riesgo de un GIST en base a su tamaño y tasa mitótica según (a) Fletcher y (b) Miettinen.

a)

Riesgo	Tamaño	Conteo Mitótico (por 50 HPF)
Muy bajo	< 2 cm	< 5
Bajo	2-5 cm	< 5
Intermedio	< 5 cm	6-10
Alto	5-10 cm	< 5
	> 5 cm	> 5
	> 10 cm	cualquiera
	cualquiera	> 10

b)

Parámetros del Tumor		Caracterización del Riesgo de Metástasis			
Tamaño	Conteo Mitótico	Estómago	Duodenum	Jejunum / Ileum	Rectum
≤ 2 cm	≤ 5 per 50 HPFs	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno
> 2 ≤ 5 cm		Muy bajo	Bajo	Bajo	Bajo
> 5 ≤ 10 cm		Bajo	Alto	Moderado	Alto
> 10 cm		Moderado		Alto	
≤ 2 cm	> 5 per 50 HPF	*	*	*	Alto
> 2, ≤ 5 cm		Moderado	Alto	Alto	Alto
> 5 ≤ 10 cm		Alto	Bajo	Alto	Alto
> 10 cm		Alto		Alto	

HPF: High Power Field (campo en alto poder); * significa muy pocos casos

4. GIST Y MUTACIONES EN RECEPTORES TIROSINA CINASA

Los GIST presentan mutaciones oncogénicas en los genes *c-kit* y *pdgfra*. La activación constitutiva de KIT es uno de los primeros eventos de transformación en GIST y ocurre principalmente por mutaciones activadas en el gen *c-kit* (Duensing *et al.*, 2004, Hirota *et al.*, 2000a, Hirota *et al.*, 2001). La mayoría de las mutaciones del *c-kit* están dentro de la región de la juxtamembrana (codificada por el exón 11). Sin embargo, un menor número de mutaciones se ha encontrado en la región extracelular del KIT (exón 9), en la región que divide a los dominios cinasas intracelulares (exón 13), o en los lazos de activación catalítica en el segundo dominio cinasa (exón 17) (Figura 4) (Moskaluk *et al.*, 1999; Hirota *et al.*, 1998; Lasota *et al.*, 1999; Taniguchi *et al.*, 1999; Lux, 2000; Hirota *et al.*, 2001; Miettinen and Lasota, 2005). Las mutaciones en el gen *Pdgfra* se observan en un 7-12% de los casos, ocurriendo más frecuentemente en el exón 18 (asa de activación) y raramente en el exón 12 (dominio de la juxtamembrana) y exón 14 (primer dominio cinasa) (Sihto *et al.*, 2005; Heinrich, 2002b). En la tabla 4 se resume las mutaciones más frecuentemente encontradas en estos receptores cinasas asociados a GIST (Heinrich, 2006).

La actividad cinasa del *c-kit* está estrechamente regulada a través de todo el ciclo de señalización. El anclaje de la proteína tirosina fosfatasa SHP-1 a la región de la juxtamembrana fosforilada del *c-kit* resulta en la defosforilación de los residuos de tirosina y en la terminación de las señales intracelulares (Mol *et al.*, 2003). El doble rol de la región juxtamembranosa como dominio autoinhibitorio cuando no está fosforilado, y como dominio iniciador de señales intracelulares al cuando se fosforila, ha hecho difícil

poder disectar las funciones estructurales y mecánicas de esta región en la cascada de señalización. Heinrich *et al.* (2003), demostraron que GIST con mutaciones en *c-kit* o *pdgfra* no difieren en su potencial para activar las vías de señalización como Akt, STAT1, STAT3 y Erk 1/2.

Mutaciones en sitios específicos del dominio juxtamembranal del *c-kit* y del factor de crecimiento derivado de plaquetas (*pdgfra*) indican que varios residuos son necesarios para mantener el estado autoinhibido de la cinasa (Mol *et al.*, 2004). Las mutaciones que causan la activación constitutiva de la cinasa del *c-kit* en ausencia de un factor de células madres (ligando) esta relacionado con la formación de cánceres altamente malignos también observados en tumores de células germinales, leucemias mieloides y en mastocitosis (Nagata *et al.*, 1995; Longley *et al.*, 1996; Lasota *et al.*, 1999; Taniguchi *et al.*, 1999; Hou *et al.*, 2004; Zimpfer *et al.*, 2004).

5. MUTACIONES EN GIST Y EFICIENCIA DE LAS DROGAS

Estudios recientes han revelado un efecto anti-tumor del medicamento STI-571 (Imatinib) que interrumpe la acción de la tirosina cinasa (Mol *et al.*, 2004). Varios estudios clínicos señalan que la respuesta a Imatinib varía dependiendo de la región (exón) y el tipo de mutación que se presenta en el gen *c-kit* (Dagher *et al.*, 2002; Zimpfer *et al.*, 2004; Miettinen *et al.*, 2005; Tam *et al.*, 2005). Las mutaciones en el exón 11, por ejemplo, son más sensibles a la droga Imatinib, porque la droga compite por el sitio de inactivación de la tirosina 568; mientras que, la mutación en el exón 9 de KIT es resistente *in vitro* (Corless *et al.*, 2004; Mol *et al.*, 2004).

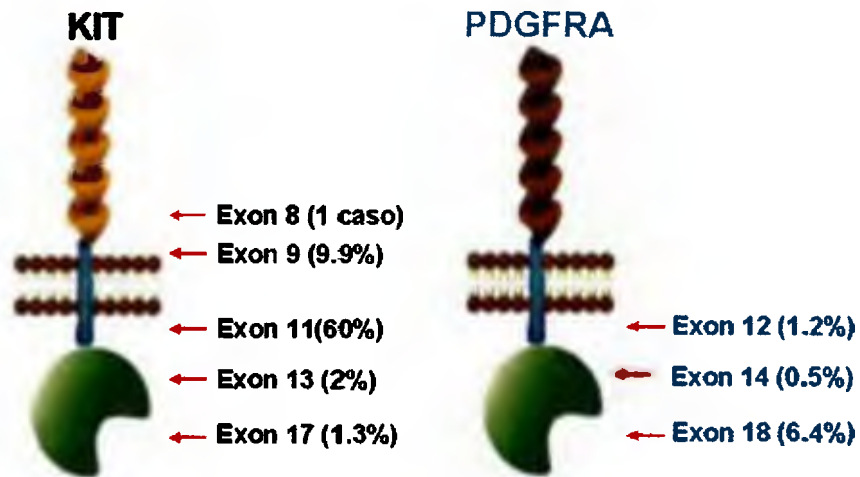


Figura 4. Frecuencia de mutaciones encontradas en los exones de *c-kit* y *pdgfra* que codifican para los receptores tirosina cinasa relacionados con GIST. Datos obtenidos a partir de 1,581 casos. Un 18.6% de los casos con GIST no presentaron mutación. (Según datos de los laboratorios de Corless y Henrich hasta el 2008 y presentados en conferencia GIST Tour 2008 organizado por Novartis Oncology).

Tabla No. 4. Resumen de las mutaciones más frecuentes del *c-kit* y *pdgfra* encontradas en GIST no-hereditario (esporádico).

Gen	Exón	Frecuencia (%)	Codones con Mutación
<i>c-kit</i>	11	20-60	Delección-inserción 550-561 Mutación puntual 557, 559, 560, 576 Duplicaciones internas en tandem (repeticiones) (3' final) después de 570
	9	10-15	Duplicación-Inserción 501-502
	13	<5	Mutación puntual 642
	17	Raros <1	Mutación puntual 820
<i>pdgfra</i>	12	<1	Mutación Puntual 561 Delección-inserción 560-571 Inserción 582-586
	14	<0,5	Mutación puntual 659
	18	2-3	Mutación puntual en 842 Delección-sustitución 842-847

Actualmente, algunos pacientes con GIST después de cinco años en el uso de la droga muestran resistencia; algunos estudios indican que la resistencia esta asociada a mutaciones secundarias (Figura 5) (Heinrich *et al.*, 2006; Tamborine *et al.*, 2005). Esta hipótesis ha sido determinada en pacientes con leucemia quienes presentan una segunda mutación en el dominio ABL del oncogen BCR-ABL (Corless *et al.*, 2004). Dos tipos de resistencia se han identificado en pacientes con GIST: (1) resistencia primaria, donde se evidencia la progresión de la enfermedad en los primeros 6 meses de tratamiento, frecuentemente asociada con la proteína KIT tipo salvaje, o con mutación en el exón 9 de *c-kit*, o con la mutación D842V en *pdgfra*; (2) resistencia secundaria, donde hay progresión de la enfermedad después de 6 meses de tratamiento. Esto puede ser debido probablemente a una segunda mutación en cualquiera de los dos genes, a una sobre-expresión de las proteínas, o a activación constitutiva de otro receptor cinasa (Corless *et al.*, 2004). Heinrich *et al.* (2006) determinó la correlación entre las mutaciones y la resistencia al Imatinib (Gleevec) en pacientes con GIST.

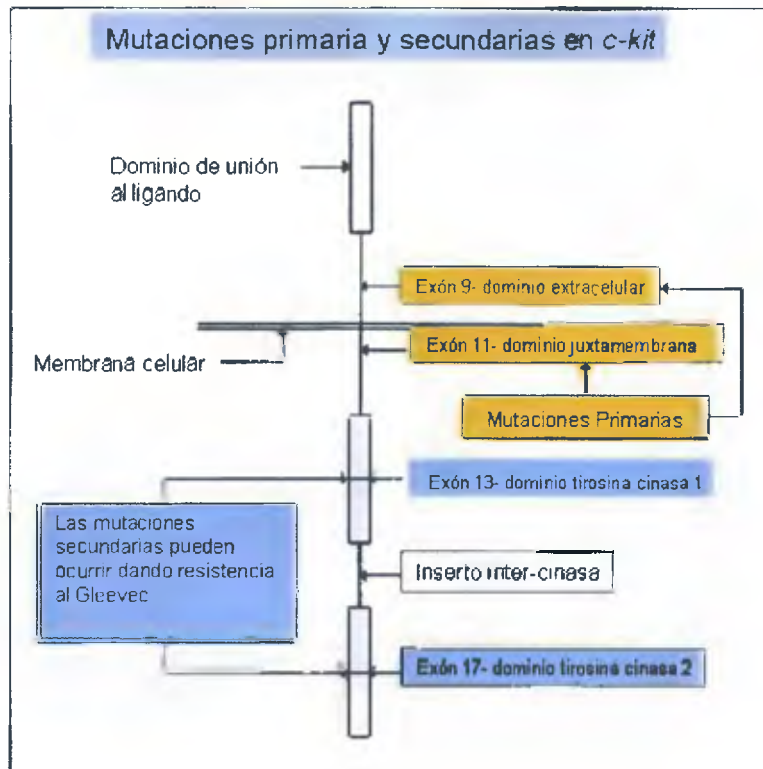


Figura 5. Exones con mutaciones primarias y secundarias en c-kit. Se observan las mutaciones primarias más frecuentemente observados (exones 9 y 11) en pacientes que al tiempo de iniciado el tratamiento con Gleevec (Imatinib) desarrollan mutaciones secundarias (exones 13 y 17) que confiere resistencia al tratamiento. Sunitinib es una opción en casos con resistencia (Heinrich *et al.*, 2006).

METODOLOGÍA

Selección de las Muestras

La revisión de 45 casos clínicos (1980-2006) con tumores del sistema gastrointestinal y la selección de los tejidos para este estudio fue realizado por el Dr. Carlos Singh, patólogo del Instituto Oncológico Nacional, como parte de un proyecto de investigación que en conjunto se desarrolla con el Instituto Conmemorativo Gorgas. El diagnóstico de estos tumores fue realizado por el Dr. Singh basándose en los criterios morfológicos (microscópicos) establecidos en la clasificación de tumores de tejidos blandos según la Organización Mundial de la Salud (2002) y confirmados con los estudios inmunohistoquímicos utilizando los marcadores CD117, CD34, Proteína S-100 alfa-actina y Desmina. Los tejidos de la primera resección del tumor realizada a los pacientes fueron preservados en formalina amortiguada y procesadas en parafina según procedimientos estandarizados en el Instituto Oncológico. Se seleccionaron 40 bloques porque presentaban poca necrosis y hemorragia, donde el tejido ocupaba la mayor área del bloque, y que presentaran tejido sano y tejido con células tumorales. Los tejidos en bloques de parafina seleccionados fueron codificados para salvaguardar la confidencialidad de los pacientes.

Extracción de Ácidos Nucléicos

Los tejidos preservados en bloques de parafina se cortaron con un bisturí y se colocaron de 5-10 mg en un microtubo de 1,5 ml libre de DNasas y RNasas. Se utilizaron bisturís nuevos para cada muestra, los cuales fueron limpiados con etanol al 70% antes de su uso. Cada tejido fue desparafinado en 1 ml de Xilol e incubados a 55 °C con agitación de 200 rpm por 1 hora. Posteriormente, la muestra fue centrifugada a 14000 rpm por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se repitió el proceso con Xilol. Se realizaron 3 lavados con etanol al 100%. Se dejó secar el pellet de células y se agregó la solución amortiguadora de lisis celular (100mM NaCl/10mM Tris-HCl/25mM EDTA/5% SDS) con proteinasa K (concentración final de 0,3-0,5 mg/ml). Los tejidos se maceraron con un pistilo (libre de DNasas y RNasas) y se incubaron toda la noche a 55 °C con agitación a 200 rpm. El ADN fue separado con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (PCI 25:24:1) según método estándar (Ausubel *et al.*, 2002). Se dejó secar el pellet de ADN y se resuspendió en 50 µl de agua grado molecular, rehidratándolos a 55 °C por 1 hora. La calidad del ADN obtenido fue evaluado mediante electroforesis en agarosa al 1% en amortiguador Tris-Borato-EDTA (TBE) teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/ml). Una vez evaluada la calidad del ADN se procedió a almacenarlo a -20 °C.

Amplificación del ADN

Los exones 11, 9, 17 y 13 del gen *c-kit* y 18, 12, 14 y 10 del *pdgfra* fueron amplificados mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La amplificación de cada exón se realizó utilizando cebadores específicos previamente reportados por Yamamoto *et al.* (2004) (Tabla No. 5). Debido a que el ADN extraído de tejidos fijados en formalina está

fragmentado, la dilución del ADN (1:10, 1:50 y 1:100) de cada muestra se hizo para estimar la integridad del ADN utilizando el gen de la β -Actina (300 pb) con protocolos estandarizados en el Departamento de Genómica y Proteómica del Instituto Gorgas. Posteriormente, se utilizó éste gen como control positivo de amplificación. La amplificación de los exones de *c-kit* y *pdgfra* se realizó con la dilución estimada con la β -Actina. El volumen final de la reacción de PCR fue de 25 μ l y contenía 200 μ M de cada dinucleótido, 2.0 mM MgCl₂, 0.6 unidades/ μ l DNA polimerasa, 1 μ M de cada cebador y 5 μ l de ADN diluido utilizando el reactivo PCR Master Mix (Promega Corp.). Se verificó la temperatura óptima de anidamiento de los cebadores a través de un PCR gradiente (Eppendorf). Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial de 3 minutos a 95 °C, 35 ciclos a 95 °C por 45 segundos, 50-56 °C (dependiendo del exón, ver tabla No.5) por 45 segundos y 72 °C por 45 segundos, extensión final a 72 °C por 5 minutos. Los fragmentos amplificados fueron evaluados mediante electroforesis en agarosa al 2% con 0.5X de amortiguador Tris-Borato-EDTA (TBE) teñido con bromuro de etidio (0.5 μ g/ml). Los geles fueron corridos a voltaje constante de 80V por 1 hora y con una escalera de peso molecular de 100pb (100bp-DNA Ladder, Promega Corp.). Los fragmentos del tamaño esperado, fueron recuperados del gel y purificados utilizando la enzima Agar-Ace (Promega Corp.) según protocolo del fabricante.

Tabla No. 5. Secuencias y tiempo de anidamiento de los cebadores utilizados.

Gen c-htt

EXÓN	SECUENCIA	Ta	AMPLICÓN ESPERADO (pb)
9F: 9R:	5' TTT GGA AAG CTA GTG GTT CA 3' 5' ATG GTA GAC AGA GCC TAA AC 3'	55°C	190
11F: 11R:	5' CTA TTT TTC CCT TTC TCC CC 3' 5' TAC CCA AAA AGG TGA CAT GG 3'	56°C	200
13F: 13R:	5' GCT TGA CAT CAG TTT GCC AG 3' 5' AAA GGC AGC TTG GAC ACG GCT TTA 3'	60°C	190
17F: 17R:	5' TTT CTC CTC CAA CCT AAT AG 3' 5' CCT TTG CAG GAC TGT CAA GC 3'	56°C	180

Gen pdgfra

EXÓN	SECUENCIA	Ta	AMPLICÓN ESPERADO (pb)
10R 10L	5' AGA TGG TTT GAG AGA TGG TAC TGC 3' 5' GGA CAC AGT AGA GTC CAA CAA CGT 3'	54°C	400
12F 12R	5' TCC AGT CACT GTC GCT GCT TC 3' 5' GCA AGG GAA AAG GGA GTC TT 3'	56°C	250
14R 14L	5' CTC ACT CTC ATT CAA ACC TAT CAG C 3' 5' TCA TAC CCA TCT CCT AAC GGC 3'	54°C	450
18F 18R	5' ACC.ATG GAT CAG CCA GTC TT 3' 5' TGA AGG AGG ATG AGC CTG ACC 3'	50°C	250

Ta, temperatura de anidamiento del cebador.

Secuenciación

Los fragmentos purificados fueron cuantificados mediante electroforesis de agarosa utilizando una escalera de masa molecular (Quanti-Ladder QL200, Origene). Los fragmentos en concentración de 5-20 ng/ μ l fueron secuenciados por la técnica de PCR-secuenciación utilizando la química de BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) y los cebadores exón-específico. Posteriormente fueron purificados con precipitación de EDTA/EtOH según protocolo del fabricante. Los productos de la reacción de secuenciación fueron separados mediante electroforesis capilar en un Analizador Genético ABI Prism 310 (Applied Biosystems).

Determinación de las Mutaciones

Las secuencias de ADN obtenidas del ABI 310 fueron editadas usando el programa Sequencher (GeneCodes, Corp.). Luego las secuencias de cada muestra fueron alineadas en el programa MacClade (Sinauer Associates, Inc.) con la secuencia de referencia no mutada de los genes *c-kit* y *pdgfra* obtenidas de bases de datos en Internet (GenBank). Se utilizó la matriz con las secuencias alineadas a la secuencia de referencia para cada exón para caracterizar el número del codón y el tipo de mutación presente. La descripción de las mutaciones encontradas en cada muestra se hizo considerando la nomenclatura establecida (den Dunnen & Antonarakis, 2001).

Clonación

Los cromatogramas de las secuencias directas del producto de PCR que mostraron tanto mutaciones claramente identificables como mutaciones difíciles de interpretar fueron

clonadas y posteriormente secuenciadas con el objeto de identificar la posible mutación. Los productos purificados del PCR se ligaron al vector de clonación pGEM (Figura 6) y se introdujeron en la cepa JM109 siguiendo el protocolo del fabricante (pGem-T-easy Cloning kit, Promega). La identificación de la colonia con el vector recombinante se hizo seleccionando colonias blancas de un plato de agar selectivo conteniendo IPTG (0.5 mM), X-Gal (80 µg/µl) y ampicilina (100 µg/µl). Se seleccionaron 10 colonias blancas por plato, y se crecieron en 5 ml de caldo LB con ampicilina (100 µg/µl) a 37 °C toda la noche. Se verificó el inserto por PCR utilizando los cebadores específicos. Se utilizó para esta PCR una dilución 1:50 del cultivo en nH₂O; el cual fue previamente calentado a 95 °C por 5 min. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial de 3 minutos a 95 °C, 28 ciclos a 95 °C por 30 segundos, 50-56 °C (dependiendo del exón) por 30 segundos y 72 °C por 30 segundos, extensión final a 72 °C por 5 minutos. El producto de la PCR se visualizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% como se describió previamente. Los clones seleccionados mostraron una sola banda en el rango de tamaño esperado. Se hizo la extracción del ADN del plásmido utilizando el Kit Wizard Plus SV Minipreps (Promega, corp.) según el protocolo del fabricante. Los plásmidos purificados fueron secuenciados con el cebador en sentido contrario M13 (5' AACAGCTATGACCA TG 3') que anidan en el vector cercano al punto de inserción del inserto. La evaluación de mutaciones en estas secuencias se realizó como se ha descrito anteriormente en este documento.

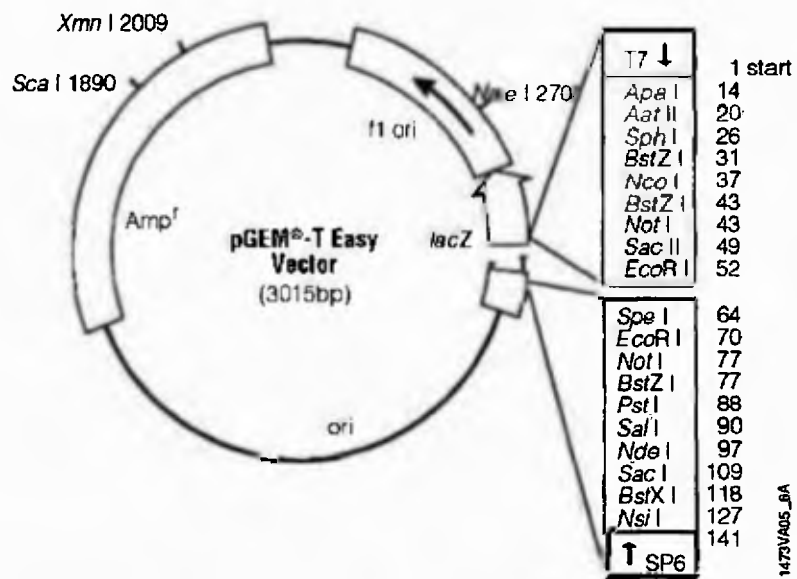


Figura 6. Vector de clonación pGEM-T-easy (Promega) mostrando el punto de inserción TA (Timina-Adenina) que permite ligar el producto de PCR.

RESULTADOS

Amplificación de exones

Se logró la amplificación del exón 11 del gen *c-kit* en 41 de los 44 tejidos, de los cuales 27 presentaron mutaciones en ese exón. Debido a que se reportaron que las mutaciones en los genes *c-kit* y *pdgfra* asociados a GIST son mutuamente excluyentes (Medeiros *et al.*, 2004) se procedió a amplificar el exón 9 en las 14 muestras restantes, lográndose la amplificación exitosa de éstas 14 muestras de las cuales 3 presentaron mutaciones en ese exón. Las muestras que no presentaron mutación (11) fueron utilizadas para amplificar los exones 13 y 17. Ninguna de estas muestras amplificadas presentó mutación. Por consiguiente, se procedió a trabajar con los exones 18, 12, 10 y 14 del gen *pdgfra*, de los cuales 7 presentaron mutaciones en el exón 18 únicamente. En solo 2 de las 4 muestras restantes se pudo comprobar la ausencia de mutaciones. Los productos de amplificación con los cebadores específicos del tamaño esperado se observan en la figura 7.

Los productos de la amplificación de los exones de *c-kit* y *pdgfra* presentaban en su mayoría una sola banda, aunque algunos de los productos de los exones 9 y 11 del *c-kit* presentaban dos bandas de amplificación (Figura 8). La muestra T25 por ejemplo, amplificó para el exón 9 una banda de aproximadamente 200 pb y otra de peso molecular ligeramente mayor. En el exón 9, las muestras con estas características fueron T13, T21 y T25. Mientras que en el exón 11 se observó 2 ó 3 productos de amplificación para las muestras T02, T08, T10, T14, T18, T20, T23, T26, T30, T39 y T44. En los exones del

pdgfra no se observaron dobles bandas. Las amplificaciones realizadas a los clones aislados de una muestra mostraron los tamaños de banda correspondientes a lo observado en el producto amplificado (Figura 9).

Secuenciación

Las muestras amplificadas para el exón 11 (T24, T28 y T29) mostraron en el cromatograma picos dobles para una misma posición, lo cual sugiere la existencia de 2 nucleótidos diferentes para esa posición (Figura 10). Sin embargo la mayoría de las muestras del *c-kit* (exón 9 y exón 11) y del *pdgfra* (exón 18) presentaron picos dobles en más de una posición a lo largo del fragmento secuenciado. En la figura 11 se puede observar las secuencias con picos dobles para la muestra T21 del exón 9.

Determinación de las mutaciones en los genes *c-kit* y *pdgfra*

Las mutaciones en *c-kit* y *pdgfra* fueron detectadas en 37 de 39 pacientes (95%) (Tabla 6). En general, se determinaron 30 (77%) pacientes con mutaciones en el gen *c-kit* y 7 (18%) mutaciones en el gen *pdgfra*. Solamente 2 casos (5%) se confirmó la ausencia de mutaciones para los exones estudiados (Tabla 7). La mayoría de las mutaciones del gen *c-kit* se encontraron en el exón 11 (27 casos) y en el exón 9 (3 casos). Mientras que en el gen *pdgfra* se observaron 7 casos, todos con mutaciones en el exón 18.

Las mutaciones detectadas en la región codificadora del exón 11 son de diversos tipos. En la figura 12 se observa que 1), la mayoría de estas mutaciones se encuentran en la región 5' del exón; 2), las deleciones se localizan entre los codones 549-579, con un máximo de

15 codones eliminados; 3), las sustituciones se observan a lo largo del exón, aunque en mayor número entre los codones 554-562. Un 59% (16/27) de las muestras que presentaron mutaciones en los residuos de aminoácidos 556-560 se consideraron dentro del grupo de alto riesgo (Figura 12). Las sustituciones simples se observaron específicamente en los codones 557, 559, 560 y 576 (p.W557R, p.V559A, p.V559D, p.V560D, p.L576P); 4), la única duplicación se observó entre los codones 578-579 en el paciente T32. Las características clínico-patológicas que tenían los pacientes al momento de la biopsia al tumor primario se anotaron según el tipo de mutación observada en el exón 11 como sustituciones simples (Tabla 8), deleciones y sustituciones simples (Tabla 9), mixtas con múltiples sustituciones y deleciones (Tabla 10), mutaciones con pérdida de sentido y duplicación (Tabla 11). En el exón 9, la mutación encontrada en los 3 pacientes fue la misma, representada por una inserción de los nucleótidos GCC TAT que resulta en la duplicación de los residuos de aminoácidos A⁵⁰² y Y⁵⁰³ (Figura 13). La tabla 12 muestra las características clínico-patológicas de los pacientes con este tipo de mutación.

Se observaron mutaciones en diversas posiciones del fragmento amplificado con los cebadores utilizados para el exón 18 del gen *pdgfra*. Las secuencias de los clones mostraron cinco muestras con sustituciones, una con sustitución y deleción de tres codones y otra con deleción de 4 codones (Figura 14). Las sustituciones se observaron entre los codones 838-850 y las deleciones se presentaron hacia el extremo 3' del exón. En la tabla 13 se muestran las mutaciones observadas y las características clínico-patológicas de los pacientes con esta condición. En este gen, a nivel de la secuencia de nucleótidos, se observó que de las 11 muestras amplificadas para el exón 18, 9 mostraron secuencias

heterogéneas (con picos dobles). Los clones de dichas muestras presentaban una deleción del nucleótido adenina en el área del intrón 17, a 42 pares de bases del inicio del exón 18. De las 7 muestras con mutaciones en el exón 18 solamente una muestra no se presentó la deleción de adenina en sus clones (muestra T46).

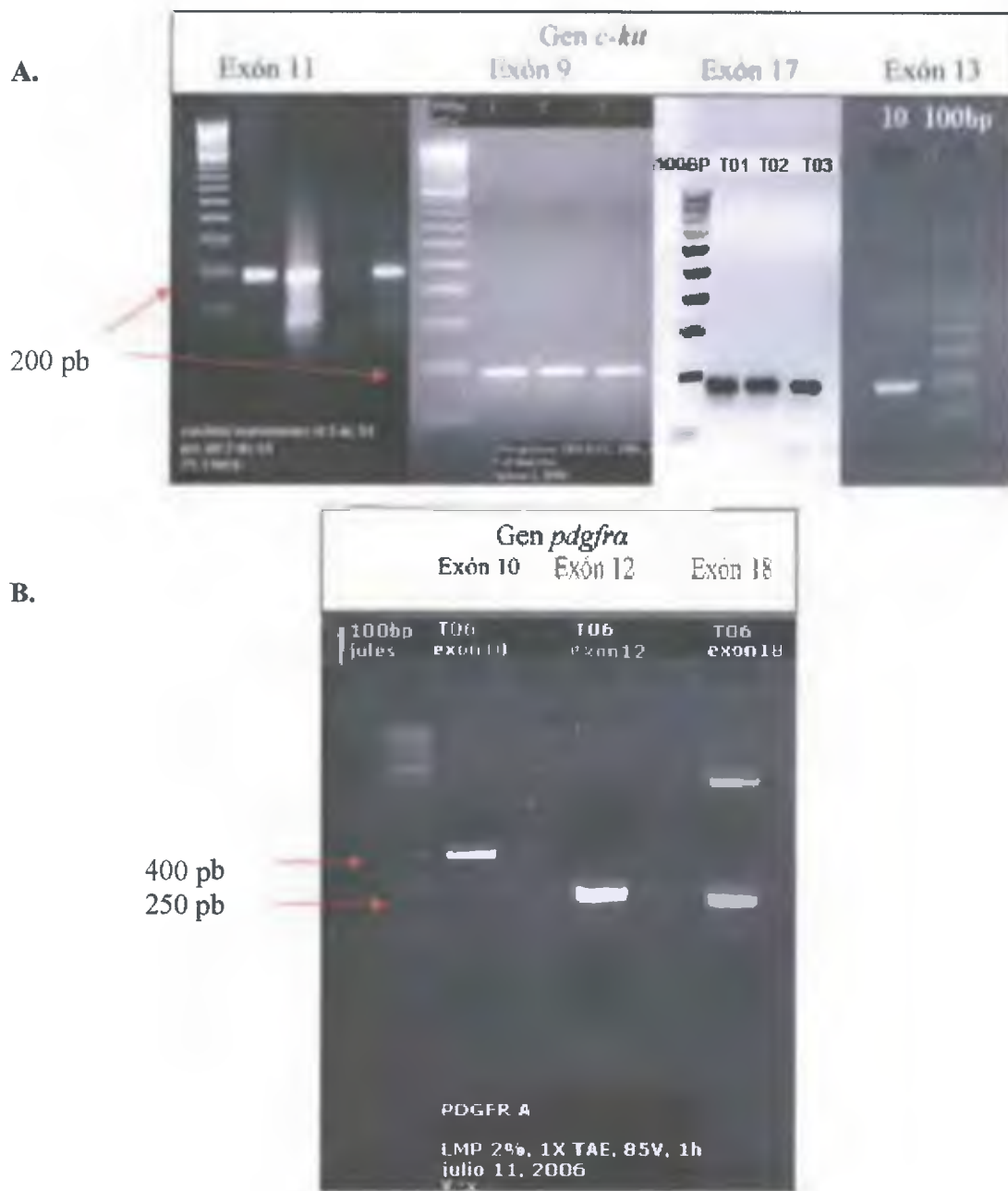


Figura 7. Tamaños de bandas aproximados para cada uno de los exones estudiados de los genes *c-kit* (A) y *pdgfra* (B) con excepción del exón 14. Marcador de peso molecular de incremento en 100 pb.

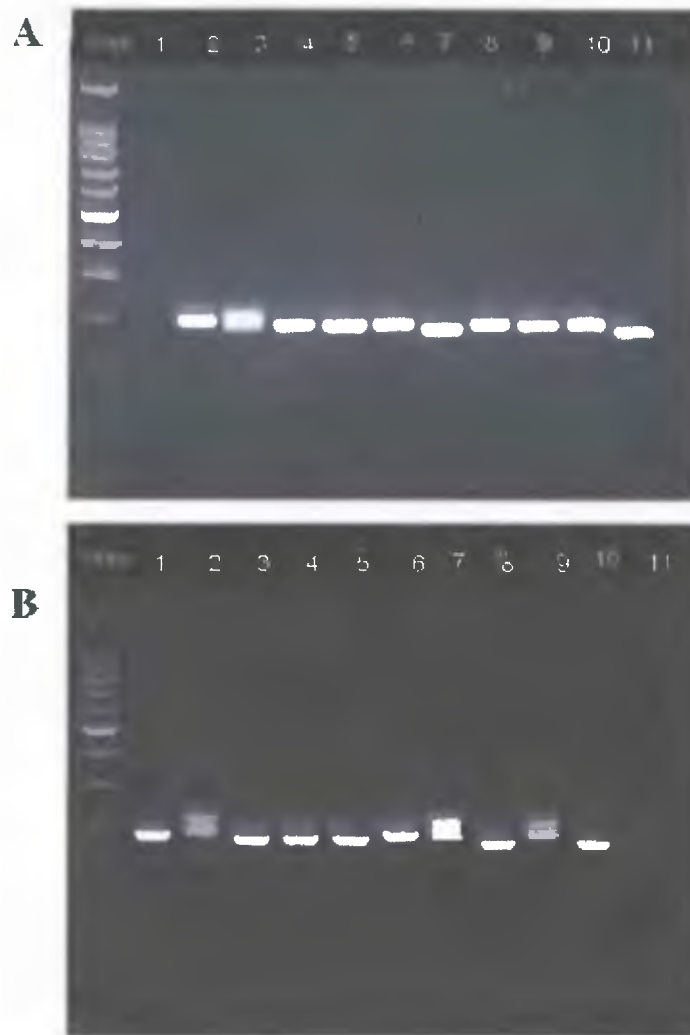


Figura 9. La identificación de clones con inserto se hizo amplificando directamente de la colonia (1:50) con cebadores específicos para cada exón. (A) Los carriles 10 y 11 mostraron una sola banda con tamaños ligeramente diferentes. (B) Los carriles 2, 7 y 9 se observaron dos productos de amplificación. Controles negativos en (A) carril 1 y en (B) carril 11. Marcador de peso molecular de 100 pb (Promega, 100bp DNA Ladder).

T28 exon 11

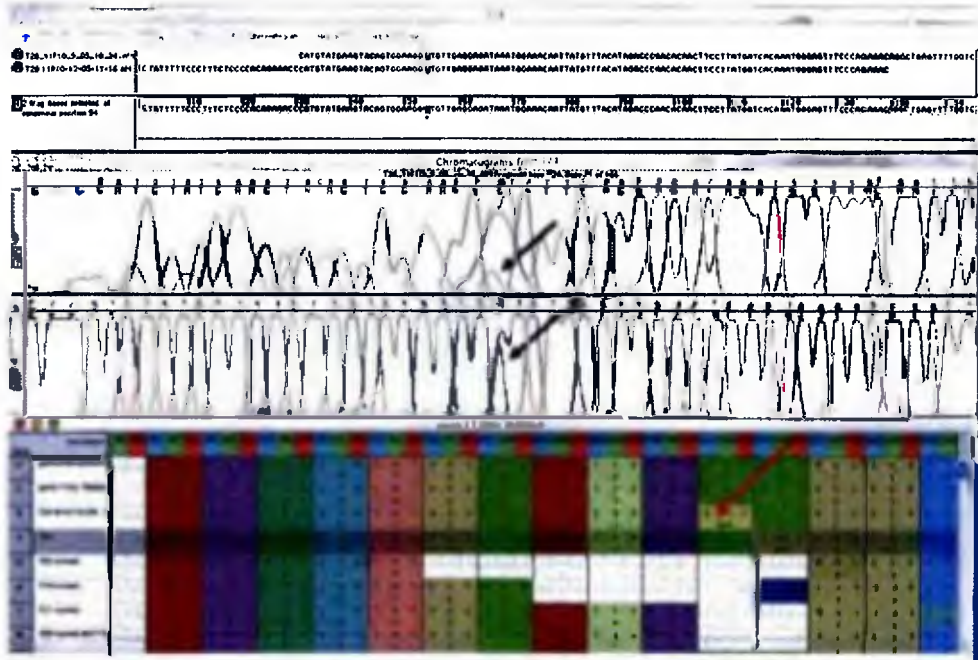


Figura 10. Ventana del Programa Sequencher (arriba) donde muestra los cromatogramas de las secuencias 5'→3' y 3'→5' de la muestra T28 (exón 11) indicándose con la flecha negra dos bases nucleotídicas (Timina y Adenina) para una misma posición que resulta en la sustitución del aminoácido Valina por Ácido Aspártico (flecha roja) según lo muestra el Programa MacClade.

Tabla No. 6. Distribución de las mutaciones en los genes *c-kit* y *pdgfra* encontrados en los tumores de este estudio.

Tipo de Mutación	No. de Pacientes
Gen c-kit	
Exón 11	
Deleciones múltiples	5
Sustituciones	8
Deleciones + sustituciones	11
Duplicaciones + sustituciones	1
Mutaciones con codón de parada (non-sense)+ deleciones	2
Exón 9	
Duplicaciones	3
Exón 13	
	0
Exón 17	
	0
Gen PDGFRa	
Exón 18	
Deleciones	2
Mutaciones en Intron + Sustituciones	5
Exón 12	
	0
Con genes tipo silvestre	
	2

Tabla No. 7. Características clínicas y patológicas de los pacientes que presentaron ambos genes tipo silvestre.

No. de caso	Mutación Observada	Edad	Género	Tamaño del Tumor (cm)	Sitio del Tumor	Tipo de Célula	Mitosis /No.50 **HPF	Seguimiento (meses)	Metástasis: presente (SI/NO) / tiempo (meses) / sitio	Grupo de Riesgo
06	Ninguno	72	F	17	Estómago	Fusiformes	10	33	No	Alto
38	Ninguno	47	F	20	Intestino delgado	Fusiformes	3	10	No	Alto

HPF, high power field (campo de alto poder)

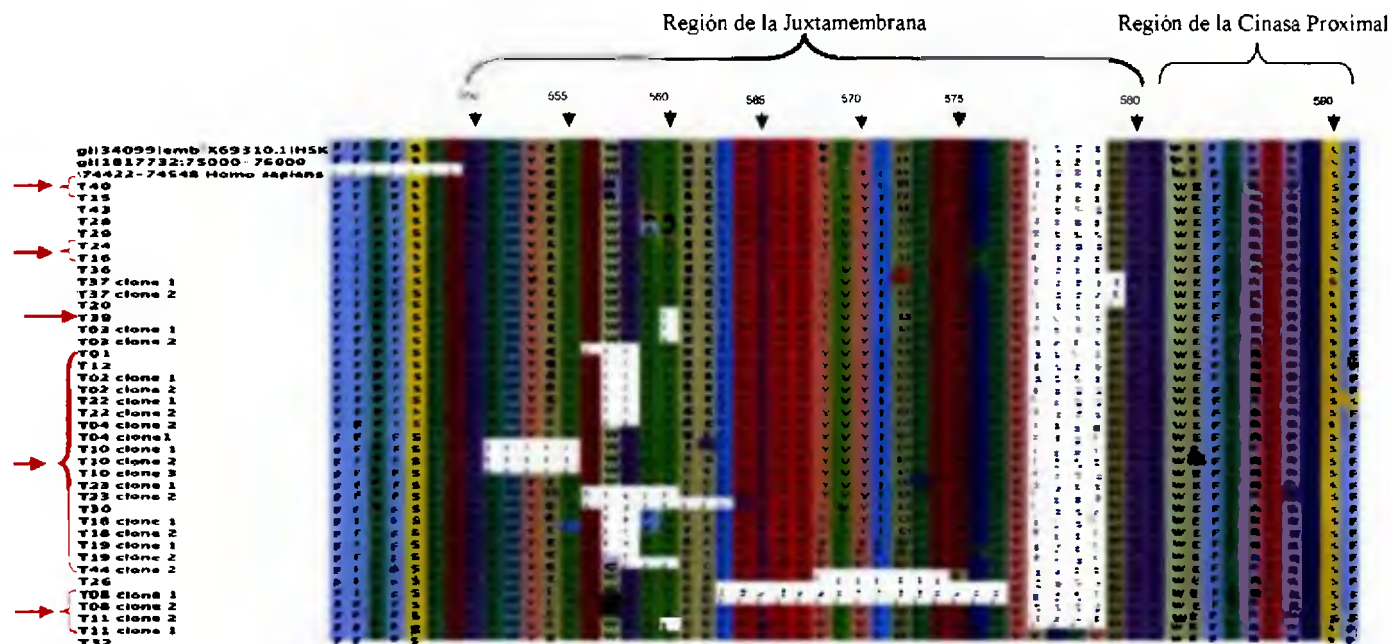


Figura 12. Tipo y posición de las mutaciones dentro del exón 11 del gen *c-kit*. Se muestra a los pacientes con sus respectivas secuencias de aminoácidos obtenidas de los diferentes clones que representan a los posibles alelos presentes en el individuo. Las flechas y corchetes (rojo) indican las muestras consideradas dentro del grupo de alto riesgo. Nomenclatura de aminoácidos: A=Alanina, Arginina, N=Asparagina, D=ácido Aspartico, C=Cisteína, E=ácido Glutámico, Q=Glutamina, G=Glicina, H=Histidina, I=Isoleucina, L= Leucina, K=Lisina, M=Metionina, F= Fenilalanina, P=Prolina, S=Serina, T= Treonina, W=Triptófano, Y=Tirosina, V=Valina, X=codón de parada en color negro.

Tabla No. 8. Características clínicas y patológicas de los pacientes que presentaron sustituciones simples en el exón 11 del gen *c-kit*.

Idioma	Mutación Observada	Edad	Género	Tamaño del Tumor (cm)	Sitio del Tumor	Tipo de Célula	Mitosis/No. 50 HPF**	Seguimiento (meses)	Metástasis: presente (SI/NO) / tiempo (meses) / sitio	Grupo de Riesgo
10	p.W557R	82	F	21	Omento	Fusiformes	19		SI / ATD* / Peritoneo	Alto
15	p.W557R	85	M	No disponible	Estómago	Fusiformes	37	no regresó		Alto
13	p.V559D	80	F	3	Estómago	Fusiformes	2	50	No	Bajo
18	p.V559D	65	M	5	Estómago	Fusiformes	0	5	SI / 5 / Hígado	Bajo
19	p.V559A	38	F	5	Intestino delgado	Fusiformes	1	23	No	Bajo
14	p.V560D	51	M	27	Omento	Mixto	80		SI / ATD* / Hígado y Peritoneo	Alto
6	p.L576P	77	M	14	Estómago	Fusiformes	2	2	SI / 2 / Peritoneo	Alto
16	p.L576F	77	F	4	Intestino delgado	Fusiformes	5	15	No	Bajo

TD: al momento del diagnóstico; ** HPF: high power field (campo de alto poder); W=Triptófano, R=Arginina, D=ácido Aspártico,

Valina, A=Alanina, L= Leucina, P=Prolina, F=Fenilalanina.

Tabla No. 9. Características clínicas y patológicas de los pacientes que presentaron deleciones simples en el exón 11 del gen *c-kit*.

No. caso	Mutación Observada	Edad	Género	Tamaño del Tumor (cm)	Sitio del Tumor	Tipo de Célula	Mitosis/ No. 50 HPF**	Seguimiento (meses)	Metástasis: presente (SI/NO) / tiempo (meses) / sitio	Grupo de Riesgo
20	p.D579del	65	F	5 a 3	Estómago	Fusiformes	1	7	No	Bajo
39	p.V560del	63	M	13	Estómago	Fusiformes	5	16	No	Alto
03	p.V560del	69	M	5.5	Yeyuno	Fusiformes	0	2	SI / 1 / Hígado	Medio
01	p.Q556_K558del	68	M	17	Estómago	Fusiformes	2	no regresó		Alto
12	p.W557_K558del	56	M	10	Retro-Peritoneo	Fusiformes	6		SI / ATD* / Hígado	Alto
02	p.W557_K558del	56	F	No disponible	Omento	Fusiformes	30	30	SI / 30 / Peritoneo	Alto
04	p.W557_K558del	54	M	8	Estómago	Fusiformes	35	7	SI / 7 / Peritoneo	Alto

HPF: high power field (campo de alto poder); N=Asparagina, D=ácido Aspartico, V=Valina.

Tabla No. 10. Características clínicas y patológicas de los pacientes que presentaron múltiples mutaciones (sustituciones y deleciones) en el exón 11 del gen *c-kit*.

Id. Paciente	Mutación Observada	Edad	Género	Tamaño del Tumor (cm)	Sitio del Tumor	Tipo de Célula	Mitosis/ No. 50 HPF**	Seguimiento (meses)	Metástasis: presente (SI/NO) / tiempo (meses) / sitio	Grupo de Riesgo
37	p.[D572N (+) D579del]	73	M	4	Estómago	Fusiformes	0	23	No	Bajo
22	p.[W557_K558del (+) F591S]	50	M	37	Estómago	Fusiformes	56	34	No	Alto
10	p.[P551_V555del (+) E562K (+) E583G]	51	F	30	Omento	Fusiformes	143		SI / ATD* / Peritoneo	Alto
23	p.[E554D (+) Q556_V560del (+) P573L (+) R588K]	45	M	17	Intestino delgado	Fusiformes	4	29	No	Alto
30	p.[Q556_L563del; N564H]	57	F	13	Estómago	Epiteliode	5		SI / ATD* / Hígado y Peritoneo	Alto
18	p.[V555I (+) W557_K558del; V559F]	79	M	14	Estómago	Fusiformes	61	15	SI / 15 / Hígado y Peritoneo	Alto
19	p.[W557_K558del (+) L576P]	57	M	12	Recto	Fusiformes	20		SI / ATD* / Hígado	Alto
44	p.[W557C; K558_V560del]	61	F	14	Estómago	Fusiformes	31	28	SI / 28 / Hígado	Alto
26	p.[Y568_T574del; Q575E]	71	M	9	Intestino delgado	Fusiformes	2	28	No	Medio

TD: al momento del diagnóstico; ** HPF: high power field (campo de alto poder); P=Prolina, V=Valina, E=ácido Glutámico, D=ácido Aspartico,

Glutamina, K=Lisina, I=Isoleucina, N=Asparagina, H=Histidina, W=Triptófano, F=Fenilalanina, L= Leucina, Y=Tirosina, T= Treonina.

Tabla No. 11. Características clínicas y patológicas de los casos T08 y T11 que presentaron sustitución del aminoácido W⁵⁵⁷ por un
 dón de parada más deleciones; y el caso T32 que presentó sustitución (Q575E) y duplicación de 3 aminoácidos en el exón 11 de
 n *c-kit*.

o. de caso	Mutación Observada	Edad	Género	Tamaño del Tumor (cm)	Sitio del Tumor	Tipo de Célula	Mitosis/No. 50 HPF**	Seguimiento (mcses)	Metástasis: presente (SI/NO) / tiempo (meses) / sitio	Grupo de Riesgo
T08	p. [W557X (+) I563_P577del]	52	F	11	Estómago	Fusiformes	12	no regresó		Alto
T11	p.[W557X (+) V560del]	58	M	23	Intestino delgado	Fusiformes	17		SI / ATD* / Peritoneo	Alto
T32	p.Q575E_Y578dup	29	F	9	Estómago	Fusiformes	5	5	No	Medio

TD: al momento del diagnóstico; ** HPF: high power field (campo de alto poder); W=Triptófano, X=codón de parada, I=Isoleucina, P=Prolina, V=Valina.

Q=Glutamina, Y=Tirosina, E=ácido Glutámico.

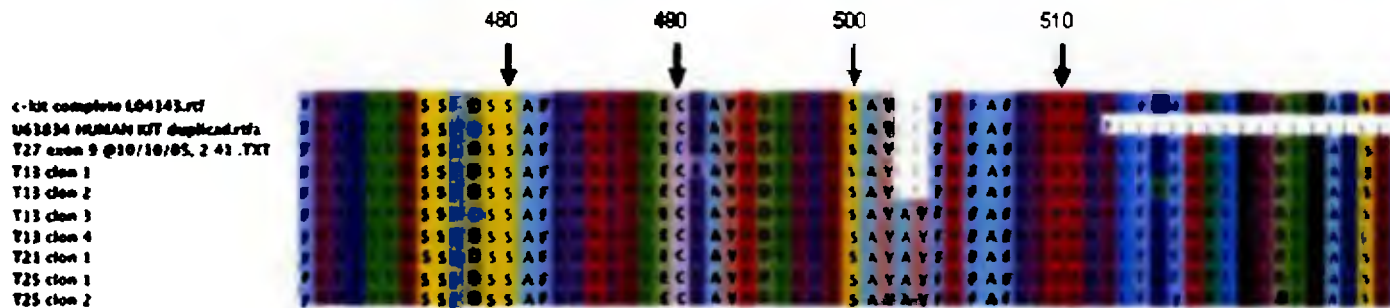


Figura 13. Tipo y posición de las mutaciones dentro del exón 9 del gen *c-kit*. Se muestra los pacientes con sus respectivas secuencias de aminoácidos obtenidas de los diferentes clones que representarían a los posibles alelos presentes en el individuo.

Nomenclatura de aminoácidos: A=Alanina, R=Arginina, N=Asparagina, D=ácido Aspartico, C=Cisteína, E=ácido Glutámico, Q=Glutamina, G=Glicina, H=Histidina, I=Isoleucina, L= Leucina, K=Lisina, M=Metionina, F=Fenilalanina, P=Prolina, S=Serina, T= Treonina, W=Triptófano, Y=Tirosina, V=Valina, X=codón de parada en color negro.

Tabla No. 12. Características clínicas y patológicas de los pacientes que presentaron duplicaciones en el exón 9 del gen *c-kit*.

N.º de caso	Mutación Observada	Edad	Género	Tamaño del Tumor (cm)	Sitio del Tumor	Tipo de Célula	Mitosis/No. 50 HPF **	Seguimiento (meses)	Metástasis: presente (SI/NO) / tiempo (meses) / sitio	Grupo de Riesgo
15	p.A502_Y503dup	40	F	8	Intestino delgado	Fusiformes	0	23	No	Medio
11	p.A502_Y503dup	67	F	28	Intestino delgado	Epiteliode	140		SI / ATD* / peritoneal	Alto
3	p.[A502_Y503dup (+) K492R]	62	M	6	Intestino delgado	Fusiformes	6	14	No	Alto

ATD: al momento del diagnóstico; ** HPF: high power field (campo de alto poder); A=Alanina, Y=Tirosina.

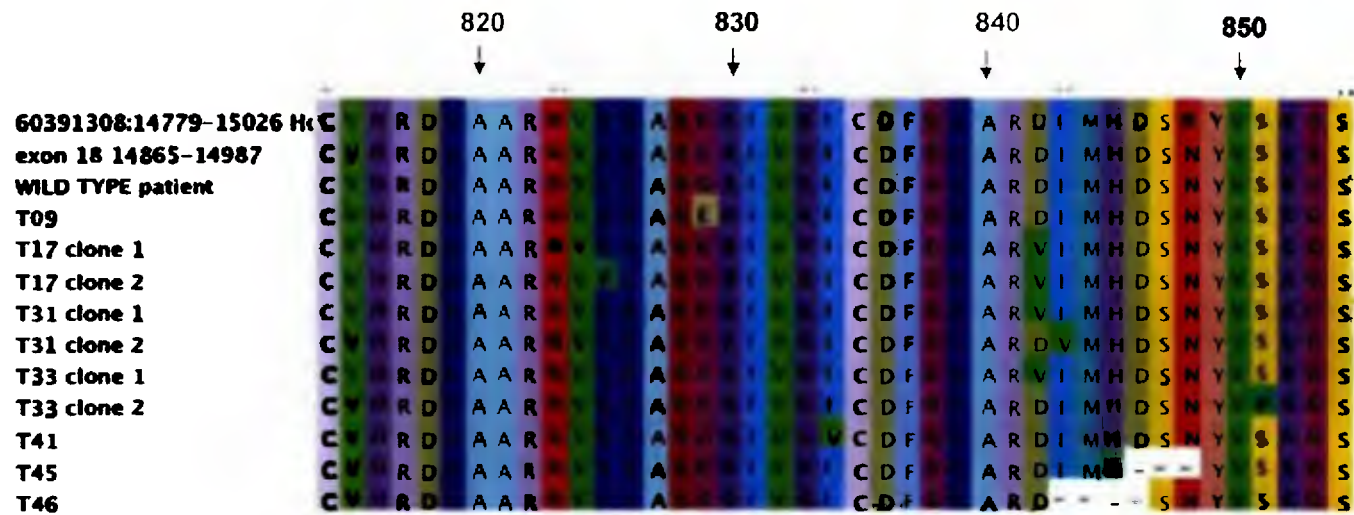


Figura 14. Tipo y posición de las mutaciones dentro del exón 18 del gen *pdgfra*. Se muestra los diferentes pacientes con sus respectivas secuencias de aminoácidos obtenidas de los diferentes clones que representarían a los posibles alelos presentes en la muestra. Nomenclatura de aminoácidos: A=Alanina, R=Arginina, N=Asparagina, D=ácido Aspartico, C=Cisteína, E=ácido glutámico, Q=Glutamina, G=Glicina, H=Histidina, I=Isoleucina, L= Leucina, K=Lisina, M=Metionina, F=Fenilalanina, P=Prolina, S=Serina, T= Treonina, W=Triptófano, Y=Tirosina, V=Valina, X=codón de parada en color negro.

Tabla No. 13. Características clínicas y patológicas de los pacientes que presentaron mutaciones en el exón 18 del gen *p53*.

Idioma	Mutación Observada	Edad	Género	Tamaño del Tumor (cm)	Sitio del Tumor	Tipo de Célula	de Mitosis/No. 50 HPF**	Seguimiento (meses)	Metástasis: presente (SI/NO) / tiempo (meses) / sitio	Grupo de Riesgo
09	p.G829E	77	M	13	Estómago	Mixto	11	no regresó		Alto
7	p. [L825P (+) D842V]	N/A	M	8	Estómago	Mixto	11	no regresó		Alto
11	p.[D842V (+) I843V]	33	M	19	Estómago	Epiteliode	2	22	No	Alto
13	p.[D842V (+) S851P]	74	F	7	Estómago	Epiteliode	6	24	No	Alto
11	p.I834V	82	F	7	Estómago	Epiteliode	5	40	No	Medio
15	p.[H845P (+) D846_N848del]	58	F	10	Estómago	Epiteliode	0	no regresó		Medio
16	p.I843_D846del	64	F	4	Estómago	Fusiformes	4	32	No	Bajo

HPF: high power field (campo de alto poder), G= Glicina, E=ácido Glutámico, L= Leucina, P=Prolina, D=ácido Aspartico, V=Valina, I=Isoleucina, S=Serina, Histidina, N=Asparagina.

DISCUSIÓN

En este estudio encontramos que el 77% de las muestras analizadas presentaron mutaciones en el gen *c-kit*. Estos resultados coinciden con estudios previos que muestran una mayor incidencia de mutaciones en el gen *c-kit* en relación al gen *pdgfra* en pacientes con GIST (Hirota *et al.*, 2001; Duensing *et al.*, 2004). La mayoría de las mutaciones observadas en el gen *c-kit* fueron en el exón 11 (27 casos) y en menor proporción en el exón 9 (3 casos). Mutaciones en estos exones han sido previamente asociadas a GIST, a diferencia de otros tumores y enfermedades genéticas que presentan mutaciones en otros exones del gen *c-kit*, responsables en su mayoría de realizar la activación enzimática de KIT (Furitsu *et al.*, 1993; Tian *et al.*, 1999; Hongyo *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2004; Miettinen & Lasota, 2005; Nagata *et al.*, 2005).

La región de la juxtamembrana del receptor KIT comprendido entre los aminoácidos 554-562 presentó un mayor número y tipo de mutaciones en un 96% de las muestras (Figura 12). Las mutaciones observadas fueron principalmente deleciones y sustituciones, la mayoría reportadas por otros autores (Lasota *et al.*, 1998; Taniguchi *et al.*, 1999; Yamamoto *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2005; Miettinen *et al.*, 2005; Wardelmann *et al.*, 2006). Nuestras muestras no presentaron inserciones en la región mencionada como otros autores han mencionado (Kang *et al.*, 2005; Tarn *et al.*, 2005). El efecto de estas mutaciones interrumpen las interacciones hidrofóbicas (específicamente los residuos

W557, V559 y V560) o electrostáticas (residuo Q556) que favorecen el cierre del lazo de horquilla entre la cinasa N-terminal y su dominio C-terminal que regula la conformación activa e inactiva del receptor (Moi *et al.*, 2004; Tarn *et al.*, 2005).

Dos muestras se observaron con la sustitución de triptófano por un codón de parada en la posición 557 (p.W557X) que evita la síntesis de los restantes residuos de la región de la juxtamembrana y de la cinasa proximal del receptor KIT (muestras T08 y T11). En la figura 12 se observa que para la muestra T08, ambos clones presentaban la delección de 15 aminoácidos (p.I563_P577del) pero solamente el clon 2 presenta un codón de parada en el aminoácido 557. Las células de este tumor presentaron tres alelos que producirán una proteína truncada, una proteína con 15 aminoácidos menos y la proteína normal. Igualmente observamos que la muestra T11 presenta células con el alelo normal, un alelo mutado (clon 2) con un codón de parada en la posición 557 y otro alelo mutado (clon 1) con una única delección del residuo 560 (p.V560del) (Figura 12). A pesar de que T11 presentó dos alelos mutados sin grandes delecciones como las observadas en T08, la muestra T11 evidenció metástasis al momento del diagnóstico (Tabla 11). Estudios han demostrado que el nivel de alteración de la proteína en los residuos 557-560 se asocia con un mal pronóstico en la sobrevida (Taniguchi *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 2005). Observamos que 16 de 27 muestras con mutaciones entre los residuos 557-560 responsable de la regulación del receptor KIT fueron consideradas de alto riesgo. Nuestros resultados sugieren que la posición y el tipo de mutación son importantes, en específico, aquellas mutaciones relacionadas con la regulación entre la conformación activa e inactiva del receptor KIT.

Investigaciones a nivel de la proteína han demostrado que mutaciones en estos aminoácidos mantienen la activación constitutiva del receptor dado a que corresponde con el dominio que regula la dimerización y activación de los receptores (Heinrich *et al.*, 2003; Tam *et al.*, 2005). Varios autores apoyan con sus datos la hipótesis de que la posición y el tipo de mutación asociadas a la conformación y actividad de la proteína KIT son evidentemente importantes y explican porqué al interrumpir la conformación inactiva de la proteína se mantiene la fosforilación constitutiva del receptor que conlleva a una alteración en la transducción de señales (Heinrich *et al.*, 2003; Mol *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2005; Tam *et al.*, 2005).

Los casos T16, T20, T26, T32, T36 y T37 presentaron mutaciones que están dentro del dominio de la juxtamembrana aunque fuera del área importante para la regulación del receptor KIT (residuos 562-581). Los pacientes T16 y T36 presentaron ambos la misma mutación en el aminoácido 576 (p.L576P); mientras que, los pacientes T37 y T20 presentaron una delección del aminoácido 579 (p.D579del). A diferencia de la mutación p.L576P cuyo significado biológico aún no se ha estudiado, la mutación p.D579del ha sido reportada en la línea germinal de pacientes con GIST (Tam *et al.*, 2005). En la muestra T26 se presentó la mutación p.[Y568_T574del; Q575E] en un mismo alelo que elimina los dos sitios de fosforilación Y568 y Y570; los cuales son importantes para el inicio de la activación de las diferentes tirosinas que han sido estudiadas *in Vitro* (Mol *et al.*, 2004). Los residuos Y568 y Y570 recluta a las familias de cinasas *src*, *APS*, *Sch*, *CHK*, algunos

de los cuales son importantes en los procesos de proliferación celular (Linnekin *et al.*, 1997; Price *et al.*, 1997; KozBaoski *et al.*, 1998; Wollberg *et al.*, 2003; Roskoski, 2004).

En este estudio se encontró tres mutaciones (p.W557R, p.V559A y p.D579del) previamente publicadas como asociadas a GIST familiar en los pacientes T15, T40, T37, T20 y T29 (Figura 12) (Hirota *et al.*, 2000b; Maeyama *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2005; Tarn *et al.*, 2005). Maeyama *et al.* (2001) describieron que la mutación p.V559A estaba presente en una familia cuyos integrantes presentaban primeramente un cuadro de hiperpigmentación cutánea durante la adolescencia, seguida de un diagnóstico de GIST múltiple al llegar a los 40 años; no obstante, aquellos familiares sin la mutación no desarrollaban hiperpigmentación ni GIST. A diferencia de los pacientes con la mutación p.V559A, los pacientes con mutación en p.W557R no desarrollan hiperpigmentación por el contrario presentan múltiples GIST con una hiperplasia en las células intersticiales de Cajal y tumores neuronales (Hirota *et al.*, 2000b). Las mutaciones p.D579del y p.V559A afectan la actividad del dominio de la cinasa intracelular (Tarn *et al.*, 2005). En este estudio, no se contó con suficientes datos clínicos que permitiera corroborar si familiares de los pacientes estudiados hayan desarrollado GIST u otro tipo de cáncer incluyendo el de esófago y mamario y/o presenten hiperpigmentación. Es posible que con un mayor número de pacientes y sus familias pudiésemos estimar la frecuencia de estas mutaciones dentro de la población panameña. Una evaluación sobre otros cánceres asociados a mutaciones en la línea germinal del *c-kit* no ha sido hasta el momento estudiada de manera extensiva aunque hay muchos reportes de tumores GIST con síndromes familiares (Nishida *et al.*, 1998; Isozaki *et al.*, 2000; Maeyama *et al.*, 2001; Hirota *et al.*, 2002;

Robson *et al.*, 2004). Sería interesante en un próximo estudio evaluar la importancia de la posición y el tipo de mutación asociada a GIST familiar (exón 11: p.W557R, p.V559A, p.D579del; exón 13: p.K642E; exón 17: p.D820Y) en relación a las mutaciones en GIST esporádicos.

Los pacientes T25, T21 y T13 (figura 13) presentan la misma mutación (p.A502_Y503dup) para el exón 9 del gen *c-kit*, una mutación previamente descrita por varios autores (Lux *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2005; Wardelmann *et al.*, 2006). Una proteína KIT con esta mutación en el exón 9 exhibe una autofosforilación constitutiva sin necesidad de ser estimulada por el ligando SCF (Hirota *et al.*, 2001).

Las mutaciones observadas en el exón 18 del gen *pdgfra* han sido previamente descritas (Heinrich *et al.*, 2003; Lasota *et al.*, 2004; Miettinen *et al.*, 2005) con excepción de p.I843V (paciente T33 clon 2), p.I834V (paciente T41), p.G829E (paciente T09) y, p.L826P (en el clon 2 del paciente T17). Aunque los clones demostraran un alelo con mutaciones diferentes a las reportadas (T17 y T31), el otro clon mostró al alelo con la mutación más frecuentemente encontrada (p.D842V) en pacientes con GIST. Heinrich *et al.* (2003) determinaron mediante experimentos de expresión del receptor PDGFR α con mutaciones p.D842V, p.D842_845H y p. [H845_848N (+) N848P] la fosforilación independiente del ligando. La mutación p.D842V corresponde en función con la mutación p.D816V de KIT que ha sido previamente identificada en tumores de mastocitos (Furitsu *et al.*, 1993), en células mononucleares de pacientes que tienen mastocitosis con desorden hematopoyético asociado (Nagata *et al.*, 1995) y de células germinales (Tian *et al.*, 1999).

Heinrich *et al.* (2003) comprobaron que los tumores que expresaban oncoproteínas de KIT o PDGFR α eran indistinguibles en relación a la activación de señales intracelulares por proteínas reclutadas por lo que consideran que las mutaciones activadas de KIT y PDGFR α presentan eventos oncogénicos mutuamente exclusivos en GIST y que estas mutaciones tienen consecuencias biológicas similares.

Estudios clínicos han mostrado que la respuesta a medicamentos que inhiben la acción de la tirosina-cinasa en *c-kit* o *pdgfra* en pacientes con GIST, como por ejemplo el Imatinib (Glivec, Novartis), es dependiente del estatus mutacional del proto-oncogen (Heinrich *et al.*, 2003; Debiec-Rychter *et al.*, 2004; Heinrich *et al.*, 2006). En la figura 15 se muestra como la interacción de la droga Imatinib en codones específicos interrumpe la activación constitutiva de KIT (Mol *et al.*, 2004). Por consiguiente, la acción del Imatinib sobre los aminoácidos reguladores de la juxtamembrana permite el funcionamiento normal del receptor aunque diferencias significativas asociadas recaídas se ha encontrado en pacientes con la mutación p.W557_K558del (Martin *et al.*, 2005). Pacientes con la mutación encontrada en el exón 9 del gen *c-kit* y exón 18 del gen *pdgfra* no tienen buena respuesta al tratamiento con Imatinib pero son sensibles al tratamiento con Sunitinib (Corless *et al.*, 2004; Heinrich *et al.*, 2006; Miettinen *et al.*, 2005b). La figura 16 permite observar que estudios clínicos han determinado cómo el tipo y sitio de mutación en el gen *c-kit* (exones 11 y 9), influyen en la respuesta objetiva y la resistencia a las drogas que actualmente se emplean (Heinrich *et al.*, 2006).

Solamente dos pacientes no presentaron mutaciones para los exones estudiados lo que demuestra la utilidad de la determinación de las mutaciones en los genes *c-kit* y *pdgfra* para la confirmación de diagnóstico. Estudios previos han demostrado que aproximadamente el 5% de los GIST no presentan mutaciones (Heinrich *et al.*, 2003a; Miettinen *et al.*, 2005b). Es probable que otros genes como el receptor del factor de crecimiento de insulina (IGF1R) también sean responsables de la oncogénesis de los GIST (Tarn *et al.*, 2008).

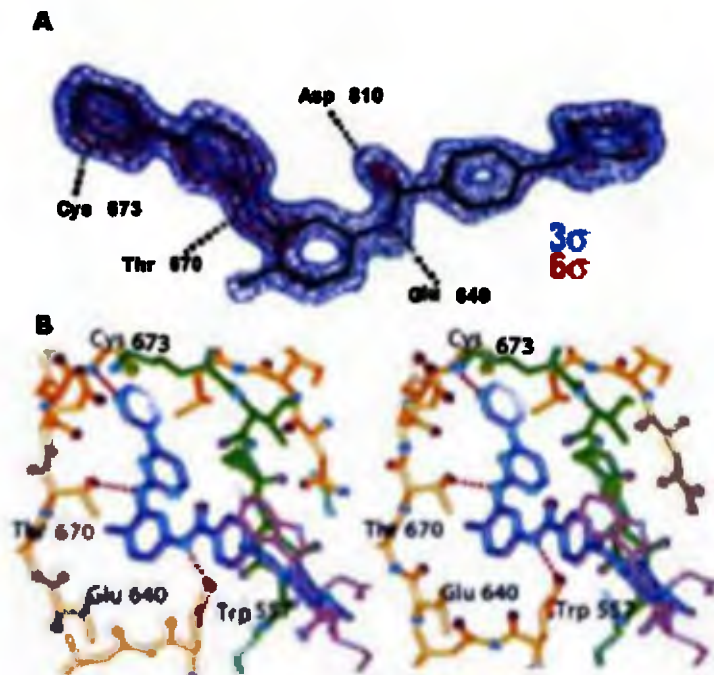


Figura 15. Sitio de unión y anclaje del imatinib a la cinasa del c-kit, se muestra la estructura química del imatinib (STI-571) indicando los aminoácidos en KIT donde interacciona (A) el imatinib (color púrpura) al sitio de anclaje en el KIT mostrando los enlaces de hidrógeno formados con los residuos de Cys673, Thr670, y Glu640 (B) en la conformación activa (derecha) e inactiva (izquierda). El polipéptido alrededor Trp557 desde la estructura del KIT inactivo se muestra sobreponiendo a la estructura del Imatinib (Mol *et al.*, 2004).

Mutación(es)	Exón(s)	Localización de una segunda mutación	Dosis Aproximada IC ₅₀ (nM)	
			Sunitinib	Imatinib
V560D	11	-	1000	5000
V654A	13	-	1000	5000
V560D + V654A	11 + 13	ATP BP	1000	5000
V560D + T670I	11 + 14	ATP BP	1000	10,000
V560D + D816H	11 + 17	Act. loop	1000	5000
V560D + N822K	11 + 17	Act. loop	>1000	~1000
V560D + V823D	11 + 17	Act. loop	>1000	>1000
Exon 9 + V654A	9 + 13	ATP BP	1000	5000

ATP BP: ATP binding pocket (sitio de union del ATP);

Act. Loop: activation loop (lazo o sitio de activación)

Figura 16. Efectos *in Vitro* del Imatinib y Sunitinib en mutantes de KIT. Obsérvese cómo el tipo y sitio de la primera (en tumor primario) y segunda mutación más frecuentemente encontrada en pacientes que desarrollan resistencia al Imatinib según concentración de dosis aplicada (nM). Los números de dosis en rojo indican sensibilidad a la droga mientras que los números en negro indican resistencia a la droga según sea el tipo y sitio de la mutación en el gen *c-kit* (Heinrich *et al.*, 2006).

CONCLUSIONES

-En este estudio se encontró una mayor incidencia de mutaciones en el gen *c-kit* en relación al gen *pdgfra* en pacientes con GIST, además, se determinó mutaciones en los genes *c-kit* y *pdgfra* asociados a GIST esporádico y familiar. La mayoría de las mutaciones encontradas en ambos genes causan la activación constitutiva del receptor.

-Las mutaciones p.W557R, p.V559A y p.D579del presentes en cinco muestras están asociadas a GIST familiar. El tipo de mutación y la posición en pacientes con GIST familiar presenta cuadros clínicos característicos de cada mutación.

-Aproximadamente el 5% de los GIST no presentaron mutaciones, lo cual demuestra la utilidad de la determinación de las mutaciones en los genes *c-kit* y *pdgfra* para la confirmación de diagnóstico.

-Los pacientes con mutaciones en el exón 11 del gen *c-kit* tendrán una buena respuesta a drogas inhibitorias a la acción de los receptores tirosina cinasa KT y PDGFRA sobreactivados que actualmente están en el mercado como Glivec (Imatinib) y Sunitinib. De esta manera, nuestra investigación va a permitir un tratamiento personalizado a pacientes con GIST quienes anteriormente no tenían opciones terapéuticas y por ende un mal pronóstico de supervivencia.

LITERATURA CITADA

- Ashman LK, Ferrao P, Cole SR, Cambareri A (1999) Effects of mutant *c-kit* in early myeloid cells. *Leuk Lymphoma* 34: 451-461.
- Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore D, Seidman J, Smith J, Strudel K (2002) *Short Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, 5th Edition, vol. 1, page 2-3.
- Baserga R (1994) Oncogenes and the strategy of growth factors. *Cell* 79: 927-930.
- Bhattacharyya A. & Lilley, DMJ (1989) The contrasting structures of mismatched DNA sequences containing looped-out bases (bulges) and multiple mismatches (bubbles). *Nucleic Acids Research* 17:6821-6840.
- Besmer P, Murphy JE, George PC, Qiu FH, Bergold PJ, Lederman L, Snyder HW, Brodeur D, Zuckerman EE, Hardy WD (1986) A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene *v-kit* with the protein kinase gene family. *Nature* 320:415-421.
- Blechman JM, Lev S, Barg J, Eisenstein M, Vaks B, Vogel Z, Givol D, Yarden Y (1995) The fourth immunoglobulin domain of the stem cell factor receptor couples ligand binding to signal transduction. *Cell* 80:103-113
- Blume-Jensen P, Janknecht R, Hunter T (1998) The kit receptor promotes cell survival via activation of PI 3-kinase and subsequent Akt-mediated phosphorylation of Bad on Ser136. *Curr Biol* 8:779-782.
- Cable J, Barkway C, Steel KP (1992) Characteristics of stria vascularis melanocytes of viable dominant spotting (*W^v/W^v*) mouse mutants. *Hear Res* 64:6-20.
- Carpino N, Wisniewski D, Strife A, Marshak D, Kobayashi R, Stillman B, Clarkson B (1997) p62(dok): a constitutively tyrosine-phosphorylated, GAP-associated protein in chronic myelogenous leukemia progenitor cells. *Cell*; 88:197-204.
- Chabot B, Stephenson DA, Chapman VM, Besmer P, Bernstein A (1988) The proto-oncogene *c-kit* encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse *W* locus. *Nature* 335:88-89
- Chan JK (1999) Mesenchymal tumors of the gastrointestinal tract: a paradise for acronyms (STUMP, GIST, GANT and now GIPACT), implication of *c-kit* in Genesis, and yet

another of the many emerging roles of the interstitial cell of cajal in the pathogenesis of gastrointestinal diseases? *Advances in Anatomic Pathology*, 6(1):19-40.

Chan PM, Ilangumaran S, La Rose J, Chakrabarty A, Rottapel R (2003) Autoinhibition of the kit receptor tyrosine kinase by the cytosolic juxtamembrane region. *Mol Cell Biol* 23:3067-3078

Clark D & L Russell (2000) *Molecular Biology: made simple and fun*. Cache River Press, 2da.Edición. Páginas: 153-171, 191-215.

Coussens L, Van Beveren C, Smith D, Chen E, Mitchell RL, Isacke CM, Verma IM, Ullrich A (1986) Structural alteration of viral homologue of receptor proto-oncogene fms at carboxyl terminus. *Nature* 320(6059):277-280.

Corless C, Fletcher J, Heinrich M (2004) Biology of gastrointestinal stromal tumors. *Journal of Clinical Oncology* 22(18): 3813-3825.

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

Dang CV (1999) c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol. Cell Biol.* 19:1-11

Debiec-Rhchter M, Dumez H, Judson I, Wasag B, Verweij J, Brown M, Dimitrijevic S, Sciot R, Stul M, Vranck H, Scurr M, Hagemeyer A, Van Glabbeke M, Van Oosterom AT (2004) Use of *c-kit/pdgfra* mutational analysis to predict the clinical response to imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumours entered in phase I and II studies of the EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. *Eur J Cancer*, 40:689-695.

Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, *et al.* (2002) Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med.*, 347:472-480.

den Dunnen JT, Antonarakis SE (2001) Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet* 109(1):121-4.

Duensing A, Medeiros F, McConarty B, Joseph N, Panigrahy D, Singer S, Fletcher C, Demetri G, Fletcher J (2004) Mechanisms of oncogenic KIT signal transduction in primary gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *Oncogene* 23:3999-4006.

Easty D, Bennett D. (2000) Protein tyrosine kinases in malignant melanoma. *Melanoma Res* 10:401-411.

Edling, C (2006) Receptor tyrosine kinase *c-kit* signaling in hematopoietic progenitor cells. Doctoral Thesis. Umea University, Sweden.

Ezoe K, Holmes S, Ho L, Bennett CP, Bologna JL, Brueton L, Burn J, Falabella R, Gatto EM, Ishii N, Moss C, Pittelkow M R, Thompson E, Ward KA, Spritz RA. (1995) Novel mutations and deletions of the KIT (steel factor receptor) gene in human piebaldism. *Am J Hum Genet* 56:58-66.

Fleischman, R, Saltman D, Stastny V, Zneimer S (1991) Deletion of the *c-kit* protooncogene in the human developmental defect piebald trait. *Proc. Natl Acad. Sci*, 88:10885-10889.

Fletcher CD, Berman JJ, Corless C, Gorstein F, Lasota J, Longley BJ, Miettinen M, O'Leary TJ, Remotti H, Rubin BP, Shmookler B, Sobin LH, Weiss SW (2002) Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: a consensus approach. *Hum Pathol*, 33:459-65.

Furitsu T, Tsujimura T, Tono T, Ikeda H, Kitayama H, Koshimizu U, Sugahara H, Butterfield JH, Ashman LK, Kanayama Y, Matsuzawa Y, Kitamura Y, Kanakura Y (1993) Identification of mutations in the coding sequence of the proto- oncogene *c-kit* in a human mast cell leukemia cell line causing ligand: independent activation of *c-kit* product. *J Clin Invest* 92:1736-1744.

Gommerman JL, Sittaro D, Klebasz NZ , Williams DA, Berger SA (2000) Differential stimulation of *c-kit* mutants by membrane-bound and soluble Steel Factor correlates with leukemic potential. *Blood* 96:3734-3742.

Griffiths A, Miller J, Suzuki D, Lewontin R, Gelbart (2000) An introduction to genetic analysis. 7th Edición. Freeman and Company, USA. Páginas: 464-465, 467-472

Gutman M, Singh RK, Radinsky R, Bar-Eli M (1994) Intertumoral heterogeneity of receptor-tyrosine kinases expression in human melanoma cell lines with different metastatic capabilities. *Anticancer Res* 14:1759-1765.

Hanahan D & R Weinberg (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, 100:57-70

Heinrich MC, Rubin BP, Longley BJ, Fletcher JA (2002a) Biology and genetic aspects of gastrointestinal stromal tumors: KIT activation and cytogenetic alterations. *Hum Pathol*, 33:484-95.

Heinrich MC, Blanke CD, Druker BJ, Corless CL (2002b) Inhibition of KIT tyrosine kinase activity: a novel molecular approach to the treatment of KIT-positive malignancies. *J Clin Oncol* 20:1692-1703.

Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, McGreevey L , Chen C-J, Joseph N, Singer S, Griffith D, Haley A, Town A, Demetri G, Fletcher C, Fletcher J (2003a) *PDGFRA* activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* 299:708-710.

Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, *et al.* (2003) Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J. Clin. Oncol.* 21: 4342-4349.

Heinrich MC, Corless CL, Blanke CD, Demetri GD, Joensuu H, Roberts PJ, Eisenberg BL, Mehren M, Fletcher CDM, Sandau K, McDougall K, Ou W, Chen C, Fletcher JA (2006) Molecular Correlates of Imatinib Resistance in Gastrointestinal Stromal Tumors. *Journal of Clinical Oncology*, 24(29): 4764-4774, 10.1200/JCO.2006.06.2265

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

Hirota S, Isozaki K, Nishida T, Kitamura Y (2000a) Effects of loss-of-function and gain-of-function mutations of *c-kit* on the gastrointestinal tract. *J Gastroenterol*, 35 (Suppl 12):75-9.

Hirota S, Okasaki T, Kitamura Y, *et al.* (2000b) Cause of familial and multiple gastrointestinal autonomic nerve tumors with hyperplasia of interstitial cells of Cajal is germline mutation of the *c-kit* gene. *Am J Surg Pathol* 24:326-327.

Hirota S, Nishida T, Isozaki K, Taniguchi M, Nakamura J, Okazaki T, Kitamura Y (2001) Gain-of-function mutation at the extracellular domain of KIT in gastrointestinal stromal tumours. *J Pathol* 193:505-10.

Hirota S, Nishida T, Isozaki K, *et al.* (2002) Familial gastrointestinal stromal tumors associated with dysphagia and novel type germline mutation of KIT gene. *Gastroenterology* 122:1493-1499.

Hou YY, Tan YS, Sun MH, Wei YK, Xu JF, Lu SH, A-Ke-Su SJ, Zhou YN, Gao F, Zheng AH, Zhang TM, Hou WZ, Wang J, Du X, Zhu XZ (2004) *C-kit* gene mutation in human gastrointestinal stromal tumors. *World Journal of Gastroenterology* 10(9):1310-1314.

Hongyo T, Li T, Syaifudin M, Baskar R, Ikeda H, Kanakura Y, Aozasa K, Nomura T (2000) Specific *c-kit* mutations in sinonasal natural killer/T-cell lymphoma in China and Japan. *Cancer Res* 60:2345-2347.

Huang S, Luca M, Gutman M, McConkey DJ, Langley KE, Lyman SD, Bar-Eli M (1996) Enforced *c-kit* expression renders Altoly metastatic human melanoma cells susceptible to stem cell factor-induced apoptosis and inhibits their tumorigenic and metastatic potential. *Oncogene* 13:2339-2347.

Huilzinger JD, Thuneberg L, Kluppel M, Malysz J, Mikkelsen HB, Bernstein A (1995) W^W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature* 373:347–9.

Huse M and Kuriyan J (2002) The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* 109:275-282.

Ikeda H, Kanakura Y, Tamaki T, Kuriu A, Kitayama H, Ishikawa J, Kanayama Y, Yonezawa T, Tarui S, Griffin JD (1991) Expression and functional role of the proto-oncogene *c-kit* in acute myeloblastic leukemia cells. *Blood* 78:2962–2968.

Isozaki K, Terris B, Belghiti J, Schiffmann S, Hirota S, Vanderwinden JM (2000) Germline-activating mutation in the kinase domain of KIT gene in familial gastrointestinal stromal tumors. *Am J Pathol* 157:1581-1585.

Karin M and Hunter T (1995) Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Current Biology* 5: 747-757.

Kimura A, Nakata Y, Katoh O, Hyodo H (1997) *c-kit* point mutation in patients with myeloproliferative disorders. *Leuk Lymphoma* 25:281–287.

Kindblom LG, Remotti HE, Aldenborg F, Meis-Kindblom JM (1998) Gastrointestinal pacemaker cell tumor (GIPACT): gastrointestinal stromal tumors show phenotypic characteristics of the interstitial cells of Cajal. *Am J Pathol* 152:1259–69.

Kissel H, Timokhina I, Hardy MP, Rothschild G, Tajima Y, Soares V, Angeles M, WhitBajo SR, Manova K, Besmer P (2000) Point mutation in kit receptor tyrosine kinase reveals essential roles for kit signaling in spermatogenesis and oogenesis without affecting other kit responses. *EMBO J* 19:1312–1326.

Kitamura Y, Go S, Hatanaka K (1978) Decrease of mast cells in W/W^v mice and their increase by bone marrow transplantation. *Blood* 52:447-452.

KozBajoski M, Larose L, Lee F, Le DM, Rottapel R, Siminovitch KA (1998) SHP-1 binds and negatively modulates the *c-kit* receptor by interaction with tyrosine 569 in the *c-kit* juxtamembrane domain. *Mol Cell Biol* 18:2089-2099.

Lasota J., Wozniak A., Sarlomo-Rikal a M., Miettinen, M. (1999) Mutations in exon 11 of *c-kit* occur preferentially in malignant versus benign gastrointestinal stromal tumors and do not occur in leiomyomas or leiomyosarcomas. *Am J Pathol* 154:53-60.

Lengauer, C., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396, 643–649.

Lennartsson J, Wernstedt C, Engstrom U, Hellman U, Rönstrand L (2003) Identification of Tyr900 in the kinase domain of *c-kit* as a Src dependent phosphorylation site mediating interaction with c-Crk. *Exp Cell Res* 288:110–118.

Lennartsson J, Jelacic T, Linnekin D, Shivakrupa R (2005) Normal and oncogenic forms of the receptor tyrosine kinase Kit. *Stem Cells* 23:16–43.

Lemmon MA, Pinchasi D, Zhou M, Lax I, Schlessinger J (1997) Kit receptor dimerization is driven by bivalent binding of stem cell factor. *J Biol Chem* 272:6311–6317

Lev S, Blechman J, Nishikawa S, Givol D, Yarden Y (1993) Interspecies molecular chimeras of kit help define the binding site of the stem cell factor. *Mol Cell Biol* 13(4): 2224–2234.

Levine, A.J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323–331.

Linnekin D, DeBerry CS, Mou S (1997) Lyn associates with the juxtamembrane region of *c-kit* and is activated by stem cell factor in hematopoietic cell lines and normal progenitor cells. *J Biol Chem* 272:27450–27455.

Lodish H, Berk A, Zipursky S L, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J (2000) *Molecular Cell Biology*. Freeman and Company. 4th Edición. Páginas 261, 1059–1076.

Longley BJ, Tyrrell L, Lu SZ, Ma YS, Langley K, Ding TG, Duffy T, Jacobs P, Tang LH, Modlin I. (1996) Somatic *c-kit* activating mutation in urticaria pigmentosa and aggressive mastocytosis: establishment of clonality in a human mast cell neoplasm. *Nature Genetics*, 12:312–314.

Longley BJ, Reguera MJ, Ma Y (2001) Classes of c-KIT activating mutations: proposed mechanisms of action and implications for disease classification and therapy. *Leuk. Res* 25(7):571–576.

Loveland KL and Schlatt S. (1997) Stem cell factor and *c-kit* in the mammalian testis: lessons originating from Mother Nature's gene knockouts. *Journal of Endocrinology*, 153:337–344

Lu HS, Clogston CL, Wypych J, Fausset PR, Lauren S, Mendiaz EA, Zsebo KM, Langley KE (1991) Amino acid sequence and post-translational modification of stem cell factor isolated from buffalo rat Hígado cell-conditioned medium. *J Biol Chem* 266:8102– 8107

Lux M, Rubin B, Biase T, Chen CJ, Maclure T, Demetri G, Xiao S, Singer S, Fletcher C, Fletcher J (2000) Kit extracellular and kinase domain mutations in Gastrointestinal Stromal Tumors. *Am J Pathol* 156(3): 791–795.

- Ma PC, Kijima T, Maulik G, Fox E, Sattler M, Griffin JD, Johnson BE, Salvia R (2003) c-MET mutational analysis in small cell lung cancer: novel juxtamembrane domain mutations regulating cytoskeletal functions. *Cancer Res* 63:6272–6281.
- Maeda H, Yamagata A, Nishikawa S, Yoshinaga K, Kobayashi S, Nishi K, Nishikawa S (1992) Requirement of *c-kit* for development of intestinal pacemaker system. *Development* 116:369-375
- Maeyama h, Hidak E, Ota H, *et al.* (2001) Familial gastrointestinal stromal tumors with hyperpigmentation: association with a germline mutation of the *c-kit* gene. *Gastroenterology* 120:210-215.
- Medeiros F, Corless CL, Duensing A, Hornick JL, Oliveira AM, Heinrich MC, Fletcher JA, Fletcher CD (2004) KIT-negative gastrointestinal stromal tumors: proof of concept and therapeutic implications. *Am J Surg Pathol* 28:889–94.
- Miettinen M, Lasota J (2001) Gastrointestinal stromal tumors—definition, clinical, histological, immunohistochemical, and molecular genetic features and differential diagnosis. *Virchows Arch* 438:1–12.
- Miettinen M, Furlong M, Sarlomo-Rikala M, Burke A, Sobin LH, Lasota J (2001) 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* 25:1121–33.
- Miettinen M, Lasota J, Sobin LH. (2005a) Gastrointestinal stromal tumors of the Stomach in children and young adults: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 44 cases with longterm follow-up and review of the literature. *Am J Surg Pathol* 29:1373–81.
- Miettinen M, Sobin L, Lasota J (2005b) Gastrointestinal stromal tumors of the Stomach: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 1765 cases with long-term follow up. *American Journal of Pathology* 29(1):52-68.
- Miettinen M and Lasota J (2005) KIT (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 13:205-220
- Mol CD, Lim KB, Sridhar V, Zou H, Chien EY, Sang BC, Nowakowski J, Kassel DB, Cronin CN and McRee DE (2003) Structure of a *c-kit* product complex reveals the basis for kinase transactivation. *J Biol Chem* 278:31461-31464
- Mol C, Dougan D, Schneider T, Skene R, Kraus M, Scheibe D, Snell G, Zou H, Sang BC, Wilson K (2004) Structural basis for the autoinhibition and STI-57 inhibition of *c-kit* tyrosine kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(30):31655-31663.

Moskaluk CA, Tian Q, Marshall CR, Rumpel CA, Franquemont DW, Frierson HF Jr. (1999) Mutations in the *c-kit* JM domain are found in a minority of human gastrointestinal stromal tumors. *Oncogene*, 18:1897–1902.

Murakami T, Hosomi N, Oiso N, Giovannucci-Uzielli M, Aquaron R, Mizoguchi M, Kato A, Ishii M, Bitner-Glindzicz M, Barnicoat A, Wilson L, Tsukamoto K, Ueda H, Mancini A, Suzuki T, Riley J, Miertus J, Camargo M, Santoro-Zea A, Atkin J, Fukai K (2005) Analysis of KIT, SCF, and initial screening of SLUG in patients with Piebaldism. *Journal of Investigative Dermatology: Letter to Editor*, 124: 670-672.

Nagata H, Worobec AS, Oh CK, Chowdhury BA, Tannenbaum S, Suzuki Y, Metcalfe DD. (1995) Identification of a point mutation in the catalytic domain of the protooncogene *c-kit* in peripheral blood mononuclear cells of patients who have mastocytosis with an associated hematologic disorder. *Proceedings of the National Academy of Science*, 92:10560-10564

Nakata Y, Kimura A, Katoh O, Kawaishi K, Hyodo H, Abe K, Kuramoto A, Satow Y (1995) *c-kit* point mutation of extracellular domain in patients with myeloproliferative disorders. *Br J Haematol* 91:661–663.

Ning ZQ, Li J, Arceci RJ (2001) Signal transducer and activator of transcription 3 activation is required for Asp(816) mutant *c-kit*-mediated cytokine-independent survival and proliferation in human leukemia cells. *Blood* 97:3559–3567.

Nishida T, Hirota S, Taniguchi M, *et al.* (1998) Familial gastrointestinal tumor with germline mutation of the KIT gene. *Nat Genet*, 19:323-324.

Plo I, Lautier D, Casteran N, Dubreuil P, Arock M, Laurent G (2001) Kit signaling and negative regulation of daunorubicin-induced apoptosis: role of phospholipase Cgamma. *Oncogene* 20:6752–6763.

Price DJ, Rivnay B, Fu Y, Jiang S, Avraham S, Avraham H (1997) Direct association of Csk homologous kinase (CHK) with the diphosphorylated site Tyr568/570 of the activated *c-kit* in megakaryocytes. *J Biol Chem* 272:5915–5920.

Reilly JT (2003) FLT3 and its role in the pathogenesis of acute myeloid leukaemia. *Leuk Lymphoma* 44:1–7

Robson ME, Glogowski E, Sommer G, *et al.* (2004) Pleomorphic characteristics of a germline KIT mutation in a large kindred with gastrointestinal stromal tumors, hyperpigmentation, and dysphagia. *Clin Cancer Res* 10:1250-1254.

Roskoski R, Jr. (2004) Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 324:1155-1164.

Roskoski R, Jr. (2005) Structure and regulation of Kit protein-tyrosine kinase--the stem

cell factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 338:1307-1315

Rosnet O, Schiff C, Pebusque M-J, Marchetto S, Tonnelle C, Toiron Y, Birg F, Birnbaum D (1993) Human FLT3/FLK2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells. *Blood* 82, 1110-1119.

Rossi P, Marziali G, Albanesi C, Charlesworth A, Geremia R and Sorrentino V (1992) A novel *c-kit* transcript, potentially encoding a truncated receptor, originates within a kit gene intron in mouse spermatids. *Dev Biol* 152:203-207

Russell ES (1979) Hereditary anemias of the mouse: a review for geneticists. *Adv Genet* 20:357-459.

Serve H, Hsu Y, Besmer P (1994) Tyrosine residue 719 of the *c-kit* receptor is essential for binding of the P85 subunit of phosphatidylinositol (PI) 3-kinase and for *c-kit*-associated PI 3-kinase activity in *cos-1* cells. *J Biol Chem*;269:6026-6030.

Serve H, Yee NS, Stella G, Sepp-Lorenzino L, Tan J C, Besmer P (1995) Differential roles of PI3-kinase and kit tyrosine 821 in kit receptor-mediated proliferation, survival, and cell adhesion in mast cells. *EMBO J* 14:473-483.

Sette C, Dolci S, Geremia R, Rossi P (2000) The role of stem cell factor and of alternative *c-kit* gene products in the establishment, maintenance and function of germ cells. *Int J Dev Biol* 44:599-608

Sherr CJ, Rettenmier CW, Sacca R, Roussel MF, Look AT and Stanley ER (1985) The *c-fms* proto-oncogene product is related to the receptor for the mononuclear phagocyte growth factor, CSF-1. *Cell* 41:665-676

Sircar K, Hewlett BR, Huizinga JD, Chorneyko K, Berezin I, Riddell RH (1999) Interstitial cells of Cajal as precursors of gastrointestinal stromal tumors. *Am J Surg Pathol*, 23:377-89.

Sihto H, Sarlomo-Rikala M, Tynninen O, Tanner M, Andersson LC, Franssila K, Nupponen NN, Joensuu H (2005) KIT and platelet-derived growth factor receptor alpha tyrosine kinase gene mutations and KIT amplifications in human solid tumors. *J Clin Oncol* 23:49-57.

Spritz RA, Droetto S, Fukushima Y (1992) Deletion of the KIT and *PDGFRA* genes in a patient with piebaldism. *Am J Med Genet* 44:492-495.

Spritz RA, Strunk KM, Lee ST, Lu-Kuo JM, Ward DC, Le Paslier D, Altherr MR, Dorman TE and Moir DT (1994) A YAC contig spanning a cluster of human type III receptor protein tyrosine kinase genes (*PDGFRA-KIT-KDR*) in chromosome segment 4q12. *Genomics* 22:431-436

Steelman L, Pohnert S, Shelton J, Franklin RA, Bertrand FE, McCubrey JA (2004) JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia* 18:189–218.

Strohmeyer T, Reese D, Press M, Ackermann R, Hartmann M, Slamon D (1995) Expression of the *c-kit* proto-oncogene and its ligand stem cell factor (SCF) in normal and malignant human testicular tissue. *J Urol* 153:511–515.

Tamborini E, Gabanti E, Lagonigro SM, Negri T, Pilotti S, Pierotti MA, Priol S (2005) KIT/Val654Ala Receptor Detected in One Imatinib-Resistant GIST Patient. *Cancer Research* 65, 1115.

Taniguchi M., Nishida T., Hirota S., Isozaki K., Ito T., Nomura T., Matsuda H., Kitamura Y. (1999) Effect of *c-kit* mutation on prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Research*, 59:4297-4300.

Tarn C., Merkel E., Canutescu A., Shen W., Skorobogatko Y., Heslin M., Eisenberg B., Birbe R., Patchefsky A., Dunbrack R., Arnoletti J., Mehren M., Godwin A. (2005) Analysis of KIT mutations in sporadic and familial gastrointestinal stromal tumors: therapeutics implications through protein modeling. *Clinical Cancer Research* 11(10):3668-3677.

Tarn C, Rink L, Merkel E, Flieder D, Pathak H, Koumbi D, Testa JR, Eisenberg B, Mehren M von, and AK Godwin (2008) Insulin-like growth factor 1 receptor is a potential therapeutic target for gastrointestinal stromal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 June 17; 105(24): 8387–8392. doi: 10.1073/pnas.0803383105.

Theou N, Tabone S, Saffroy R, Le Cesne A, Julié C, Cortez A, Lavergne-Slove A, Debuire B, Lemoine A, Emile JF (2004) Alto expression of both mutant and wild-type alleles of *c-kit* in gastrointestinal stromal tumors. *Biochim Biophys Acta* 1688:250–256.

Thomas SM, Brugge JS. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997;13:513–609.

Thommes K, Lennartsson J, Carlberg M, Rönnstrand, L (1999) Identification of Tyr-703 and Tyr-936 as the primary association sites for Grb2 and Grb7 in the *c-kit*/stem cell factor receptor. *Biochem J* 341:211–216.

Tian Q, Frierson H, Krystal G, Moskaluk C (1999) Activating *c-kit* gene mutations in Human Germ cell tumors. *American Journal of Pathology*, 154(6):1643-1647.

Tzen CY, Mau BL (2005) Analysis of CD117-negative gastrointestinal stromal tumors. *World J Gastroenterol* 11(7):1052-1055.

Ueda S, Mizuki M, Ikeda H, Tsujimura T, Matsumura I, Nakano K, Daino H, Honda Zi Z, Sonoyama J, Shibayama H, Sugahara H, Machii T, Kanakura Y (2002) Critical roles of *c-*

kit tyrosine residues 567 and 719 in stem cell factor-induced chemotaxis: contribution of src family kinase and PI3-kinase on calcium mobilization and cell migration. *Blood* 99:3342–3349.

Uchida M, Kirito K, Shimizu R, Miura Y, Ozawa K, Komatsu N (2001) A functional role of mitogen-activated protein kinases, erk1 and erk2, in the differentiation of a human leukemia cell line, UT-7/GM: a possible key factor for cell fate determination toward erythroid and megakaryocytic lineages. *Int J Hematol* 73:78–83.

Verweij J, Casali PG, Zalberg J, LeCesne A, Reichardt P, Blay JY, Issels R, van Oosterom A, Hogendoorn PC, Van Glabbeke M, Bertulli R, Judson I (2004) Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumours with high-dose imatinib: randomised trial. *Lancet*, 364 (9440):1127-34 (ISSN: 1474-547X)

Vosseller K, Stella G, Yee NS, Besmer P (1997) *c-kit* receptor signaling through its phosphatidylinositol-3'-kinase-binding site and protein kinase C: role in mast cell enhancement of degranulation, adhesion, and membrane ruffling. *Mol Biol Cell* 8:909–922.

Wandzioch E, Edling CE, Palmer RH, Carlsson L, Hallberg B (2004) Activation of the MAP-kinase pathway by *c-kit* is PI-3-kinase dependent in hematopoietic progenitor/stem cell lines. *Blood* 104(1):51-7

Weinberg R (1995) The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81:323-330.

Wollberg P, Lennartsson J, Gottfridsson E, Yoshimura A, Rönstrand, L (2003) The adapter protein APS associates to the multifunctional docking sites Tyr568 and Tyr936 in *c-kit*: possible role in v-Kit transformation. *Biochem J* 370:1033–1038.

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

Yamamoto H, Oda Y, Kawaguchi K, Nakamura N, Takahira T, Tamiya S, Saito T, Oshiro Y, Ohta M, Yao T, Tsuneyoshi M (2004) *c-kit* and *PDGFRA* mutations in extragastrointestinal stromal tumor. *Am J Surgeon Pathol* 28(4):479-488.

Yarden Y, Escobedo J, Kuang WJ, Yang-Feng T, Daniel T, Tremble P, Chen EY, Ando M, Harkins R, Francke U, Fried V, Ulrich A, Williams L (1986) Structure of the receptor for platelet-derived growth factor helps define a family of closely related growth factor receptors. *Nature* 323: 226-232.

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

Yuzawa S, Opatowsky Y, Zhang Z, Mandiyan V, Lax I, Schlessinger J (2007) Structural basis for activation of the receptor tyrosine kinase KIT by stem cell factor. *Cell* 130(2):323-34.

Zeng S, Xu Z, Lipkowitz S, Longley JB (2005) Regulation of stem cell factor receptor signaling by Cbl family proteins (Cbl-b/c-Cbl). *Blood* 105:226-232.

Zhang Z, Zhang R, Joachimiak A, Schlessinger J and Kong XP (2000) Crystal structure of human stem cell factor: implication for stem cell factor receptor dimerization and activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:7732-7737.

Zimpfer A, Went P, Tzankov A, Pehrs AC, Lugli A, Maurer R, Terracciano L, Pileri S, Dirmhofer S (2004) Rare expression of KIT (CD117) in lymphomas: a tissue microarray study of 1166 cases. *Histopathology*, 45(4):398-340.