

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA
HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
CENTRO DE PESQUISA EXPERIMENTAL

**TUMORES ESTROMAIS GASTROINTESTINAIS (GIST): FATORES DE RISCO E
ANÁLISE MOLECULAR EM 85 CASOS PROVENIENTES DO
HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
RIO GRANDE DO SUL**

Marcelle Reesink Cerski

Porto Alegre

Abril de 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA
HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
CENTRO DE PESQUISA EXPERIMENTAL

**TUMORES ESTROMAIS GASTROINTESTINAIS (GIST): FATORES DE RISCO E
ANÁLISE MOLECULAR DE 85 CASOS PROVENIENTES DO
HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
RIO GRANDE DO SUL**

Marcelle Reesink Cerski

Tese de Doutorado

Tese apresentada como requisito para obtenção do título de Doutora pelo Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadora: PROF^a.DRA. Luise Meurer
Co-orientadora: PROF^a.DRA. Ursula Matte

Cerski, Marcelle Reesink

Tumores estromais gastrointestinais (GIST):
Aspectos anatomopatológicos, imuno-histoquímicos,
clínicos e moleculares: série de 85 casos / Marcelle
Reesink Cerski – Porto Alegre: UFRGS, PPG: Ciências
em Gastroenterologia, 2010.

vi, 77f : il.; 29cm

Orientador: Luise Meurer

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia, 2010.

Referências Bibliográficas: f. 54-60

1. GIST. 2. Aspectos anatomopatológico
3. Aspectos clínicos. 4. Aspectos imuno-histoquímicos
5. Aspectos Moleculares 6. Gene *c-KIT* – Tese.
I. Meurer, L. II. Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, Programa de Pós-Graduação: Ciências em
Gastroenterologia. III. Título.

Temos uma vida humana de grande significado, é essencial que possamos reconhecer sua preciosidade, raridade e fragilidade. Hoje é especialmente necessário entender nossas visões de mundo, mentes, emoções, energias. São estes os elementos que dirigem nossas ações, as quais sendo positivas originam felicidades e, negativas, geram sofrimento para as pessoas que nos rodeiam, a humanidade em seu conjunto e a natureza.

Lama Padma Samten

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese à minha querida família, aos meus preciosos amigos, amigas e amiguinhas. Imensamente grata por todo o carinho recebido.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, PROF^a.DRA. Luise Meurer, por ter tido confiança no meu desempenho como aluna da pós-graduação e por ter-me motivado a realizar este projeto.

A minha co-orientadora, PROF^a.DRA. Ursula Matte, por ter tido muita paciência, dedicação e carinho comigo no desenvolvimento deste projeto, e por ter tido a oportunidade de conviver com toda a sua equipe no Laboratório de Terapia Gênica do Centro de Pesquisa do HCPA nestes quatro anos, onde vi de perto um trabalho muito sério sendo dirigido de forma leve e agradável.

A minha amiga bióloga e “professora” de bancada, Fernanda Pereira, por ter sido tão determinada, paciente e atenciosa para com as minhas dificuldades no Laboratório de Terapia Gênica desde a pipetagem até a interpretação do sequenciamento do DNA.

A .DRA. Patrícia Koehler dos Santos e a PROF^a.DRA. Patrícia Ashton-Prolla por ter tido a oportunidade de aprender a técnica de extração do DNA no Laboratório de Medicina Genômica do Centro de Pesquisa do HCPA.

Ao médico recém formado Felipe Lizandro Crusius pelos auxílios prestados nestes quatro anos na elaboração e execução deste projeto.

Aos técnicos; Flávia Giustti, Neiva Copetti e Jorge A. Lopes do Laboratório de Patologia do Centro de Pesquisa do HCPA pela confecção das lâminas e pelo carinho dispensado na elaboração deste trabalho.

À secretária Marisa R. de Oliveira, aos funcionários administrativos, aos técnicos, residentes, contratados e professores do Serviço de Patologia do HCPA por toda ajuda prestada.

Em especial à DRA. Lúcia M. Kliemann, por ter sido uma grande incentivadora deste projeto e por ser esta linda e especial amiga.

Ao amigo, biólogo e técnico, Luiz Eduardo Waengertner do Serviço de Patologia do HCPA pela sua preciosa colaboração na organização do banco de dados e revisão dos prontuários deste projeto.

A minha querida amiga e patologista Francine Hehn de Oliveira por toda assessoria prestada na formatação deste projeto, no “End Note” e na revisão bibliográfica.

A minha amiga Beatriz Maria de Azevedo Assis Brasil pela paciência e cuidado dispensado na revisão final deste projeto.

A minha amiga estatística, Ceres Oliveira, pela atenção dispensada e pelas numerosas explicações dadas.

Ao Prof. Dr. Alessandro Bersch Osvaldt pelas orientações recebidas.

Ao meu querido amigo Luis Gustavo Germano, pelo seu constante apoio e incentivo.

Ao PROF DR..Carlos Thadeu S. Cerski pela atenção dispensada na revisão final do texto.

Às secretárias deste curso, aos professores do programa de pós-graduação, aos professores convidados, e em especial aos coordenadores: Prof. Dr. Sérgio Gabriel S. de Barros e Prof. Dr. Renato Borges Fagundes pela oportunidade recebida.

Em especial, a todos os colegas mestrandos e doutorandos do Programa de Pós- Graduação: Ciências em Gastroenterologia da FAMED-UFRGS.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----|
| Lista de Abreviaturas | I |
| Lista de Figuras | II |
| Lista de Tabelas | III |
| Lista de Quadros | IV |
| Resumo | V |
| “Abstract” | VI |
| 1) Introdução..... | 1 |
| 2) Revisão bibliográfica | 3 |
| 2.1. Dados históricos e origem | 3 |
| 2.2. Epidemiologia | 4 |
| 2.3. Apresentação clínica | 5 |
| 2.4. Aspectos morfológicos | 5 |
| 2.5. Aspectos imuno-histoquímicos | 7 |
| 2.5.1. Marcadores imuno-histoquímicos diagnósticos..... | 7 |
| 2.5.2. Marcadores imuno-histoquímicos prognósticos..... | 8 |
| 2.6. Estratificação de Risco..... | 9 |
| 2.7. Biologia Molecular..... | 11 |
| 2.8. Tratamento..... | 15 |
| 2.9. Recorrência e principais fatores de mau prognóstico..... | 16 |
| 3) Justificativa | 17 |
| 4) Objetivos | 18 |
| 4.1. Objetivo geral..... | 18 |
| 4.2. Objetivos específicos..... | 18 |
| 5) Material e Métodos | 19 |
| 5.1. Delineamento..... | 19 |
| 5.2. Amostra..... | 19 |
| 5.3. Critérios de inclusão e exclusão..... | 19 |
| 5.3.1. Inclusão..... | 19 |
| 5.3.2. Exclusão..... | 19 |
| 5.4. Procedimentos..... | 19 |
| 5.4.1 Seleção de casos..... | 19 |
| 5.4.2. Diagnóstico histológico..... | 20 |
| 5.4.3 Dados clínicos e seguimento..... | 20 |
| 5.4.4 Categoria de risco (tamanho tumoral e índice mitótico..... | 20 |
| 5.4.5 Painel imuno-histoquímico..... | 21 |
| 5.4.6 Microdissecção..... | 22 |
| 5.4.7 Extração do DNA..... | 23 |
| 5.4.8 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)..... | 23 |
| 5.4.9 Sequenciamento do DNA..... | 23 |
| 5.4.10 Análise estatística..... | 24 |
| 5.4.11 Considerações éticas..... | 24 |

| | |
|--|----|
| 6) Resultados..... | 25 |
| 6.1. Características da amostra..... | 25 |
| 6.2. Aspectos clínicos..... | 25 |
| 6.3. Tipo histológico..... | 26 |
| 6.4. Tamanho tumoral..... | 27 |
| 6.5. Aspectos imuno-histoquímicos..... | 28 |
| 6.6. Aspectos mutacionais..... | 33 |
| 6.7. Curva de sobrevida..... | 36 |
| 7) Discussão | 42 |
| 8) Conclusões | 52 |
| 9) Referências Bibliográficas..... | 54 |

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP – Trifosfato de adenosina

cdk – ciclina quinase dependente

CEP – Comitê de Ética e Pesquisa

CGA – Campos de Grande Aumento

CIC – Células Intersticiais de Cajal

cm – centímetro/centímetros

Curva ROC – Curva *Receiver Operator Characteristic*

del/delins – deleção/deleção-inserção

DNA – ácido desoxirribonucléico

DOG1.1 – *Discovered On GIST*

dup – duplicação

EGFR – Epidermal Growth Fator Receptor (Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico)

FIPE – Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos

GIST – Tumores Estromais Gastrointestinais

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HE – Hematoxilina-Eosina

Hetero – heterozigoto

HIF-alpha – *Hipoxia-inducible fator-1 alpha* (fator-1 alfa Induzível por Hipóxia)

Homo – homozigoto

HPF – *High Power Field* (Campos de Grande Aumento)

IC – Intervalo de Confiança

kD – kilodaltons

mit – mitótico

NCCN – *National Comprehensive Cancer Network*

NIH – *National Institute of Health*

n – número

p – proteína

PCR – Reação em Cadeia de Polimerase

PDGFRA – Platelet-Derived Growth Factor Receptor Alpha (Receptor Alfa do Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas)

pm – mutação de ponto

S.P.S.S. – *Statistical Package for the Social Sciences*

SAMIS – Serviço de Arquivo Médico de Informação e Saúde

VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor (Fator de Crescimento Endotelial Vascular)

VEGFR-2 – Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 (Receptor 2 do Fator de Crescimento Endotelial Vascular)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ativação normal e anormal das tirosinas quinases. Mutações no gene *c-Kit* e no gene *PDGFRA* levam a autofosforilação do receptor (página 13).

Figura 2 – Fluxograma da seleção da amostra (página 26).

Figura 3 – Hematoxilina-Eosina (HE) em GIST gástrico com aumento de 10X (A); GIST de tipo histológico fusocelular com aumento de 100X (B) (página 27).

Figura 4 – CD117 em GIST de parede gástrica, mostrando positividade citoplasmática em aumento de 40X (A) e 100X (B) (página 30).

Figura 5 – Marcadores prognósticos em GIST, p16^{INK4A} com positividade citoplasmática e nuclear com aumento de 400X (A); Ki67 com positividade nuclear com aumento de 200X (B) (página 31).

Figura 6 – Avaliação prognóstica do Ki67 através da Curva ROC (página 31).

Figura 7 – Associação entre as categorias de risco, classificadas como alto e não alto risco, com índice proliferativo do Ki-67, em 71 casos de GIST (página 32).

Figura 8 – Associação entre o índice proliferativo do Ki-67 e o índice mitótico medido em 50 CGA em 85 casos de GIST (página 33).

Figura 9 – Fluxograma da análise mutacional para o gene *c-Kit* (página 34).

Figura 10 – Eletroferograma do sequenciamento do exon 11 do gene *c-Kit* (página 36).

Figura 11 – Curva de sobrevida dos 84 pacientes com GIST (página 38).

Figura 12 – Curva de sobrevida em relação aos marcadores prognósticos p16 e Ki67 em 84 casos de GIST (página 38).

Figura 13 – Curva de sobrevida em relação ao índice mitótico em 84 casos de GIST (página 39).

Figura 14 – Curva de sobrevida em relação à metástase em 84 casos de GIST (página 40).

Figura 15 – Avaliação da associação entre categorias de risco e a curva de sobrevida (página 41).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – GIST: contagem mitótica, tamanho do tumor e categoria de risco (página 28).

Tabela 2 – Marcadores imuno-histoquímicos (página 29).

Tabela 3 – Mutações encontradas no exon 11 do gene *c-Kit* em pacientes com GIST diagnosticados no HCPA entre janeiro de 1993 a julho de 2009 (página 35).

Tabela 4 – Associação entre as variáveis com a sobrevida dos pacientes de alto risco (página 41).

Tabela 5 – Fatores associados com a probabilidade de óbito através da Regressão Multivariada de Cox (página 42).

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Potencial de Malignidade dos GIST (NIH) (página 11).

Quadro 2 – Tamanho do tumor, localização e atividade mitótica como indicadores de malignidade nos GIST (página 11).

Quadro 3 – Risco de progressão da doença em GIST de acordo com o índice mitótico, tamanho e sítio primário da neoplasia (página 12).

Quadro 4 – Comparação das mutações identificadas em GIST entre vários estudos (página 14).

Quadro 5 – Correlações clínico-patológicas do “status” da mutação nos pacientes com GIST (página 15).

Quadro 6 – Anticorpos primários com seus respectivos clones e diluições (página 23).

Quadro 7 – “*Primers*” utilizados para a amplificação dos exons 9 e 11 do gene *c-Kit* (página 24).

Quadro 8 – Sítio primário e classificação da categoria de risco (NIH) em seis séries de GIST (n>100) adaptada; série brasileira (n=70) (página 45).

Quadro 9 – Ocorrência dos diferentes tipos de mutações para o exon 11 do gene *c-Kit* (página 49).

Resumo:

V

Introdução: GIST perfazem cerca de 70% dos tumores mesenquimais do trato gastrointestinal. Têm uma incidência de 1 a 2/100.000/ano sendo a forma esporádica observada em adultos, a mais comum. Para o diagnóstico definitivo de GIST é necessária a confirmação imuno-histoquímica, sendo que 90 a 95% dos casos são positivos para o marcador CD117. Os GIST apresentam um comportamento biológico incerto e a classificação em categorias de risco (tamanho tumoral e índice mitótico - NIH) tem sido validada em inúmeras séries. Marcadores imuno-histoquímicos prognósticos têm sido pesquisados amplamente principalmente o Ki67 e o p16^{INK4A}. Estudos genéticos mostram um percentual alto de mutações em GIST, sobretudo para as mutações localizadas no exon 11 do gene *c-Kit*.

Objetivo: caracterizar todos os casos de GIST diagnosticados no Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre de 01/01/1993 a 31/07/2009 do ponto de vista anatomopatológico, imuno-histoquímico, clínico e molecular.

Material e Métodos: os casos foram selecionados a partir do estudo das lâminas no HE e pelo seguinte painel imuno-histoquímico: CD117, CD34, S100, desmina e actina. Foram testados dois marcadores imuno-histoquímicos prognósticos: o Ki67 e o p16^{INK4A}. Os casos cirúrgicos foram classificados em categoria de risco segundo os critérios de Fletcher e cols. (NIH). O estudo molecular incluiu: extração do DNA, PCR e análise mutacional.

Resultados: a série é composta por 45 homens e 40 mulheres com uma média de idade de 58,4 anos. A localização gástrica foi a mais frequente (45,9%) seguida da intestinal (37,6%). O tipo histológico predominante foi o fusocelular presente em 74,1% dos casos. GIST classificados na categoria de risco muito baixo e baixo risco foram 28,2%, na categoria de risco intermediário, 23,9% e na categoria de alto risco, 47,9%. O marcador CD117 (proteína KIT) foi positivo em 97,6% dos casos de GIST. Entre os 85 casos, o marcador p16^{INK4A} apresentou positividade em 64,7% e Ki67 > 3% foi observado em 32,9%. Houve associação significativa entre as categorias de risco classificadas como alto e não alto risco com o Ki67 > 3% ($p = 0,001$) e do Ki67 > 3% com o índice mitótico ($r_s = 0,526$; $p < 0,001$). Em 60 casos foi possível o sequenciamento do exon 11 do gene *c-Kit*. Foram encontradas 29 mutações para este exon: 12 mutações de ponto, 10 deleções, 04 duplicações e 03 mutações duplas (deleção associada à mutação de ponto). A maioria das mutações foi observada entre os codons 550 e 560, "hot spot" descrito em estudos prévios. A curva de sobrevida mostrou um tempo de seguimento de 2,5 anos ($\pm 2,8$) e mediana de 1,5 anos, e foi estatisticamente significativa quando associada às metástases ($p = 0,025$) e ao índice mitótico ($p = 0,002$). Os fatores associados com a probabilidade de óbito através da Regressão de Cox foram o índice mitótico e o Ki67 > 3%.

Conclusões: os 85 casos de GIST do HCPA foram caracterizados do ponto de vista anatomopatológico, imuno-histoquímico, clínico e molecular. Negatividade para p16^{INK4} e Ki67 > 3% mostrou associação com um tempo de sobrevida mais curto. Houve associação entre o Ki67 > 3% e GIST classificados na categoria de alto risco. Não houve evidência de associação entre as mutações ou os tipos de mutação com as categorias de risco ou com a curva de sobrevida. Das variáveis que compõem a categoria de risco, o índice mitótico apresentou associação significativa com a sobrevida, sendo que os pacientes com mais de 10 mitoses em 50 campos de grande aumento apresentaram maior risco para óbito na análise multivariada. A contagem mitótica e o Ki67 são importantes marcadores prognósticos em pacientes portadores de GIST.

Abstract

VI

Introduction: Gastrointestinal stromal tumors (GIST) are the most common mesenchymal tumors of the gastrointestinal tract, representing 70% of these neoplasias, having an annual incidence of 1 to 2 /100.000/year. They are mostly sporadic and occurring mainly in adults. GIST are tumors of relative unknown behavior and a score of risk stratification was developed based on two criteria: maximum tumor size and mitotic index according to the National Institutes of Health (NIH) consensus, validated by several authors. Prognostic immunohistochemical biomarkers are mostly investigated, especially Ki67 and p16^{INK4A}. GIST have a high incidence of mutations affecting mainly exon 11 of the *c-Kit* gene.

Objective: the aim of this work was to study the anatomopathological, immunohistochemical, clinical, and molecular aspects of all GIST diagnosed by the Pathology Service at the HCPA (Hospital de Clínicas - Porto Alegre), from 01/01/1993 to 31/07/2009.

Material e Methods: diagnosis of GIST was confirmed after HE analysis and submission to the following immunohistochemical profile: CD117, CD34, S100, desmin and actin. Two prognostic immunohistochemical biomarkers were also analysed: Ki67 and p16^{INK4A}. Surgical cases were classified according to their risk stratification (NIH). Molecular study included: DNA extraction, PCR and mutational analysis.

Results: from a total of 85 cases, 45 were male and 40, female and the mean average age was 58.4 years. GIST were predominately located in the stomach (48.9%) followed by the small intestine (37.6%). Spindle cell morphology was present in 74.1% of these tumors. According to the NIH classification, 28.2% GIST were classified as very low or low risk category; 23.9% as intermediate risk and 47.9% belonged to the high risk category. CD117 (KIT protein) was expressed in 97.6% of all GIST in this study. From a total of 85 cases, 64.7% showed positivity for p16^{INK4A} and 32.9% had a Ki67 >3% index. There was a clear association between high risk category and non high risk category with Ki67>3% (p=0,001) and between Ki67>3% and a high mitotic index (>10 mitoses in 50 HPF), $r_s=0,526$; $p<0,001$. Eighty-three cases were submitted to molecular genetic analysis and 60 samples were successfully amplified and sequenced for exon 11 of the *c-Kit* gene. Out of the 29 mutations found for this exon 12 were point mutations, 10 were deletions, 04 were duplications and 03 were double mutations (deletion plus point mutation). Most of these mutations were present between codons 550 and 660, "hot spots" described in previous studies. The mean survival follow up period was 2.5 years ($\pm 2,8$) having a median time of 1.5 years. Survival rates were statistically significant when associated to metastases $p=0.025$ and to a high mitotic index ($p=0.002$). The multivariate Cox Regression analysis showed two independent risk factors indicating a poor prognosis: Ki67>3% and a high mitotic index.

Conclusions: anatomopathological, immunohistochemical, clinical and molecular aspects of 85 GIST were studied in this series. Negativity for p16^{INK4A} and a Ki67 >3% were associated to a shorter survival time. Ki67>3% was associated to GIST belonging to the high risk category group. No significant associations were seen concerning presence of mutation or type of mutation in relation to survival rate or risk categories. A high mitotic index (more than 10 mitoses in 50 HPF), one of the NIH risk criteria, was strongly related to a shorter survival time and was also seen as an independent factor for poor prognosis in GIST on multivariate analysis. Mitotic count and Ki67 are important predictors of outcome in patients with GIST.

1) Introdução

Tumores estromais do trato gastrintestinal (GIST) são tumores conhecidos por diferentes terminologias e agrupados, mais recentemente, sob esta denominação. Cerca de 70% das neoplasias mesenquimais do trato gastrointestinal são GIST, e estes representam 2% de todos os tumores gástricos, 14% dos tumores de intestino delgado e 0,1% dos tumores colônicos [1].

Estudos recentes sugerem que a sua origem esteja relacionada à célula de Cajal ou a uma célula em comum mais primitiva. A célula de Cajal é a célula marca-passo do trato gastrointestinal, responsável pela coordenação da motilidade [2-3].

GIST têm uma incidência de 1 a 2 casos/100.000/ano e ocorrem principalmente em pacientes adultos entre 40 e 80 anos de idade (média de 60 anos) [1, 4-5]. A forma esporádica é a apresentação mais comum, embora raros casos possam ser familiares [4-5]. Não existe uma prevalência importante em relação ao sexo, mas algumas séries mostram uma discreta predominância no sexo masculino [6]. A localização gástrica é a mais frequente, compreendendo cerca de 50 a 70% dos casos. A seguir, aparecem os casos localizados no intestino delgado (20% a 25%), esôfago, cólon e reto (10%). GIST são pouco frequentes em omento, mesentério, apêndice cecal e retroperitônio [4, 7].

A sintomatologia depende do tamanho, da localização e do comportamento biológico da neoplasia. Os principais sintomas são: sangramento, alterações da motilidade do trato gastrointestinal e, menos frequentemente, quadros obstrutivos. Sua via de metástase mais comum é a hemática, sendo o fígado e o peritônio os sítios mais acometidos. Os linfonodos regionais geralmente não estão comprometidos. O tratamento indicado é cirúrgico, com remoção completa da lesão e margens cirúrgicas livres, já que os GIST não respondem bem à radioterapia ou à quimioterapia convencional. A recorrência esperada ocorre em cerca de 29 a 54% dos casos [8].

Uma característica dos GIST é apresentar um comportamento biológico incerto. Lesões pequenas e primárias de menos de 2,0 cm de diâmetro e com baixo índice mitótico podem eventualmente evoluir de forma agressiva [9-11]. Muitos autores como Fletcher e colaboradores, relacionaram o tamanho da lesão e a contagem mitótica à agressividade da neoplasia [10]. Em 2002, o NIH (*National Institutes of Health*) passou a usar estes dois fatores para classificar os GIST em categorias de risco, descritas mais adiante. A localização também parece influenciar no

comportamento biológico destas lesões. GIST do intestino delgado podem ser malignos em aproximadamente 40% dos casos [11].

Atualmente, o diagnóstico de GIST é sugerido em exame anatomopatológico convencional e confirmado por imuno-histoquímica. Macroscopicamente, são lesões geralmente nodulares, únicas, não encapsuladas e bem delimitadas. Na histologia, 70% dos casos apresentam células de aspecto fusocelular, 20% de aspecto epitelióide e 10% podem apresentar os dois componentes celulares [7, 11]. Além do tamanho e do índice mitótico, outros fatores como invasão da mucosa, necrose tumoral e profundidade da lesão podem indicar um comportamento mais agressivo [11-14].

Na imuno-histoquímica, cerca de 90% a 95% dos GIST são positivos para a proteína KIT (CD117), com marcada positividade citoplasmática ou em área correspondente à zona de Golgi [1, 10, 14-15]. Outro marcador de interesse diagnóstico é o CD34, também presente em células precursoras hematopoiéticas, positivo em 60 a 70% dos casos. A actina pode ser focalmente positiva em até 40% dos casos. Raramente essas neoplasias são positivas para proteína S100 (menos de 5%) ou desmina (menos de 2%) [10, 15-16]. Em 2006, os marcadores imuno-histoquímicos recomendados por um grupo multidisciplinar internacional de estudos em GIST foram: CD117, CD34, vimentina, actina, proteína S100 e desmina [1]. A realização do painel imuno-histoquímico recomendado pode ainda esclarecer dúvidas em relação aos principais diagnósticos diferenciais: leiomiomas, leiomiossarcomas, tumores desmóides, fibromatoses e schwannomas [17-19].

Entre os principais marcadores imuno-histoquímicos de interesse prognóstico se encontram os marcadores de proliferação celular como o Ki67. Muitos estudos apontam o marcador Ki67 como sendo um fator independente de mau prognóstico para GIST [20-24]. Outras proteínas do ciclo celular como o p16^{INK4} e o p27 tendem a ter a sua expressão diminuída em GIST mais agressivos [24-26]. Marcadores angiogênicos também tem sido descritos e a sua expressividade aumentada está associada às neoplasias mais agressivas [27-28].

Hirota e cols., em 1998, foram os primeiros pesquisadores a descreverem mutações no gene *c-Kit* nestas neoplasias [29]. Desde então, inúmeros estudos genéticos vem sendo realizados [30-41]. O percentual de mutações esperadas para o gene *c-Kit* em GIST é em torno de 50 a 88%, localizadas principalmente nos exons 11 e 9, sendo as do exon 11 as mais frequentes [34-41]. Heinrich e cols., em 2003, descreveram mutações para os GIST, em um gene com função similar

ao *c-Kit*, o *PDGFRA* (receptor alfa do fator de crescimento derivado de plaqueta) [42]. Mutações no *PDGFRA* em GIST são esperadas em torno de 10 % dos casos, ocorrendo predominantemente nos exons 18 e 12. GIST que não apresentam as mutações descritas para os genes *c-Kit* e *PDGFRA* são classificados como GIST do tipo selvagem “*wild type*”. Estudos realizados até a presente data concordam serem essas mutações excludentes, isto é, pacientes que apresentam mutações em *c-Kit* não apresentam mutação em *PDGFRA* [36-37, 40].

A classificação dos GIST em categorias de risco, a identificação de marcadores imuno-histoquímicos prognósticos e a análise mutacional têm um papel relevante, pois permitem identificar pacientes que se beneficiariam com o uso de quimioterápicos moleculares específicos como o mesilato de imatinib ou outros similares [12, 36, 40-45].

2) Revisão Bibliográfica

2.1) Dados históricos e origem

Tumores estromais do trato gastrointestinal foram classificados durante várias décadas como provenientes da musculatura lisa da parede gastrointestinal e denominados, na sua grande maioria, como leiomiomas, leiomiossarcomas ou leiomioblastomas. Com o advento da microscopia eletrônica, no final da década de 60, sua origem em tecido muscular foi questionada, uma vez que poucas neoplasias apresentaram características ultra-estruturais de fibra muscular lisa [45]. Na década de 80, com o advento da imuno-histoquímica, observou-se que estes tumores estromais raramente apresentavam positividade para marcadores de tecido muscular liso. Em 1983, Mazur e Clark, com base nos achados imuno-histoquímicos e ultraestruturais, sugeriram terem estas neoplasias sua origem em células do plexo mioentérico, provavelmente nas células intersticiais de Cajal (CIC). Estes autores propuseram a utilização de uma terminologia mais genérica: tumor estromal do trato gastrointestinal (GIST) [46]. Em 1994, o CD34, marcador imuno-histoquímico hematopoiético, se mostrou extremamente útil para a identificação de GIST apresentando alta positividade. A hipótese de que os GIST teriam a sua origem relacionada às CIC, células marca-passo do plexo mioentérico, se fortaleceu, uma vez que estas são também fortemente positivas para o CD34 [47-48]. Em 1998, Hirota e cols. identificaram o CD117, proteína KIT, como marcador diagnóstico universal para os GIST, com uma positividade de 94%

em sua série de 49 casos. Nesta mesma série, cinco entre seis casos analisados apresentaram mutações para o gene *c-Kit* [29]. Em 2003, Heinrich e cols. encontraram mutações no *PDGFRA* (receptor alfa do fator de crescimento derivado de plaquetas) em alguns casos de GIST [42]. Atualmente, este conjunto de marcadores imuno-histoquímicos (CD117 e CD34) e moleculares (*c-Kit* e *PDGFRA*) são os mais estudados em GIST [30][40] [41].

2.2) Epidemiologia

Cerca de 70 a 80% dos tumores de origem mesenquimal do trato gastrintestinal são GIST e estes representam 5% de todos os sarcomas [8]. Estudos populacionais realizados na Suécia e Irlanda mostram uma incidência de 11-14,5 /1.000.000/ ano [5, 49]. Uma incidência maior, de 20 casos/1.000.000/ano foi observada na Noruega [50]. Nos Estados Unidos a prevalência é de 5000 a 6000 casos novos/ano [5, 49-50]. Não existem dados quanto à incidência no Brasil. Não há uma nítida predominância em relação ao sexo; mas alguns estudos mostram uma discreta predominância no sexo masculino [5-6].

Os pacientes em geral têm uma média de idade de 60 anos [5, 49-50]. GIST ocorrem muito raramente em pacientes com menos de 40 anos. Formas pediátricas são esperadas em 1 a 2% dos casos [51-52]. Existem ainda raros casos de GIST hereditários, GIST associados à neurofibromatose tipo 1 e à tríade de Carney [53-54]. A localização gástrica é a mais frequente, seguida do intestino delgado, colon, reto, esôfago e menos frequentemente outras localizações como: omento, mesentério, retroperitônio, apêndice e vesícula biliar [10]. Tumores mesenquimais primários esofágicos, em sua grande maioria, após estudos imuno-histoquímicos são diagnosticados como leiomiomas.

GIST como um achado incidental, “*tumorlet*”, tem sido descrito em várias séries [55-58]. Agaimy e cols., em 2007, publicaram um artigo em que foram observados GIST incidentais em 25% dos indivíduos com idade acima de 50 anos em material de necropsia. Mutações no gene *c-Kit* foram identificadas na maioria desses casos [55]. Liszka e cols., encontraram GIST incidentais em cerca de 26,8% dos casos na presença de outras neoplasias, sendo que 11% foram coexistentes com carcinoma colo-retal [58].

2.3) Apresentação clínica

A sintomatologia depende do tamanho, localização e comportamento biológico da neoplasia. Aproximadamente 70% dos casos de GIST apresentam sintomas clínicos, 15% são assintomáticos e 15%% relacionados a achados incidentais[11]. Entre 15 a 47% dos casos, no momento do diagnóstico, apresentam doença metastática [49-50, 59-60].

GIST são neoplasias essencialmente intra-abdominais, tendo como achados clínicos principais: fadiga relacionada à anemia, saciedade precoce e flatulência. Os principais achados relacionados à presença de sangramento são hematêmese, melena, enterorragia, anemia crônica normocítica ou hipocrômica. Uma minoria dos GIST, geralmente tumores maiores, pode ser palpada e apresentar um quadro obstrutivo [59-60].

O diagnóstico por imagem pode ser feito através de ecografia, tomografia computadorizada, ressonância magnética ou tomografia com emissão de pósitrons [59]. Exames endoscópicos podem ser de ajuda diagnóstica e punção aspirativa para fins diagnósticos, tem sido descrita em alguns estudos [61-62].

O tratamento indicado é essencialmente cirúrgico, com remoção completa da lesão e margens cirúrgicas livres. A recorrência esperada é em torno de 29 a 54% [8, 12, 63]. As metástases mais frequentemente se localizam no fígado e peritônio, sem haver um acometimento dos linfonodos regionais. Em adultos, metástases pulmonares, ósseas e em partes moles são menos frequentes e ocorrem em situações mais tardias. A maioria das metástases ocorre nos primeiros cinco anos após ressecção cirúrgica inicial, mas existem relatos da presença de metástases após 20 anos do diagnóstico inicial de GIST. Portanto, um acompanhamento clínico por longos períodos de tempo está indicado, uma vez que lesões inicialmente benignas podem evoluir por anos e apresentarem, posteriormente, um comportamento biológico mais agressivo [41] [59].

2.4) Aspectos morfológicos

Macroscopicamente, GIST são lesões nodulares, não encapsuladas, bem delimitadas, altamente vascularizadas e localizadas na parede do trato gastrointestinal. Tumores grandes podem

apresentar áreas de hemorragia, degeneração cística e/ou necrose, mesmo na ausência de tratamento quimioterápico prévio [41, 59].

A distribuição topográfica dos tumores estomais no estômago se dá de forma diferente da observada nos adenocarcinomas, em que se observa um predomínio das lesões no terço distal. GIST gástricos têm uma localização predominantemente em terço médio, seguido do terço proximal e menos frequentemente comprometem o terço distal [64].

Microscopicamente, 70% dos casos apresentam células de aspecto fusocelular, 20% de aspecto epitelióide e 10% podem apresentar ambos componentes celulares [10]. Miettinen e Lasota, em um estudo de 1765 casos de GIST gástricos, subdividiram os GIST em oito subtipos: 4 subtipos fusocelulares e 4 subtipos epitelióides. Os GIST fusocelulares foram subdivididos em: variante esclerosante, variante paliçada–vacuolizada, variante hipercelular e variante sarcomatosa. Os GIST epitelióides também foram subdivididos em: variante esclerosante epitelióide, variante discoesiva, variante hipercelular e variante sarcomatosa [13].

Subtipos histológicos de localização intestinal também foram descritos: variante esquenoide “*skenoid fibers*”, variante epitelióide, variante com áreas anucleadas e variante sarcomatoide. A variante intestinal “*skenoid fibers*” envolvendo jejuno e íleo tem um interesse especial, pois cursa com um melhor prognóstico [13]. Os aspectos morfológicos, no conjunto, não tiveram impacto importante quando relacionados ao prognóstico dos pacientes. A contagem mitótica e o tamanho da neoplasia foram as variáveis prognósticas mais importantes [13, 35].

Miettinen e Lasota, em 2006, publicaram um artigo correlacionando os subtipos histológicos de GIST com os aspectos patológicos e prognósticos específicos para diferentes localizações [65].

GIST intestinais podem ser malignos em cerca de 40% dos casos [10-11]. Entre os marcadores morfológicos de maior agressividade da lesão podemos citar: invasão da mucosa, presença de necrose, ulceração, ruptura tumoral e profundidade da lesão [60].

2.5) Aspectos imuno-histoquímicos

2.5.1) Marcadores imuno-histoquímicos diagnósticos

A proteína KIT (CD117) é o principal marcador diagnóstico, positivo em 90 a 95% dos GIST. Sua positividade está expressa no citoplasma celular ou em área correspondente a zona de Golgi [12-14, 41]. A proteína KIT atua como fator regulador do crescimento celular ou formador de colônia, essencial no desenvolvimento de diversos tipos celulares, entre eles a célula intersticial de Cajal [7, 31]. KIT é um receptor do tipo tirosina quinase, codificada pelo proto-oncogene *c-Kit*, mapeado no cromossomo 4 (4q11-12). A proteína KIT possui 145–160 kD e está expressa em células tronco hematopoiéticas, mastócitos, células basais da pele, melanócitos, células epiteliais da mama, células germinativas e células intersticiais de Cajal. Esta proteína atua como receptor do fator de célula tronco “*stem cell factor*” e, quando ativada, leva à fosforilação da proteína desencadeando processos celulares associados à diferenciação e à proliferação celular [31, 45]. Sua expressão é uma característica tumoral, independente de haver ou não mutação no gene *c-Kit*. GIST negativos para CD117 (2 a 10% dos casos) geralmente têm uma localização preferencial gástrica e morfologicamente um padrão epitelióide ou misto [35, 65].

O CD34, marcador de células endoteliais, é uma proteína transmembrana glicosilada com 110 kD, codificada no cromossomo 1, com função de adesão celular e apresenta positividade em cerca de 80 a 85% dos GIST gástricos e em 50% dos GIST de intestino delgado. O CD34 é principalmente positivo nos GIST de localização esofágica e retal (95-100%) [44]. Entre os GIST gástricos a variante morfológica fusocelular tem uma maior positividade para o CD34 (90%) quando comparada à variante epitelióide (58%) [65].

Em 2006, os marcadores imuno-histoquímicos recomendados por um grupo multidisciplinar internacional de estudos em GIST foram: KIT (CD117), CD34, vimentina, actina, proteína S100 e desmina [1]. A actina (alfa actina de músculo liso) tem uma positividade focal esperada em 20% dos GIST gástricos e em 35 a 40% dos de intestino delgado. Positividade para a actina tem sido correlacionada a um prognóstico mais favorável [13, 35, 41, 65]. S100, um marcador neural, raramente é positivo em GIST gástricos e positividade para o S100 nesta localização pode estar associado a um pior prognóstico. Cerca de 14% dos GIST intestinais podem apresentar áreas de diferenciação neural e menos de 2% dos GIST apresentam

positividade focal para a desmina [5, 41, 47, 65]. GIST são sistematicamente positivos para a vimentina, marcador mesenquimal [1, 10].

A realização do painel imuno-histoquímico recomendado pode esclarecer dúvidas em relação aos principais diagnósticos diferenciais (leiomiomas, leiomiosarcomas, schwannomas, tumores fibrosos solitários, pólipos inflamatórios gástricos e tumores desmoides) [18-19, 65]. Leiomiomas e leiomiosarcomas são uniformemente negativos para CD34 e CD117 e positivos para marcadores musculares como actina e desmina. Os schwannomas são negativos para o CD34 e para o CD117 e fortemente positivos para a proteína S100 e para a proteína glial ácida fibrilar. Tumores fibrosos solitários podem ser positivos para CD 34, mas são negativos para CD117, actina, desmina e S100. Pólipos inflamatórios gástricos são lesões raras, benignas e positivas para CD34, geralmente CD117 negativos e apresentam um exuberante processo inflamatório [1, 19, 49, 65]. Tumores desmoides, podem apresentar positividade para CD117 e o diagnóstico diferencial deverá ser feito com a beta-catenina, que é negativa para GIST e positiva em praticamente 100% dos casos em tumores desmoides ou fibromatoses mesentéricas [66].

2.5.2) Marcadores imuno-histoquímicos prognósticos

Entre os principais marcadores imuno-histoquímicos prognósticos estão os marcadores de proliferação celular, sendo Ki67 o mais utilizado para diferentes neoplasias malignas [67]. O Ki67 é uma fosfoproteína nuclear de função ainda desconhecida e com provável participação na organização cromatínica celular. A proteína reconhecida pelo anticorpo monoclonal Ki67 está relacionada com o gene MKI67, localizado no braço longo do cromossomo 10. Seu anticorpo análogo, MIB-1, é amplamente utilizado principalmente em blocos de parafina. Ki67 é uma proteína expressa no núcleo celular em todas as fases do ciclo celular, com exceção da interfase, possibilitando a identificação de células em proliferação sem a necessidade de se reconhecer figuras mitóticas à microscopia óptica [67-68]. O percentual de células positivas para o marcador nuclear Ki67 é conhecido como índice de proliferação. Diferentes pontos de corte têm sido descritos para avaliação do índice proliferativo do Ki67 em diferentes neoplasias malignas. Em GIST, índices mais elevados têm sido correlacionados com tumores mais agressivos e alguns estudos mostram o Ki67 como um fator independente de mau prognóstico em GIST [9, 24, 69-71].

Expressão aumentada, em GIST, também foi observada para outras proteínas reguladoras do ciclo celular como o p53 [72]. A proteína p53 é uma proteína supressora tumoral, considerada como um mediador do ciclo celular que induz a parada do ciclo e apoptose. Um aumento da expressão do p53 é frequentemente observado em neoplasias mais agressivas, sendo um indicador de mau prognóstico [71-73].

Outras proteínas do ciclo celular tendem a ter sua expressão diminuída em GIST mais agressivos. Entre essas, a proteína p16^{INK4A} tem sido a mais amplamente estudada [24, 74-78]. O gene responsável pela codificação da proteína p16^{INK4A} está localizado no braço curto do cromossomo 9 e é considerado um gene de supressão tumoral. O p16^{INK4A} é uma proteína reguladora do ciclo celular pertencente ao complexo inibidor cdk (ciclina quinase dependente), que controla o ciclo celular na fase G1/S. A perda da expressão do p16^{INK4A} parece estar relacionada com a progressão tumoral [24, 75-77, 79].

A Bcl2 (B ciclina 2), uma proteína pequena, com ação antiapoptótica localizada nas membranas de organelas intracitoplasmáticas, foi testada em algumas séries de GIST, mas não foi considerada um bom marcador prognóstico, pela maioria dos autores [70, 73, 79].

Moléculas de adesão como proteínas do grupo CD44, têm sido utilizadas em diferentes neoplasias como marcadores prognósticos, sendo que uma diminuição da sua expressão estaria relacionada às neoplasias mais agressivas. Em GIST, os resultados têm sido controversos. Em um estudo brasileiro, o CD44v3, uma variante do CD44 relacionada à carcinogênese, foi testada em 343 casos de GIST e os resultados foram sistematicamente negativos. O EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico) foi pesquisado nesta mesma série com alta positividade (84%), porém na literatura os resultados para este marcador têm sido controversos [39].

2.6) Estratificação de risco

Uma característica dos GIST é apresentar um comportamento biológico incerto. Lesões pequenas e com baixo índice mitótico podem eventualmente apresentar uma evolução desfavorável [9]. Assim, autores como Fletcher e colaboradores, relacionaram o tamanho do tumor e a contagem mitótica [número de mitoses por 50 campos de grande aumento (CGA)] a uma maior agressividade tumoral [10]. Em 2002, o *NIH (National Institutes of Health)* aprovou o uso destas duas variáveis para classificar os GIST em categorias de risco. Esta classificação é

também conhecida por *NIH Risk Stratification Categories* (Estratificação de Risco do *NIH*) (Quadro 1).

Quadro 1 – Potencial de Malignidade do GIST (*NIH*)

| CATEGORIA DE RISCO | TAMANHO DO TUMOR | INDICE MITÓTICO |
|---------------------|---|---|
| RISCO MUITO BAIXO | < 2,0 cm | <5/50 CGA |
| BAIXO RISCO | 2,0 – 5,0 cm | < 5/50 CGA |
| RISCO INTERMEDIÁRIO | < 5,0 cm 5,0 – 10,0 cm | 6-10/50 CGA |
| ALTO RISCO | > 5,0 cm > 10,0 cm qualquer tamanho | >5/50 CGA qualquer índice > 10/50 CGA |

(Fletcher e cols., 2002,[10])

A localização dos GIST parece também influenciar no seu comportamento biológico [11]. Ainda em 2002, Miettinen e cols. introduziram esta variável na categoria de risco dos GIST (Quadro 2).

Quadro 2 – Tamanho do tumor, localização e atividade mitótica como indicadores de malignidade nos GIST

| |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • Provavelmente Benignos: Intestinais: diâmetro máximo $\leq 2,0$ cm e contagem mitótica ≤ 5 mitoses/50 CGA. Gástricos: diâmetro máximo $\leq 5,0$ cm e contagem mitótica ≤ 5 mitoses/50 CGA. |
| <ul style="list-style-type: none"> • Provavelmente Malignos: Intestinais: diâmetro máximo $> 5,0$ cm e contagem mitótica > 5 mitoses/50 CGA. Gástricos: diâmetro máximo $> 10,0$ cm e contagem mitótica > 5 mitoses/50 CGA. |
| <ul style="list-style-type: none"> • Comportamento Incerto ou baixo potencial de malignidade: Intestinais: diâmetro máximo $> 2,0$ cm e $\leq 5,0$ cm e contagem mitótica ≤ 5 mitoses/50 CGA. Gástricos: diâmetro máximo $> 5,0$ e $\leq 10,0$ cm e contagem mitótica ≤ 5 mitoses/50 CGA. |

(Miettinen e cols., 2002, [11])

Em 2007, de acordo com as diretrizes do *National Comprehensive Network Cancer (NCCN)*, os GIST foram classificados em relação ao risco de progressão de doença, localização, índice mitótico e tamanho tumoral [13, 35, 41, 65] (Quadro 3).

Quadro 3 - Risco de progressão da doença em GIST de acordo com o índice mitótico, tamanho e sítio primário da neoplasia

| Parâmetros Tumorais | | Risco de Progressão da Doença (%) | | | |
|--------------------------|------------|-----------------------------------|---------------------|---------------|---------------------|
| | Tamanho | Gástrico | Duodeno | Jejuno/Íleo | Reto |
| | ≤2 cm | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Índice Mitótico | >2 ≤5 cm | Muito baixo (1.9) | Baixo (8.3) | Baixo (4.3) | Baixo (8.5) |
| ≤ 5 por 50 CGA | > 5 ≤10 cm | Baixo (3.6) | Dados Insuficientes | Moderado (24) | Dados Insuficientes |
| | >10 cm | Moderado (10) | Alto (34) | Alto (52) | Alto (57) |
| | ≤2 cm | 0 | Dados Insuficientes | Alto | Alto (54) |
| Índice Mitótico | >2 ≤5 cm | Moderado (16) | Alto (50) | Alto (73) | Alto (52) |
| > 5 por 50 CGA | >5 ≤10 cm | Alto (55) | Dados Insuficientes | Alto (85) | Dados Insuficientes |
| | >10 cm | Alto (86) | Alto (86) | Alto (90) | Alto (71) |

(Liegler, 2009, [41])

Contudo a classificação inicial de Fletcher e col. de 2002 e sobretudo a de Miettinen e cols. também de 2002, são as mais utilizadas em diferentes séries de GIST e validadas como um importante fator prognóstico nestas neoplasias. [10,11]

2.7) Biologia molecular

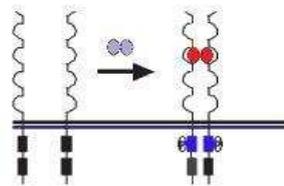
Além dos estudos imuno-histoquímicos, estudos genéticos estão sendo realizados na tentativa de encontrar marcadores diagnósticos e prognósticos de GIST [30-41].

O KIT é uma glicoproteína transmembrana, receptor da tirosino-quinase, codificada pelo gene *c-Kit* que está localizada no cromossomo 4, mais precisamente na região 4q12-13. A glicoproteína KIT, em condições normais, interage com o fator de célula-tronco ocorrendo a dimerização, fosforilação e ativação da cascata das tirosino-quinases. A presença dessa

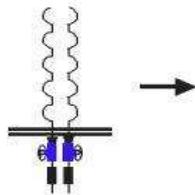
glicoproteína é fundamental para a proliferação, sobrevivência, desenvolvimento e diferenciação das células intersticiais de Cajal, células progenitoras do sistema hematopoiético, mastócitos, melanócitos e células germinativas e tem importante função na proliferação celular, adesão, quimiotaxia, apoptose e diferenciação celular [31-32, 34, 45]. As formas mutantes ativam as tirosino quinases na ausência do ligante, o fator de célula tronco (Figura 1).

SINALIZAÇÃO NORMAL E ANORMAL KIT/PDGFR α

A SINALIZAÇÃO NORMAL KIT/PDGFR α



B PATOGÊNESE DO GIST



fator de célula tronco



dimerização



fosforilação com ativação da cascata das tirosino quinases

(Adaptado de Rubin, B. P., 2006,[45])

Figura 1 - Ativação normal e anormal das tirosinas quinases. Mutações no gene *c-Kit* e no gene *PDGFR α* levam a autofosforilação do receptor.

As mutações no gene *c-Kit* podem ser divididas em duas categorias: mutações dos domínios regulatórios, incluindo as regiões justamembranares intra e extracelulares (exons 11 e 9, respectivamente), e mutações intracelulares de domínio enzimático (exons 13 e 17, respectivamente) [45, 78, 80]. As mutações mais frequentes são encontradas nos domínios

regulatórios, principalmente mutações no exon 11 [31-37, 45, 60]. Mutações nos exons 17 ou 13 são extremamente raras, geralmente relacionadas a casos familiares [80]. Mutações no gene *c-Kit* provavelmente ocorrem em uma fase muito inicial da progressão tumoral, pois foram observadas em GIST incidentais com menos de 1cm de diâmetro [37, 55-56].

Um percentual de GIST, 2 a 10%, não expressa a proteína KIT [1, 7, 10, 41]. Nestes casos foram identificadas mutações em outros genes, como a mutação localizada no receptor alfa do fator de crescimento plaquetário (*PDGFRA*) [42]. Estas mutações ocorrem, sobretudo, no exon 18 e mais raramente no exon 12. O gene do *PDGFRA* também está localizado no cromossomo 4, na região 4q12, fazendo parte das proteínas receptoras da tirosina quinase classe III. Mutações no gene *c-Kit* e *PDGFRA* são excludentes entre si [30, 34-35, 41-42, 78].

A proporção de mutações esperadas para estes dois genes em GIST em diferentes estudos é de 50,8% a 92,9% e para as mutações localizadas no exon 11 do gene *c-Kit* de 28,3% a 68,8% (Quadro 4).

Quadro 4 – Comparação das mutações identificadas em GIST entre vários estudos

| País | GIST gástrico% | KIT | | | | PDGFRA | Taxa de Mutação |
|-----------------|----------------|--------|---------|---------|---------|--------|-----------------|
| | | Exon 9 | Exon 11 | Exon 13 | Exon 17 | | |
| EUA (n=127) | NI | 18.1% | 66.9% | 1.6 % | 1.6% | 4.7% | 92.9% |
| EUA (n=125) | 50 | 5.6% | 68.8% | 0% | 0% | 5.6% | 80.0% |
| China (n=155) | NI | 7.1% | 67.1% | 1.3 % | 0.6% | 3.2% | 79.4% |
| EUA (n=145) | 0 | 11.7% | 62.1% | 0% | 0.7% | 0% | 74.5% |
| Taiwan (n=134) | 50 | 9.7% | 59.0% | 0% | 0% | 0.7% | 69.4% |
| Suécia (n=177) | 55 | 3.4% | 57.1% | 0% | 0.6% | 3.4% | 64.4% |
| Espanha (n=162) | 57.4 | 2.7% | 47.5% | 0.6 % | 0% | 8.6% | 59.4% |
| EUA (n=421) | 100 | 0% | 28.3% | 0% | 0% | 22.5% | 50.8% |
| Brasil (n=74) * | NI | 4.1% | 58.1% | 0% | 0% | 8.1% | 70.3% |

NI= não informado; (Adaptada de Tzen C.Y. e cols., 2008,[40]); * (Lopes L. F. e cols., 2008,[39])

Existe uma nova proposta de classificação molecular para os GIST, que leva em consideração também os aspectos moleculares. Esta classificação divide as formas esporádicas em mutação no gene *c-Kit*, mutação no gene *PDGFRA* e tumores sem mutação nesses genes, também chamados de “*wild type*” [45]. A importância desta classificação molecular reside no fato de que a localização da mutação condiciona a resposta terapêutica ao mesilato de imatinib (STI 571, Gleevec; Novartis Pharmaceuticals, Basel Switzerland) ou similares [41, 43, 45, 74, 78, 81-82] (Quadro 5).

Quadro 5 – Correlações clínico-patológicas do “status” da mutação nos pacientes com GIST.

| Tipo de Mutação | Frequência Aproximada | Tipo Histológico | Sítio Anatômico | Susceptibilidade ao mesilato de imatinib <i>in vitro</i> | Resposta Imatinib mesylate “ <i>in vivo</i> ” |
|--|-----------------------|--|-----------------|--|---|
| Mutação KIT | 80 – 85% | predominância de células fusocelulares | Intestino del. | Sim | Intermediária |
| Exon 9 | 10% | | | | |
| Exon 11 | 60 – 70% | | | | |
| Exon 13 | 1% | | | | |
| Exon 17 | 1% | | | | |
| Mutação PDGFRA | 5 – 10% | Presença de células epitelioides e fusocelulares | Estômago | Sim | Alguma resposta |
| Exon 12 | 1% | | | | |
| Exon 14 | <1% | | | | |
| Exon 18 | 6% | | | | |
| “Wild-type” ‘TIPO SELVAGEM’ mutação não KIT/ não PDGFRA | 10% | Predominância de células fusocelulares | | Não | Pobre |

(Adaptado de Rubin, B. P., 2006, [45])

O mesilato de imatinib é um inibidor das tirosinas quinases, atuando nas proteínas KIT e PDGFRA, utilizado com sucesso em casos de leucemia mieloide crônica, dermatofibrossarcoma protuberans e leucemia mielomonocítica crônica [14-16]. GIST CD117 positivos e não responsivos ao tratamento convencional, apresentam em geral uma boa resposta terapêutica ao

mesilato de imatinib. GIST com mutação no exon 11 são particularmente responsivos [14-16, 45, 78, 82]. A mutação mais frequente, presente em cerca de 25% dos GIST, é a deleção WK557-558 localizada no exon 11 do gene *c-Kit* [83-84]. Muitos estudos mostram que as mutações localizadas no exon 11 ocorrem predominantemente em GIST gástricos e frequentemente estão classificadas na categoria de alto risco segundo (NIH) [83-84].

Análises multivariadas mostraram que mutações do tipo deleção e deleção-inserção envolvendo sobretudo os codons 557 e 558 do exon 11 do gene *c-kit*, podem ser consideradas como fatores independentes de mau prognóstico [63, 85]. A presença de mutações de ponto e/ou duplicações no exon 11 neste mesmo gene está associada a um comportamento biológico menos agressivo [63].

2.8) Tratamento

O tratamento indicado, convencional, é a ressecção cirúrgica completa com margens cirúrgicas livres. A ressecção R0 (ausência de doença residual) representa um dos fatores mais importantes para o resultado do tratamento (intervalo livre de doença e sobrevida), sendo alcançada em torno de 40 a 60% dos GIST [86]. Em caso de recidiva local ou de lesões metastáticas, nova cirurgia poderá ser planejada. Não há necessidade de dissecação linfonodal, pois assim como os sarcomas, os GIST raramente acometem linfonodos regionais disseminando-se frequentemente por via hemática [63, 78].

A descoberta de mutações na gênese e progressão dos GIST permitiu o uso de drogas específicas para essas neoplasias [87]. Um primeiro paciente, com GIST irresssecável e metastático, previamente tratado com quimioterapia convencional, sem sucesso, recebeu o mesilato de imatinib. Houve uma resposta marcante, iniciando uma nova era para o tratamento dos GIST [88]. O mesilato de imatinib deve ser administrado de forma contínua, exceto quando houver franca progressão da doença ou a presença de efeitos indesejáveis que comprometam o estado geral do paciente [89-90]. Em 2009, foi publicado um estudo clínico randomizado em fase III (NCT00041197), duplo cego, demonstrando o benefício do uso do mesilato de imatinib como tratamento adjuvante em GIST primários, localizados, submetidos previamente à cirurgia. Houve redução estatisticamente significativa da recorrência tumoral após um ano de observação [91].

Apesar de efetivo na maioria dos casos (respostas objetivas ou estabilização da doença) observou-se que, 10% a 15% dos pacientes com diagnóstico confirmado de GIST não responderam ao mesilato de imatinib (resistência primária), e cerca de 50% dos pacientes, após boa resposta inicial, acabaram evoluindo com progressão da doença, mesmo com doses adequadas de mesilato de imatinib (resistência secundária). A análise desses fenômenos mostra que os GIST são neoplasias que apresentam importante instabilidade genética. É provável que ocorram novas mutações em exons diferentes do gene *c-Kit* ou do gene *PDGFRA* modificando estruturalmente o sítio de ligação do ATP e conferindo resistência secundária ao imatinib. Também, é possível que ocorra a ativação de outras vias de transdução de sinal com amplificação de outras proteínas da cascata de sinalização [92-93].

Mais recentemente, novas moléculas inibidoras da tirosino quinase têm surgido e entre elas, o sunitinib mostrou possuir também importante atividade anti-angiogênica, inibindo a ação dos fatores de crescimento do endotélio vascular. O sunitinib atualmente é indicado em casos de doença avançada refratária ao tratamento com mesilato de imatinib ou em casos de intolerância ao mesmo [94].

2.9) Recorrência e principais fatores de mau prognóstico.

A recorrência esperada em GIST é em torno de 29 a 54% [63]. Em uma série de 335 pacientes submetidos a uma ressecção cirúrgica inicial, 45% dos pacientes apresentaram recorrência local. Neste grupo, 79,5% das recorrências foram observadas no grupo de alto risco, 13,9% no grupo de risco intermediário, tendo um percentual bem menor nos grupo de baixo e/ou muito baixo risco. O tempo médio de recorrência nesta série foi de 15 meses (média de 2 a 164 meses) o que indica serem necessários períodos longos de acompanhamento clínico, uma vez que recorrências e/ou metástases podem surgir muitos anos após o diagnóstico inicial [95].

Das muitas variáveis que se associam com um prognóstico mais reservado, observamos que a categoria de risco é validada em praticamente todos os estudos, com análise das duas principais variáveis que são a contagem mitótica em 50 CGA e o tamanho tumoral. A localização não gástrica também desfavorece o prognóstico principalmente a localização em omento [11, 23, 96]. Além disso, entre os fatores de mau prognóstico estão também citados o sexo masculino e idade inferior a 40 anos [23, 78, 95]. Entre os aspectos macroscópicos e microscópicos muitos

estudos apontam a presença de necrose tumoral, ulceração, invasão da mucosa, tipo histológico sarcomatoide, ruptura tumoral e margens cirúrgicas comprometidas como fatores de mau prognóstico [23, 35, 60]. Entre os marcadores imuno-histoquímicos índices mais elevados do Ki67 [21-24, 68-69] e reduzidos do p16^{INK4} [75-76] se relacionam com comportamentos tumorais mais agressivos.

Aspectos mutacionais têm uma importância relevante, uma vez que uma melhor ou pior resposta ao mesilato de imatinib está relacionada com mutações encontradas nos genes *c-Kit* ou *PDGFRA* [37, 40, 45, 63, 89].

3) Justificativa

GIST são os tumores mesenquimais mais frequentes do trato gastrointestinal e de tratamento essencialmente cirúrgico. O seu comportamento biológico é incerto e eventualmente GIST pequenos com baixos índices mitóticos podem evoluir com metástases. A taxa de recorrência é alta, em torno de 29 a 54%, fazendo com que seja importante o reconhecimento precoce de formas mais agressivas. Neste sentido, o estudo de marcadores imuno-histoquímicos como Ki67 e p16^{INK4A} podem ter um papel relevante na identificação destas formas. Sabe-se que os GIST não respondem bem à quimioterapia ou à radioterapia convencional, porém pacientes portadores de GIST podem ser beneficiados com tratamento específico, com o emprego do mesilato de imatinib ou outras drogas similares. Uma melhor resposta terapêutica está relacionada ao tipo de mutação detectada, sendo que mutações localizadas no exon 11 do gene *c-Kit* são particularmente sensíveis à quimioterapia molecular.

4) Objetivos

4.1) Objetivo geral

Caracterizar todos os casos de GIST diagnosticados no Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) identificados no período de 01/01/1993 a 31/07/2009, do ponto de vista anatomopatológico, imuno-histoquímico, clínico, molecular e avaliar os fatores de risco.

4.2) Objetivos específicos

4.2.1) Do ponto de vista anatomopatológico, caracterizar os GIST quanto aos aspectos morfológicos e a categoria de risco (tamanho tumoral e índice mitótico, conforme classificação do *NIH*).

4.2.2) Do ponto de vista imuno-histoquímico, caracterizar os GIST em relação aos marcadores diagnósticos CD117, CD34, S100, actina e desmina e em relação aos marcadores prognósticos Ki67 e p16^{INK4A}.

4.2.3) Do ponto de vista clínico, caracterizar a amostra por idade, sexo, localização do tumor, seguimento, recorrência, metástases e curva de sobrevida.

4.2.4) Do ponto de vista molecular, caracterizar a presença de mutações no exon 11 do gene *c-Kit* e os tipos de mutações encontradas.

4.2.5) Relacionar os marcadores prognósticos Ki67 e p16^{INK4A} em GIST nesta série com a curva de sobrevida e as categorias de risco (*NIH*).

4.2.6) Relacionar os tipos de mutações no exon 11 e 9 do gene *c-Kit* dos GIST nesta série com a curva de sobrevida e as categorias de risco (*NIH*).

4.2.7) Relacionar a curva de sobrevida com as variáveis das categorias de risco (índice mitótico e tamanho, conforme classificação do *NIH*).

5) Materiais e Métodos

5.1) Delineamento

Estudo de coorte retrospectivo.

5.2) Amostra

As amostras selecionadas para a realização deste estudo correspondem a todos os casos de GIST obtidos do acervo de laudos do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre identificadas no período de 01/01/1993 a 31/07/2009.

5.3) Critérios de inclusão e exclusão

5.3.1) Inclusão

Todos os casos de GIST diagnosticados no Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) no período de 01/01/1993 a 31/07/2009.

5.3.2) Exclusão

Ausência ou escassez de material embocado em parafina.

5.4) Procedimentos

5.4.1) Seleção de casos

Todos os casos de neoplasia estromal do trato gastrointestinal diagnosticados por diferentes terminologias como tumor mesenquimal, tumor de células fusiformes, neoplasia estromal, leiomioma, leiomiossarcoma, neoplasia epitelióide do trato gastrointestinal, tumor desmóide e fibromatoses foram inicialmente selecionados e submetidos a um novo exame por HE assim

como a um painel imuno-histoquímico complementar. No período de 01 de janeiro de 1993 a 31 de julho de 2009 foram confirmados 85 casos de GIST pertencentes ao Serviço de Patologia do HCPA.

5.4.2) Diagnóstico histológico

Foram considerados GIST e incluídos neste estudo, casos em que a histologia (HE) foi compatível com neoplasia mesenquimal associado à (1) nítida positividade para CD117 à imuno-histoquímica; ou (2) nítida positividade à imuno-histoquímica para CD34 com marcadores sistematicamente negativos para actina, proteína S100 e desmina.

Segundo a sua morfologia os GIST foram classificados em três subtipos histológicos: fusocelular, epitelióide e padrão misto (fusocelular e epitelióide). Para essa análise foram utilizadas as lâminas coradas com HE.

5.4.3) Dados clínicos e seguimento

Os dados clínicos foram obtidos a partir dos prontuários disponibilizados pelo SAMIS (Serviço de Arquivo Médico de Informação e Saúde) do HCPA. Para cada caso foram pesquisados os seguintes dados: idade, sexo, data do diagnóstico de GIST, principais sinais e sintomas, localização do tumor e GIST como achado incidental. Ao se avaliar o seguimento desses pacientes, foram registrados os seguintes dados: recorrência local, presença de metástases, localização das mesmas, tratamento com mesilato de imatinib, data da última consulta, óbito por GIST ou óbito consequente a outras causas.

5.4.4) Categoria de risco (tamanho tumoral e índice mitótico) conforme o *NIH*

A classificação em categorias de risco foi realizada nas 71 peças cirúrgicas de GIST.

Tamanho tumoral: o maior diâmetro da massa neoplásica, medido em cm, foi considerado como sendo o seu tamanho tumoral. Este dado foi obtido a partir da descrição

macroscópica contida nos laudos anatomopatológicos, emitidos pelo Serviço de Patologia do HCPA e coletados nos 71 casos correspondentes às peças cirúrgicas.

Índice mitótico: foi realizada a contagem do número de mitoses em 50 campos de grande aumento (CGA) (400x), a partir de lâminas coradas com HE. Cada campo individual com área correspondente a aproximadamente 0,2 mm².

Categoria de risco: com base no tamanho tumoral e na contagem do número de mitoses por 50 CGA, 71 casos de GIST, foram classificados de acordo com a categoria de risco do *NIH*, em quatro grupos: risco muito baixo, risco baixo, risco intermediário e alto risco.

5.4.5) Painel imuno-histoquímico

A análise imuno-histoquímica foi realizada a partir de material embocado em parafina. Nos cortes, com quatro micrômetros de espessura, foram utilizados os seguintes marcadores: CD117, CD34, HHF35-actina, proteína S100, desmina, Ki67 e p16^{INK4A}.

Todos os anticorpos primários, o secundário e o revelador (sistema avidina-biotina/DAB) foram adquiridos da DAKO (Carpinteria, CA, USA).

Os respectivos clones e diluições dos anticorpos utilizados estão especificados no quadro 6.

A recuperação antigênica foi obtida através de calor úmido (tampão citrato, pH 6,0 e microondas por 20 minutos). As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Harris.

Quadro 6 - Anticorpos primários com seus respectivos clones e diluições

| Antígeno | Clone | Diluição |
|----------------------|--------------|-----------------|
| CD117 | Policlonal | 1:200 |
| CD34 | Q bend 10 | 1:30 |
| Actina | HHF-35 | 1:100 |
| Proteína S100 | Policlonal | 1:500 |
| Desmina | D33 | 1:100 |
| Ki67 | MIB-1 | 1:50 |
| p16 ^{INK4A} | EGH4 | 1:50 |

Foram considerados positivos para CD117, CD34, S100, actina, desmina e p16^{INK4A} todos os casos em que pelo menos, mais de 5% das células tumorais apresentaram positividade citoplasmática e/ou nuclear. Para o Ki67 foi realizada uma contagem de células marcadas positivamente, em um total de 500 células tumorais e avaliado o seu percentual de positividade, referido como índice proliferativo. O ponto de corte deste índice utilizado para a análise de dados foi de > 3%. A leitura das lâminas foi feita por dois patologistas e, em casos de discordância, uma nova leitura foi realizada para se chegar a um consenso.

5.4.6) Microdissecção

Dos blocos de parafina foram realizados quatro cortes com 10 micrômetros de espessura. As lâminas foram observadas ao microscópio invertido, separando-se tecido tumoral de tecido não tumoral e o material foi colocado em tubo tipo Eppendorf de 1,5ml, devidamente identificado.

5.4.7) Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada de acordo com a técnica descrita por Coura e cols. com a utilização do Kit MoBio (Ultra clean DNA Blood Spin Kit # 122200-50), segundo as instruções do fabricante [97].

5.4.8) Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O DNA genômico foi amplificado pela técnica da PCR. Para tanto, utilizou-se Platinum Taq (1.25 U), tampão Platinum, MgCl₂ 50mM e dNTP 2mM. Todos os reagentes utilizados para PCR foram da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). Os *primers* utilizados foram os mesmos referidos em estudo prévio e estão descritos no quadro abaixo (quadro 7) [56]. A amplificação dos fragmentos deu-se através de um passo inicial de 94°C por 5', seguido por 45 ciclos de 94°C por 1', 57°C por 1', 72°C por 1' e 10' de extensão final à 72°C. A amplificação foi verificada através de eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio.

Quadro 7 – Primers utilizados para a amplificação dos exons 9 e 11 do gene *c-Kit*

| Primers | | | |
|---------|------------------------|------------------------|---------------------------|
| Exon | Senso | Anti-senso | Tamanho do fragmento (BP) |
| 9 | 5'GTATGCCACATCCCAAGTGT | 5'CATGACTGATATGGTAGACA | 334 |
| 11 | 5'CCAGAGTGCTCTAATGACTG | 5'GGAAGCCACTGGAGTTCCTT | 274 |

(adaptado de Sihto, 2005, [34])

5.4.9) Sequenciamento do DNA

Os produtos amplificados foram purificados, para remoção do excesso de *primers* e nucleotídeos, utilizando-se as enzimas EXO e SAP-IT (GE, Pittsburgh, USA). Em seguida, foi realizada uma quantificação visual das amostras utilizando-se “*Low Mass DNA Ladder*” (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), conforme instruções do fabricante. A visualização foi feita em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. Os produtos do PCR purificados e

quantificados foram, então, submetidos à sequenciamento automatizado, utilizando-se o sequenciador ABI 3100 *Genetic Analyser*, com a utilização do reagente “*BigDye Terminator*” v3.1 (*Applied Biosystems*), conforme instruções do fabricante. As sequências encontradas foram comparadas com a sequência de referência (*GenBank* 000222.2).

5.4.10) Análise Estatística

As variáveis qualitativas foram descritas através de frequências absoluta e relativa. A idade foi descrita através da média e desvio padrão.

Para avaliação da associação entre as variáveis qualitativas, foi utilizado o teste Qui-quadrado de Pearson.

Para a avaliação da curva de sobrevida, foi utilizado o teste de Kaplan-Meier com estimativa do tempo de sobrevida através da média e do intervalo com 95% de confiança.

Para controlar fatores de confusão e avaliar fatores independentemente associados com a sobrevida, o modelo de azares proporcionais de Cox (Regressão de Cox) foi aplicado. O critério para a entrada da variável no modelo foi de que apresentasse um valor $p < 0,10$ na análise bivariada.

Para determinar o ponto de corte do Ki-67, foi aplicada a Curva *Receiver Operator Characteristic* (ROC), tendo como base o óbito.

O nível de significância adotado foi de 5% e as análises foram realizadas no S.P.S.S (*Statistical Package for the Social Sciences*, versão 13.0).

5.4.11) Considerações éticas

Para realização deste projeto de pesquisa, foi necessária a assinatura do termo de compromisso para utilização de dados do prontuário dos pacientes e termo de compromisso para utilização de material biológico descartado. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) do HCPA, registrado sob o número 05-380.*. A realização do painel imuno-histoquímico está vinculada a outro projeto, também aprovado pelo CEP do HCPA sob o número 06-312*.

* Projetos financiados pelo FIPE.

6) Resultados

6.1) Características da amostra

Dos 138 casos inicialmente classificados como neoplasias mesenquimais, 85 (61,6%) tiveram diagnóstico de GIST confirmado após a realização do seguinte painel imunohistoquímico: CD117, CD34, S100, Actina e Desmina. Em 14 (16,5%) destes 85 casos, o diagnóstico foi obtido em material de biópsia e em 71 (83,5%) o diagnóstico foi proveniente de peças cirúrgicas (figura 2). Entre os 85 pacientes, 45 (52,9%) foram do sexo masculino e 40 (47,1%) do sexo feminino. A média de idade foi de 58,4 anos \pm 14,5 com uma variação entre 17 a 99 anos. Apenas cinco pacientes apresentaram idade inferior a 40 anos. Em nenhum dos nossos casos, durante a revisão dos prontuários, foi registrada a possibilidade de GIST familiar ou GIST associado a uma síndrome genética.

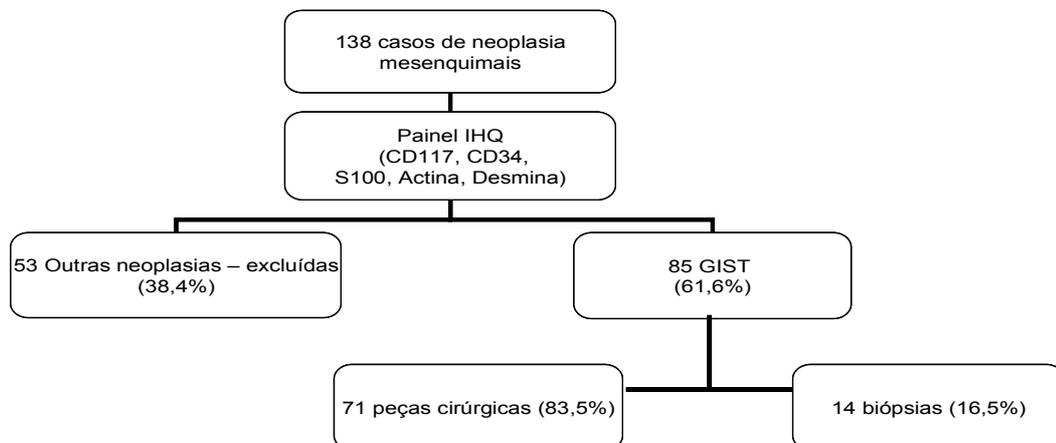


Figura 2 - Fluxograma da seleção da amostra

6.2) Aspectos Clínicos

Todos os casos de GIST desta série são de pacientes distintos, não havendo a repetição dos mesmos. Em um caso específico, não nos foi possível avaliar os dados no prontuário, por inviabilidade do mesmo e foram registradas somente as informações contidas no laudo

anatomopatológico e no laudo imuno-histoquímico complementar. Os principais sinais e sintomas clínicos foram associados a sangramentos e dor abdominal. Em 17 (20%) casos, o GIST foi descrito como um achado transoperatório incidental. A localização gástrica foi a mais frequente, estando presente em 39 (45,9%) casos, seguida do intestino delgado, presente em 32 (37,6%) casos, retroperitônio e mesentério com 5 (5,9%) casos em cada uma destas localizações e reto e cólon com 2 (2,4%) casos, também em cada uma destas localizações. Não identificamos nenhum caso de GIST esofágico. Apenas 10/84 (11,9%) casos evoluíram com metástases, tendo como sítios mais frequentes o fígado e a cavidade peritoneal.

6.3) Tipo histológico

O tipo histológico fusocelular (figura 3) foi o mais frequente, observado em 63 (74,1%) dos casos, o misto (fusocelular e epitelióide) foi identificado em 14 (16,5%) casos e o epitelióide foi identificado em oito (9,4%) casos. Do tipo histológico epitelióide, 3 (37,5%) eram de localização gástrica. Ao exame microscópico observamos a presença de necrose tumoral em oito casos, inclusões nucleares em quatro, invasão da mucosa em quatro, áreas de ulceração em quatro e a presença de fibras esquenoides em três casos, sendo esses casos de GIST intestinais.

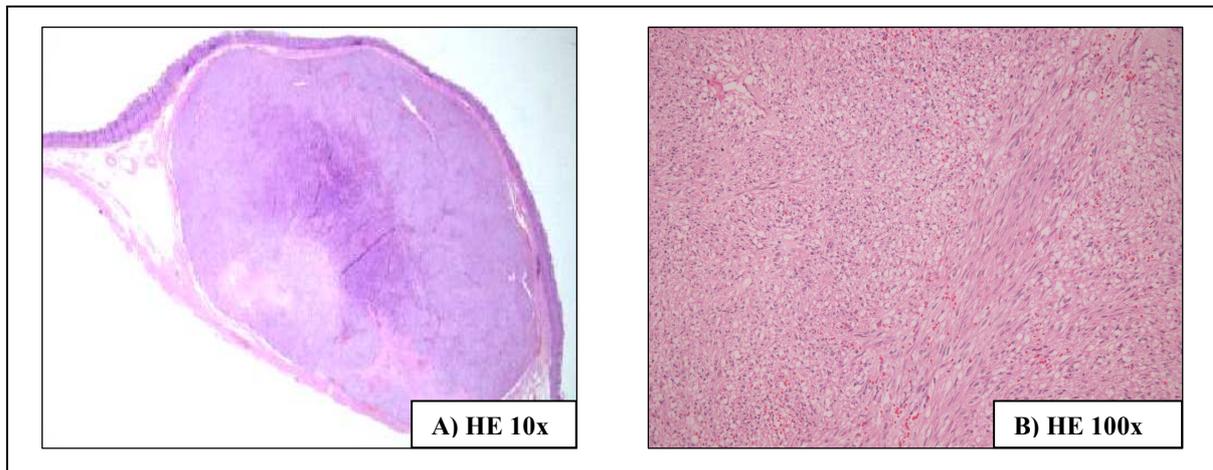


Figura 3 – GIST gástrico (HE 10X) (A) e GIST de tipo histológico fusocelular (HE 100X) (B).

6.4) Tamanho tumoral, índice mitótico e categorias de risco (NIH)

Na avaliação do tamanho tumoral foi considerada a sua maior dimensão que variou entre 1,0 cm e 25 cm com média de 6,7 cm ($\pm 5,6$). A contagem do número de mitoses dos 85 casos avaliados em cortes corados pelo método do HE mostrou, em 43 (50,6 %) casos, um valor \leq a 5 mitoses por 50 CGA (tabela 1).

A classificação em categorias de risco nas peças cirúrgicas (n=71), segundo os critérios de Fletcher e cols., mostrou que 10 (14,1%) dos casos foram classificados como sendo de risco muito baixo, 10 (14,1%) de baixo risco, 17 (23,9%) de risco intermediário e 34 (47,9%) de alto risco (tabela 1).

Tabela 1 - GIST: contagem mitótica, tamanho do tumor e categoria de risco

| Características | n |
|---------------------------|-----------|
| Contagem mitótica – n(%) | 85 |
| ≤ 5 | 43 (50,6) |
| 6 – 10 | 11 (12,9) |
| > 10 | 31 (36,5) |
| Tamanho do tumor – n(%) | 71 |
| ≤ 5 | 34 (47,9) |
| 6 – 10 | 21 (29,6) |
| > 10 | 16 (22,5) |
| Categoria de risco – n(%) | 71 |
| Muito baixo | 10 (14,1) |
| Baixo | 10 (14,1) |
| Intermediário | 17 (23,9) |
| Alto | 34 (47,9) |

6.5) Aspectos imuno-histoquímicos

O principal marcador imuno-histoquímico diagnóstico, o CD117, foi positivo em 83 (97,6%) casos, apresentando positividade citoplasmática difusa (figura 4). Foram considerados fraco-positivos os casos com 5 a 25% das células tumorais marcadas e forte-positivos os casos com mais de 25% das suas células tumorais marcadas. Nos casos com positividade < 5%, a imuno-histoquímica para o CD117 foi repetida, reavaliada, antes de classificá-los como negativo. Os dois casos negativos para o CD117 e incluídos no nosso estudo como GIST apresentaram um quadro histológico compatível, positividade para o CD34 em mais de 30% das células tumorais e imuno-histoquímica negativa para a proteína S100, desmina e actina. Nos demais casos o CD34 foi positivo em 62 (72,9%) casos. Positividade focal foi observada em 29 (34,10%) casos para a proteína S100, 53 (62,4%) casos para a actina e 16 (19,3%) casos para a desmina (tabela 2).

Tabela 2 - Marcadores Imuno-histoquímicos

| Marcadores (positividade) | n=85 |
|---------------------------|-----------|
| | n (%) |
| Diagnóstico | |
| CD117 | 83 (97,6) |
| CD34 | 62 (72,9) |
| S100 | 29 (34,1) |
| Actina | 53 (62,4) |
| Desmina | 16 (19,3) |
| Prognósticos | |
| p16 ^{INK4A} | 55 (64,7) |
| Ki-67 | |
| ≤ 3% | 57 (67,1) |
| > 3% | 28 (32,9) |

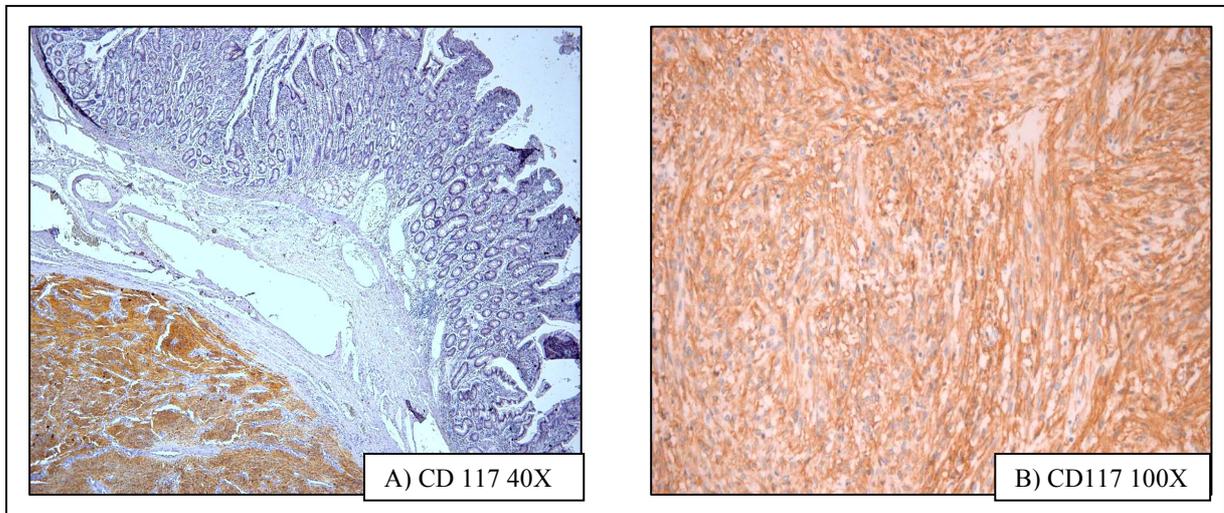


Figura 4 – CD117 em GIST de parede gástrica, mostrando positividade citoplasmática (40X) (A) e (100X) (B).

Entre os marcadores prognósticos, p16^{INK4A} foi positivo em 55 (64,7%) dos GIST (figura 5). O p16^{INK4A} foi considerado positivo-fraco quando 5 a 25% das células tumorais apresentaram positividade citoplasmática e/ou nuclear e positivo-forte em casos com mais de 25% das células tumorais marcadas. Em casos com < de 5% das células marcadas, a imuno-histoquímica foi repetida antes de considerá-los negativos.

Entre os pacientes com GIST na categoria de alto risco, a negatividade para o p16^{INK4A} foi de 38,2% (n=13) ao passo que entre os pacientes com GIST nas demais categorias menos agressivas esse percentual de negatividade foi de 29,7% (n=11), não tendo diferença estatisticamente significativa ($p=0,613$).

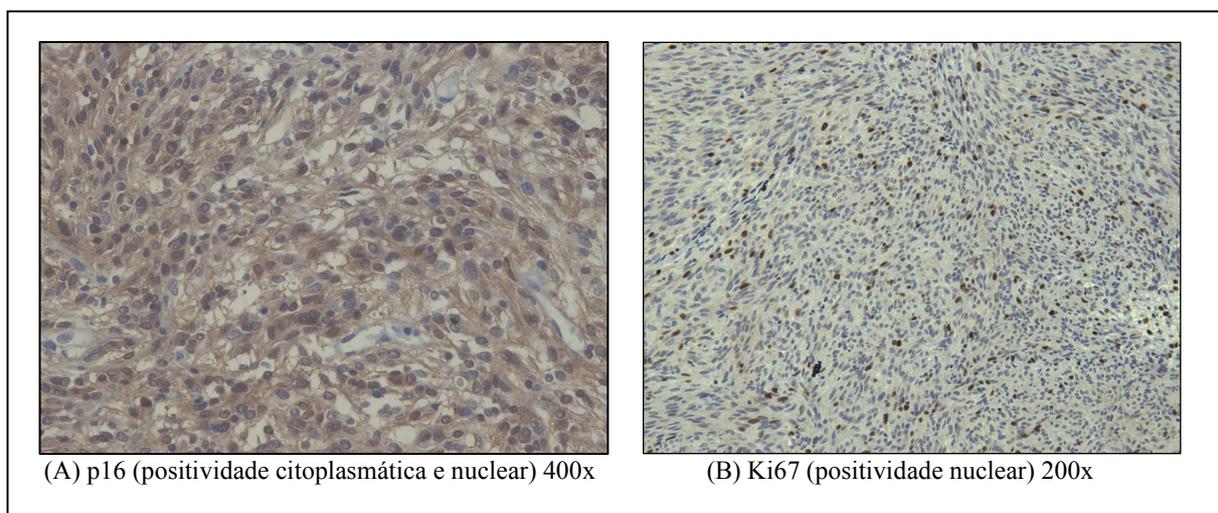


Figura 5 – Marcadores prognósticos em GIST: p16^{INK4A} com positividade citoplasmática e nuclear (400X) (A) e Ki67 com positividade nuclear (200X) (B).

Para determinar o ponto de corte do Ki67, foi aplicada a Curva ROC tendo como base a mortalidade (figura 6). Considerando o ponto que fornece aproximadamente à mesma sensibilidade e especificidade, obtém-se o valor de 3% (sensibilidade de 62,5% e especificidade de 65,8%). A área sob a curva foi de 0,685 (IC 95%: 0,501 a 0,869).

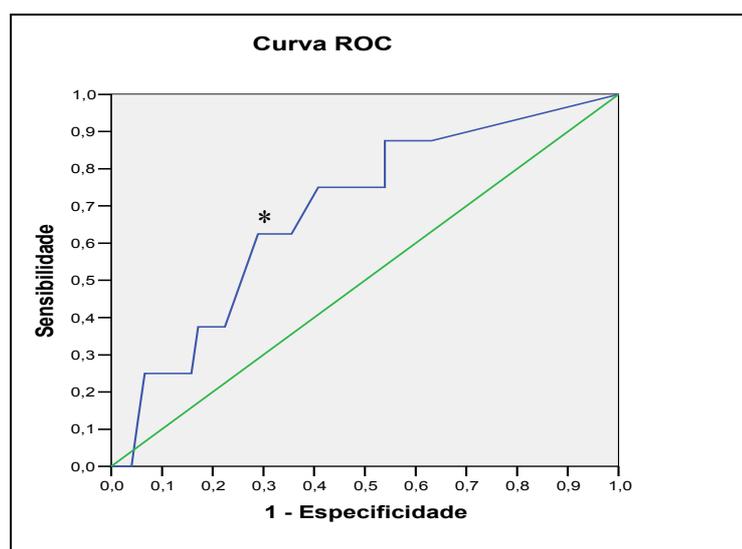


Figura 6 – Avaliação prognóstica do Ki67 através da Curva ROC, mostrando ponto de corte em 3%.

O índice proliferativo para o Ki67 \leq a 3% foi observado em 57 (67,1%) casos e um índice maior do que 3% observado em 28 (32,9%) casos. O percentual de células marcadas variou entre 0 a 50% com uma média de 7,5% (\pm 15,4). Houve uma associação estatisticamente significativa entre o Ki67 e as categorias de risco classificadas em alto e não alto risco (risco intermediário, baixo risco e risco muito baixo), sendo que os GIST classificados na categoria de alto risco possuem maior proporção de Ki-67 $>$ 3% ($p=0,001$) (figura 7).

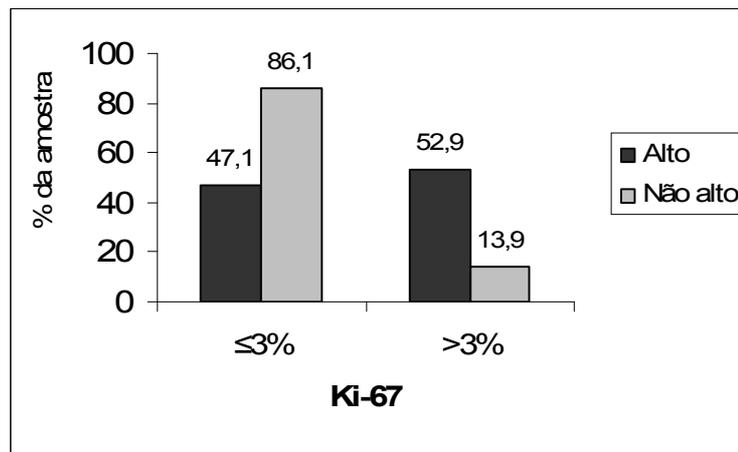


Figura 7 – Associação entre as categorias de risco, classificadas como alto e não alto risco, com o índice proliferativo do Ki-67, em 71 casos de GIST ($*p=0,001$).

Houve associação estatisticamente significativa entre o Ki-67 e o índice mitótico, através do coeficiente de correlação de Spearman ($r_s=0,526$; $p<0,001$), demonstrando que GIST com elevado índice mitótico tendem a ter elevado Ki-67 (figura 8).

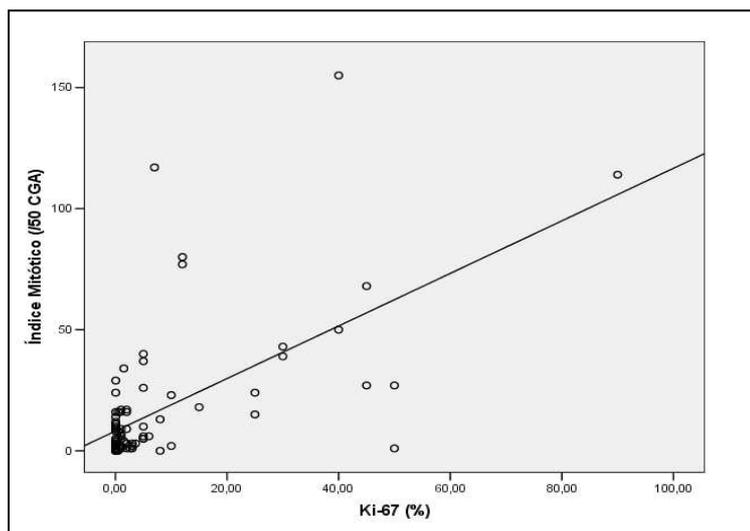


Figura 8 – Associação entre o índice proliferativo do Ki-67 e o índice mitótico medido em 50 CGA em 85 casos de GIST ($r_s=0,526$; $p<0,001$).

Não houve associação estatisticamente significativa entre Ki-67 e o tamanho do tumor ($r_s=0,161$; $p=0,184$)

6.6) Aspectos mutacionais

O fluxograma que resume as análises mutacionais *c-Kit* encontra-se na Figura 9.

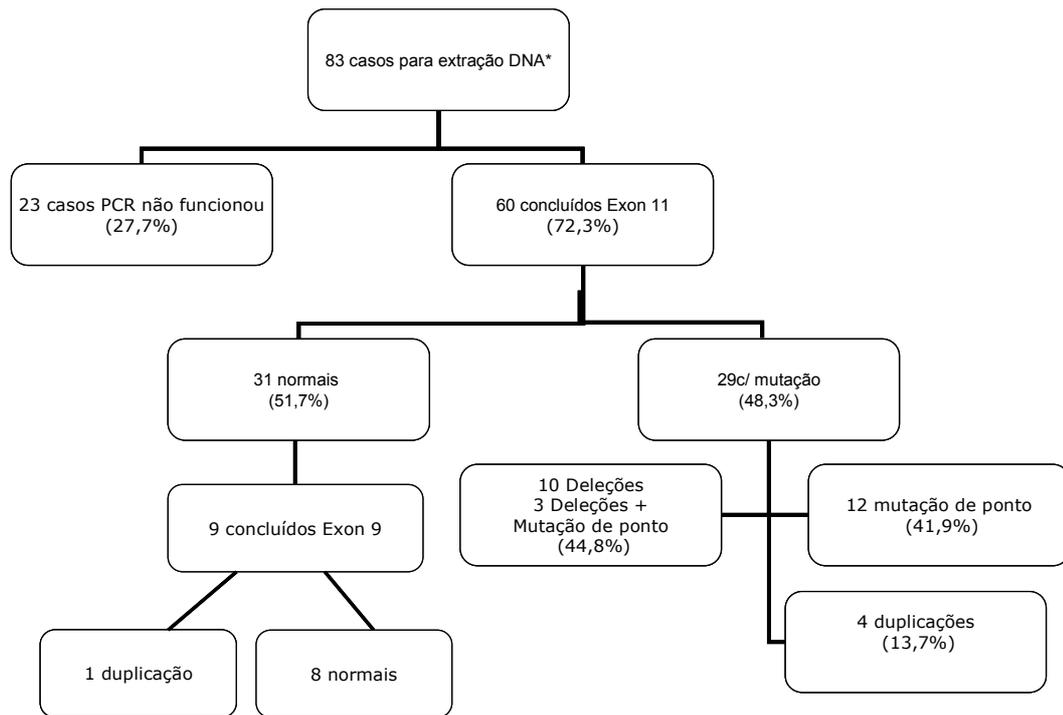


Figura 9 – Fluxograma da análise mutacional para o gene *c-Kit* (*2 de 85 casos tiveram material insuficiente).

Extraíu-se o DNA de 83 amostras, pois em duas o material foi insuficiente para a microdissecção. O PCR e o sequenciamento para o exon 11 do gene *c-Kit* foi possível em 60 (72,3%) casos. Nos demais 23 (27,7%) casos, a qualidade do DNA extraído não foi adequada para a realização do PCR ou sequenciamento, provavelmente pela degradação do material. Dos casos analisados, 29 (48,3%) deles apresentaram mutação e 31 (51,7%) foram normais para este exon. Das mutações detectadas, 12 (41,9%) foram do tipo mutação de ponto, 10 (34,4%) do tipo deleção, 4 (13,7%) do tipo duplicação e 3 (10,3%) mutação dupla: mutação de ponto e deleção (tabela 3). Em quatro amostras não foi possível realizar o sequenciamento completo do exon 11, porém a leitura abrangeu a região descrita como “hot spots”, entre os codons 550 e 560, para o *c-Kit* (a leitura foi possível até o codon 591).

Tabela 3 – Mutações encontradas no exon do gene *c-Kit* em pacientes com GIST diagnosticados no HCPA entre janeiro de 1993 a julho de 2009

| Mutação | Tipo de Mutação | Alteração cDNA (GenBank seq. ref. 000222.2) | Homo/Hetero | n | Observação |
|----------------------|-----------------|--|-------------|-----|---|
| p.Lys550_Glu554del | Deleção | del nt 1635-1649 (AAACCCATGTATGAA) | Hetero | 2 | Deleção de 5 codons |
| p.Lys558_Ile571del | Deleção | del nt 1959-1700 (AAGGTTGTTGAGGAGATAAATG GAAACAATTATGTTTACATA) | Homo | 1 | Deleção de 14 codons |
| p. Trp557Arg | Ponto | 1656 T>C | Homo/Hetero | 1/3 | Mutação de ponto |
| p.Trp557del+trocaA-G | Deleção/Ponto | Del 1656-1658 + 1659 A>G (AAG – L > GAG – D glutamato) | Hetero | 1 | Deleção de um codon e troca de uma base |
| p.Pro551del+A/T | Deleção/Ponto | Del 1938-1640 + 1641 A>T (ATG – M> TTG – L) | Homo | 2 | Deleção de um codon e troca de uma base |
| p.Val560Asp | Ponto | 1666 T>A | Hetero | 3 | Mutação de ponto |
| p.Val560Glu | Ponto | 1666-1667 TT>AG | Hetero | 1 | Mutação de ponto |
| p.Val559Asp | Ponto | 1663 T>A | Hetero | 2 | Mutação de ponto |
| p.Pro551del12 | Deleção | Del 1640-1651 (CATGTATGAAGT) | Hetero | 2 | Deleção de 12 bases entre os codons 551 a 555 |
| p.Pro551_Glu554del | Deleção | Del 1638-1649 (CCATGTATGAA) | Homo | 1 | Deleção de 4 codons |
| p.Met552del21 | Deleção | Del 1642-1662 (TGTATGAAGTACAGTGGAAAGG) | Hetero | 1 | Deleção de 21 bases entre os codons 552 a 559 |
| p.Trp557del6 | Deleção | Del 1658-1663 (GAAGGT) | Hetero | 1 | Deleção de 6 bases entre os codons 557 a 559 |
| p.Val559Ala | Ponto | 1663 T>C | Hetero | 1 | Mutação de ponto |
| p.Val559Lys | Ponto | 1662-1664 GTT>AAG | Hetero | 1 | Mutação de ponto |
| p.Val559del | Deleção | 1662-1664 (deleção GTT) | Hetero | 1 | Deleção de um codon |
| Dup-27_Lys550 | Duplicação | Dup TCCAGAGTGCTCTAATGACTGAG ACAATAATTATTTAAAAGGT | Hetero | 3 | 42 bases 27 bases antes do exon |
| Dup-17_Lys550 | Duplicação | Dup CCAGAGTGCTCTAATGACTGAGA CAATAATTATTTAAAAGGTGATCT ATTTTT | Hetero | 1 | 52 bases 17 bases antes do exon |
| p.Tyr553del12 | Deleção | Del 1645-1656 (ATGAAGTACAGT) | Homo | 1 | Deleção de 12 bases entre os codons 553 a 557 |

A seguir, são demonstrados alguns resultados obtidos após o sequenciamento automatizado (figura 10).

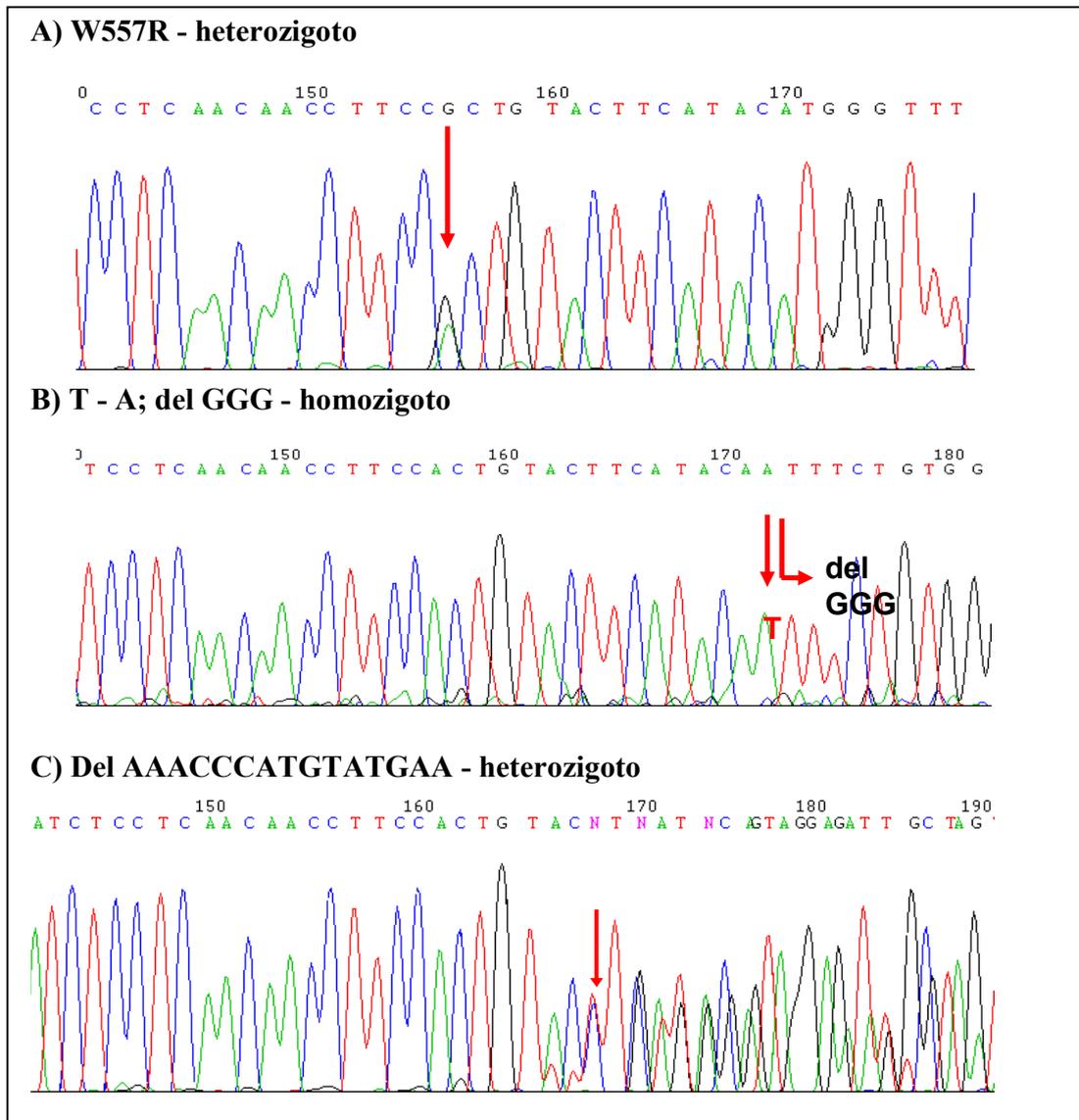


Figura 10 - Eletroferograma do sequenciamento do exon 11 do gene *c - Kit*

A) Paciente com mutação de ponto W557R heterozigoto (seta);

B) Paciente com mutação dupla: mutação de ponto e deleção (setas);

C) Paciente com mutação do tipo deleção (seta indica o início da deleção).

Entre os GIST classificados na categoria de alto risco, a mutação no exon 11 foi encontrada em 15 (68,2%) casos, ao passo que entre os GIST das demais categorias de risco menos agressivas, esse percentual foi de 44,8% (n=13), não tendo diferença estatisticamente significativa ($p=0,169$). Também não houve diferença quanto ao tipo de mutação ($p=0,177$).

Nos pacientes sem mutações para o exon 11 do gene *c-Kit* em nove casos foi realizado PCR para o exon 9. Dentre estes, 8 casos foram normais e um caso apresentou uma mutação com a presença de uma duplicação de 6 bases, GCCTAT, que leva à formação de um codon de terminação precoce (p.Y503X).

6.7) Curva de Sobrevida

A curva de sobrevida foi realizada em 84 pacientes, já que o prontuário de um paciente submetido à ressecção cirúrgica não foi localizado. A curva mostrou um tempo médio de seguimento de 2,5 anos ($\pm 2,8$) e mediana de 1,5 anos. O tempo médio de sobrevida foi de 10,3 anos (IC 95%: 8,9 a 11,6) (figura 11). Oito pacientes foram a óbito por GIST (9,5%). Dos 70 pacientes que foram submetidos à cirurgia, 8 (11,4%) evoluíram com metástases e 14 (20%) já apresentavam margens cirúrgicas comprometidas no laudo anatomopatológico inicial.

Quando comparada à curva de sobrevida com os marcadores prognósticos (figura 12), houve diferença estatisticamente significativa entre as curvas de sobrevida em relação ao Ki67 ($p=0,023$) e ao p16^{INK4A} ($p=0,038$). A média de sobrevida foi de 11 anos (IC 95%: 9,6 a 12,5) para os Ki67 $\leq 3\%$ e 6,8 anos (IC 95%: 4,4 a 9,2) para os Ki67 $>3\%$. A média de sobrevida foi de 11,1 anos (IC 95%: 9,8 a 12,4) para os casos positivos para p16^{INK4A} e de 7,2 anos (IC 95%: 5,0 a 9,5) para os p16^{INK4A} negativos.

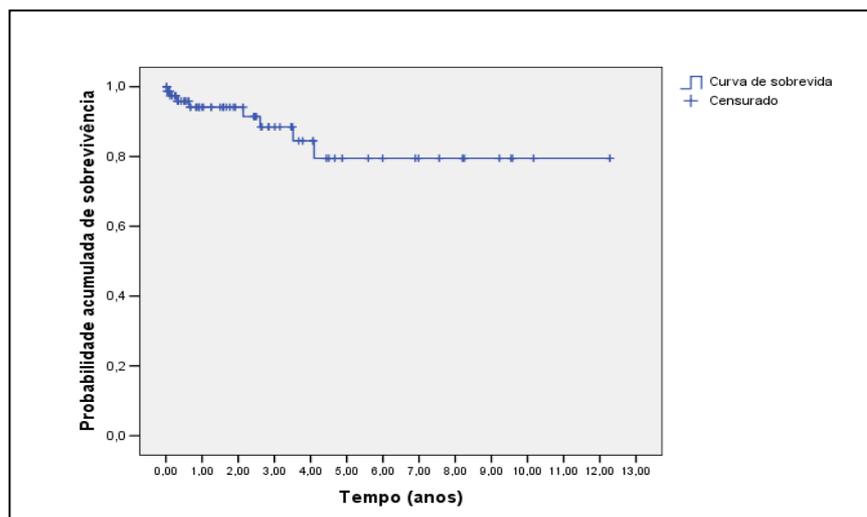


Figura 11 – Curva de sobrevida dos 84 pacientes com GIST com um tempo médio de seguimento de 2,5 anos ($\pm 2,8$) e mediana de 1,5 ano. O tempo médio de sobrevida foi de 10,3 anos (IC 95%: 8,9 a 11,6)

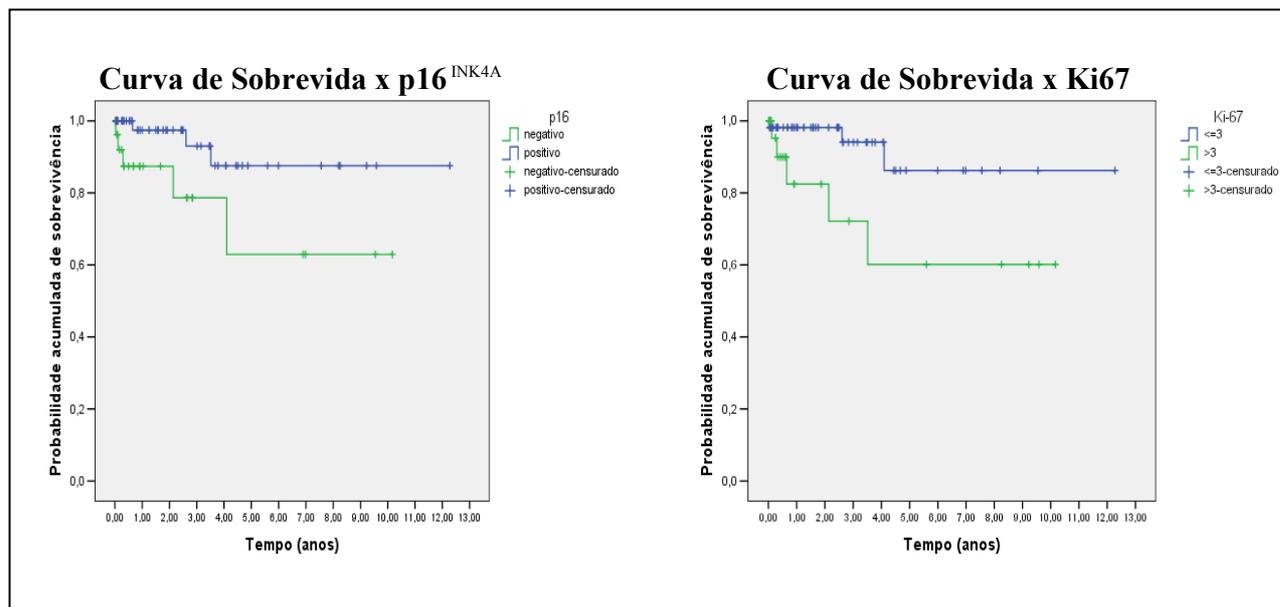


Figura 12 – Curva de sobrevida em relação aos marcadores prognósticos p16^{INK4A} e Ki67 em 84 casos de GIST. A média de sobrevida foi de 11 anos (IC 95%: 9,6 a 12,5) para os Ki67 $\leq 3\%$ e de 6,8 anos (IC 95%: 4,4 a 9,2) para os Ki67 $>3\%$. A média de sobrevida foi de 11,1 anos (IC 95%: 9,8 a 12,4) para os p16^{INK4A} positivos e de 7,2 anos (IC 95%: 5,0 a 9,5) para os p16^{INK4A} negativos.

Houve diferença estatisticamente significativa entre as curvas de sobrevida em relação ao índice mitótico ($p=0,002$), com média de sobrevida de 6,8 anos (IC 95%:4,8 a 8,8) para os com índice mitótico $>10/50$ CGA e 11,8 anos (IC 95%:10,9 a 12,7) para os com índice mitótico $\leq 10/50$ CGA (Figura 13). Em relação ao tamanho do tumor não encontramos diferença estatisticamente significativa ($p=0,111$).

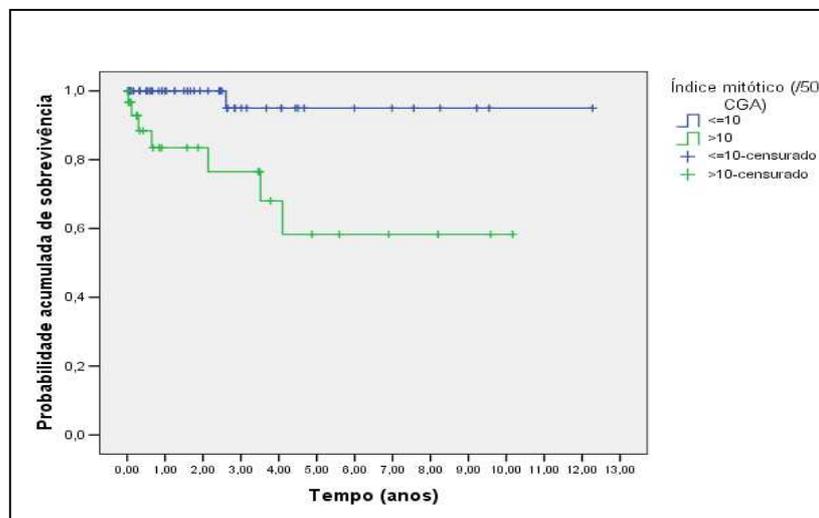


Figura 13 - Curva de sobrevida em relação ao índice mitótico em 84 casos de GIST.

Houve diferença estatisticamente significativa entre as curvas de sobrevida e metástases ($p=0,025$). Na presença de metástases, a média de sobrevida foi de 5,0 anos (IC 95%:2,4 a 7,7) e na ausência de metástases a média foi de 10,8 anos (IC 95%:9,6 a 12,1) na (figura 14).

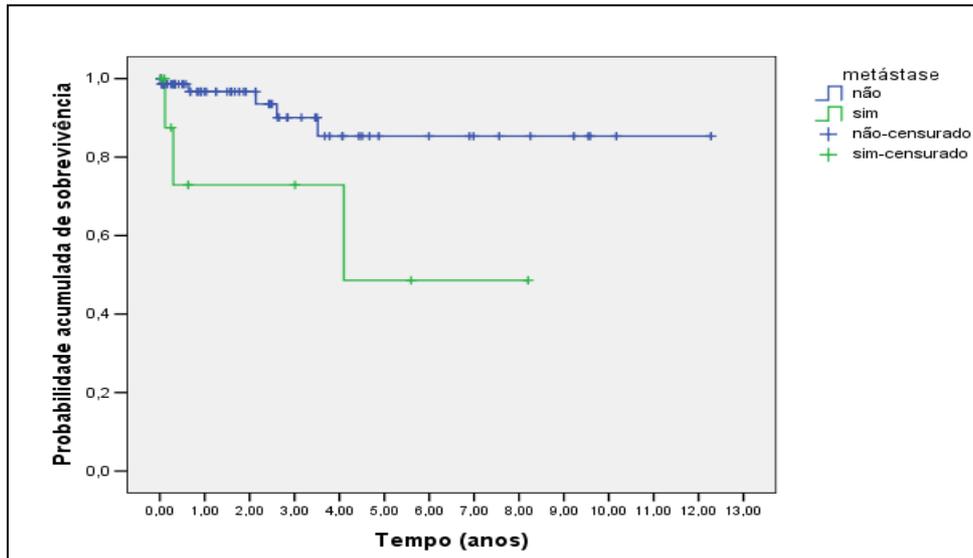


Figura 14 – Curva de sobrevivência em relação às metástases em 84 casos de GIST.

Oito pacientes foram ao óbito por GIST. Destes, o sequenciamento para o exon 11 foi possível em quatro casos. Dois casos foram normais para o exon 11 e os dois restantes apresentaram mutação, uma deleção em um caso e uma duplicação no outro caso. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as curvas de sobrevivência em relação à presença de mutações no exon 11 ($p=0,442$), assim como também esta diferença não foi observada em relação ao tipo de mutação ($p=0,477$).

Entre os 84 pacientes, 10 (11,9%) usaram mesilato de imatinib, todos com doença avançada. Destes, quatro apresentaram metástases, quatro doenças localizadas avançadas e os dois casos restantes apresentaram margens cirúrgicas amplamente comprometidas. Neste grupo, nove pacientes foram submetidos à cirurgia, seis tiveram os GIST classificados na categoria de alto grau e os três restantes foram classificados na categoria de risco intermediário.

Houve associação estatisticamente significativa entre a sobrevivência e as categorias de risco ($p=0,004$), sendo que todos os oito óbitos foram de GIST classificados na categoria de alto risco (figura 15). Observa-se, pela tabela 4, que os pacientes com alto risco e que foram a óbito, apresentaram maior proporção de tipo histológico fusocelular ($p=0,029$), metástases ($p=0,135$), Ki-67 > 3% ($p=0,405$) e p16^{INK4A} negativo ($p=0,079$), sem significância estatística para os três últimos fatores.

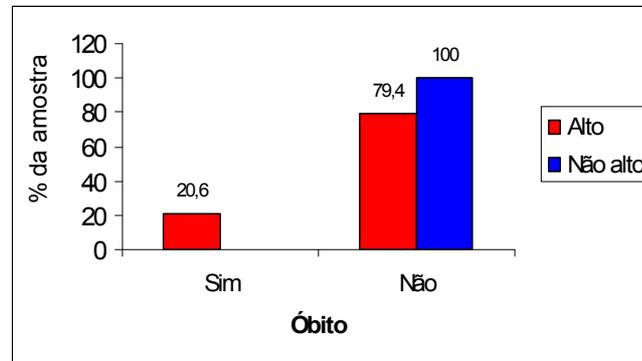


Figura 15 – Avaliação da associação entre categorias de risco e sobrevida.

Tabela 4 - Associação entre as variáveis com a sobrevida dos pacientes de alto risco

| Variáveis | Alto risco e óbito | Alto risco e não óbito | <i>P</i> |
|-------------------------------|--------------------|------------------------|----------|
| | (n=7) | (n=27) | |
| | n (%) | n (%) | |
| Faixa etária > 40 anos | 6 (85,7) | 24 (88,9) | 1,000 |
| Tipo histológico fusocelular | 7 (100,0) | 14 (51,9) | 0,029 |
| Localização gástrica | 4 (57,1) | 17 (63,0) | 1,000 |
| Metástases | 3 (42,9) | 4 (14,8) | 0,135 |
| Margens comprometidas | 1 (14,3) | 6 (22,2) | 1,000 |
| Ki-67>3% | 5 (71,4) | 13 (48,1) | 0,405 |
| P16 ^{INK4A} negativo | 5 (71,4) | 8 (29,6) | 0,079 |
| | n=3 | n=19 | |
| Mutação | 2 (66,7) | 13 (68,4) | 1,000 |
| | n=2 | n=13 | |
| Mutação tipo deleção | 1 (50,0) | 8 (61,5) | 1,000 |

O modelo de Regressão de Cox para avaliar fatores associados com o óbito está apresentado na Tabela 5. Após o ajuste, somente o índice mitótico > 10/50 CGA e o Ki-67 > 3% permaneceram associados com o desfecho, sendo ambos fatores de risco para o óbito. As

variáveis p16^{INK4A}, tipo histológico fusocelular e metástase não permaneceram estatisticamente significativos após o ajuste.

Os achados histológicos não mostraram associação quando relacionados com a curva de sobrevida, categorias de risco, p16^{INK4A} e Ki67.

Tabela 5 – Fatores associados com a probabilidade de óbito através da Regressão Multivariada de Cox

| Variáveis | HR (IC 95%)* | <i>p</i> |
|-------------------------|---------------------|----------|
| Índice mit. > 10/50 CGA | 10,4 (1,07 – 100,5) | 0,043 |
| Ki-67 > 3% | 7,3 (1,1 – 46,9) | 0,036 |

* ajustado para p16^{INK4A}, tipo histológico fusocelular e metástases.

7) Discussão

GIST são tumores do trato gastrintestinal de baixa incidência, perfazem cerca de 70% dos tumores mesenquimais nesta localização. O diagnóstico definitivo requer, além do exame anatomopatológico de rotina, uma complementação imuno-histoquímica principalmente através do marcador CD117. Em nosso estudo, dos 138 casos inicialmente classificados como neoplasia mesenquimal do trato gastrintestinal, somente 85 (61,59%) casos tiveram o diagnóstico de GIST confirmado após realização do painel imuno-histoquímico. Entre os excluídos, 12 casos inicialmente diagnosticados como neoplasia mesenquimal de esôfago foram reclassificados como leiomiomas após a realização do painel imuno-histoquímico. Leiomiomas gástricos e de intestino delgado são raros, sendo bem mais frequentes os localizados no esôfago e cólon [18]. Casos com índice mitótico muito elevado, na sua grande maioria, foram excluídos por se tratarem de verdadeiros leiomiossarcomas apresentando marcadores imuno-histoquímicos positivos para actina e desmina e negativos para CD117 (proteína KIT). Dos 85 casos confirmados 71 (83,5%) foram provenientes de peças cirúrgicas e 14 (16,5%) provenientes de material de biópsia.

Na nossa série, constituída por 45 homens e 40 mulheres, não encontramos uma predominância significativa em relação ao sexo. Lopes e cols. em um estudo brasileiro de 513 casos de GIST publicado em 2008, encontraram uma predominância do sexo feminino em GIST classificados nas categorias de baixo risco ou muito baixo risco, achado este não observado em nossa série [54]. A média de idade no nosso estudo foi de 58,4 anos \pm 14, 5, estando de acordo com a literatura, onde a média de idade é em torno dos 60 anos [18]. Somente cinco dos nossos pacientes apresentaram idade inferior a 40 anos. Consideramos todos os nossos casos de GIST como esporádicos, uma vez que na revisão dos prontuários não encontramos registro da possibilidade de algum caso pertencer a GIST familiar ou a GIST associados a síndromes genéticas.

A co-existência de GIST com outras neoplasias tem sido referida em diversos trabalhos tendo um percentual variável entre 4,5 e 33,33% [56, 58, 98]. Agaimy e cols. relataram a presença da co-existência de outra neoplasia em 295/2809 (9,2%) dos pacientes portadores de GIST. Este mesmo autor, reunindo diferentes trabalhos sobre GIST na literatura, chegou a um total de 4777 pacientes, dentro dos quais 444 (9,3%), apresentaram uma outra neoplasia co-existente. As neoplasias encontradas com maior frequência foram: carcinoma colo-retal,

carcinoma gástrico e carcinoma prostático [57]. Casos incidentais, como achado cirúrgico, são esperados em cerca de 20% [55, 58-59, 78], percentual este observado no presente estudo. Um estudo populacional na Suécia encontrou um percentual semelhante (20%) de casos incidentais, sendo que 10% foram obtidos através de achados de necropsia e 10% de achados cirúrgicos [5]. Em uma série de 19 casos de GIST incidentais, se notou a predominância do padrão morfológico fusocelular e localização preferencial gastroesofágica. No estudo mutacional realizado em 12 destes casos foram identificados três mutações envolvendo o códon 557 no exon 11 do gene *c-Kit* [56]. Corless e cols. em 2002, encontraram 11 mutações para o gene *c-Kit* em 13 casos de GIST incidentais [99]. Tudo isto sugere que os eventos mutacionais são bastante precoces no desenvolvimento do tumor.

A localização preferencial gástrica seguida da localização no intestino delgado, principalmente jejuno e íleo, tem sido um achado frequente na literatura [10-11, 41, 78]. Na presente série, 45,9% dos GIST estavam localizados no estômago e 37,6% no intestino delgado. O tipo histológico predominante foi o fusocelular presente em 63 (74%) casos nesta série, percentual este observado na maioria dos estudos em GIST [10, 41, 59, 78]. Entretanto, na nossa série tivemos um percentual um pouco maior de casos com padrão morfológico misto, 14 (16,5%) casos, o que pode estar associado ao fato de termos tido um número maior de GIST localizados em mesentério e retroperitônio (aproximadamente 12%), onde o padrão morfológico misto é mais frequente [41]. Nesta localização, os GIST costumam ter também um comportamento biológico mais agressivo principalmente os que têm uma apresentação multinodular [96]. Na nossa série, os tumores nesta localização foram classificados na categoria de alto risco, mas não apresentaram um aspecto multinodular.

Em relação à classificação nas diferentes categorias de risco, segundo o *NIH* (quadro 1), tivemos um percentual mais elevado de GIST classificados na categoria de alto risco (47,9%) em comparação a outros trabalhos publicados na literatura [1, 5, 45]. Entretanto, Joensuu e cols. em 2008 (quadro 8), revendo seis estudos de GIST, todos com uma amostragem superior a 100 casos, observaram um percentual que variou entre 26 a 54,8% para as neoplasias classificadas na categoria de alto risco (média de 44%), resultado este comparável ao nosso estudo [100].

Quadro 8 – Sítio primário e classificação da categoria de risco (NIH) em seis séries de GIST (n>100) adaptada

| Série | Sítio tumoral primário | | | Categoria de risco pelo consenso do NIH | | |
|---|------------------------|--------------------|-----------------|---|------------------------|---------------|
| | Estômago n (%) | Intestino n (%) | Outros n (%) | Muito baixo/baixo n (%) | Intermediário n (%) | High n (%) |
| Oeste da Suécia 1983-2000 | 170 (59.0) | 115 (39.9) | 3 (1.0) | 117 (50.9) | 53 (23.0) | 60 (26.1) |
| Modena, Itália 1991-2004 | 78 (62.9) | 35 (28.2) | 11 (8.9) | 34 (35.1) | 17 (17.5) | 46 (47.4) |
| Rochester, MN 1978-2004 | 104 (54.5) | 87 (45.5) | 0 (0) | 44 (23.3) | 42 (22.2) | 103 (54.5) |
| Taiwan, 2 centros 1984-2002 | 177 (61.2) | 112 (38.8) | 0 (0) | 108 (37.4) | 88 (30.4) | 93 (32.2) |
| Região de Osaka , Japão 1987-2003 | 207 (68.3) | 91 (30.0) | 5 (1.7) | 83 (27.4) | 70 (23.1) | 150 (49.5) |
| Clínica Polonesa GIST Registry 2002-2006 | 153 (45.7) | 171 (51.0) | 11 (3.3) | 78 (24.1) | 68 (21.1) | 177 (54.8) |
| Sul do Brasil 1993-2009* | 39 (49.98) | 32 (37,6) | 14 (16,6) | 20 (28,2) | 17 (23,9) | 34 (47,9) |
| Total | 928 (57.3) | 643 (38.7) | 44 (9.3) | 484 (30.3) | 355 (23.7) | 663 (45.9) |

*(adaptado de Joensuu, 2008, [100]) *presente estudo (n=70)*

O diagnóstico definitivo destas neoplasias é feito através da realização de um painel imuno-histoquímico, onde o principal marcador diagnóstico é o CD117, positivo entre 90 a 95% dos casos. Contudo, entre os GIST gástricos, 5 a 10% podem ser CD117 negativos, enquanto que < 2% dos GIST intestinais são CD117 negativos [19]. Neste estudo, o CD117 foi positivo em 83 (97,6%) casos. Os dois casos negativos foram incluídos por terem apresentado aspectos histológicos compatíveis com GIST, além de CD34 positivo em mais de 80% das células

examinadas e imuno-histoquímica negativa para S100, actina e desmina. A análise multivariada em uma série de GIST mostrou ser a negatividade para o CD117 um fator independente de mau prognóstico [101-102].

Mais recentemente, novos marcadores diagnósticos vêm sendo pesquisados entre eles o DOG1.1 (Discovered On GIST). Espinosa e cols, em 2009, encontraram positividade para o DOG 1.1 em 370/425 (87%) casos de GIST [103]. Miettinen e cols. publicaram um estudo onde analisaram este marcador em 1168 GIST e compararam a sensibilidade do DOG1.1 com a do CD117. Encontraram percentuais semelhantes entre 94,4% e 94,7%, sendo que a resposta ao DOG1.1 foi superior em GIST gástricos epitelioides com mutação *PDGFRA*. Entretanto, o DOG1.1 foi positivo também em carcinomas escamosos esofágicos, carcinomas gástricos e em alguns carcinomas colorretais, limitando a sua especificidade [104]. Liegl, em 2009, afirmou que o DOG1.1 poderá ter um importante papel diagnóstico especialmente em GIST CD117 negativos [105].

Em relação aos marcadores imuno-histoquímicos S 100, actina e desmina, utilizados para o diagnóstico diferencial, nossos percentuais se encontram acima dos percentuais referidos na literatura [1, 10, 17-19]. A positividade para estes marcadores na nossa série foi quase sempre focal e presente em não mais do que 5 a 10% do conjunto de células examinadas e todos os casos apresentaram forte positividade para o CD117. Em cinco casos observamos positividade focal concomitante para a desmina e actina. Dois destes cinco casos apresentaram mutação do tipo deleção no exon11 do gene *c-Kit*, confirmando o diagnóstico de GIST e reforçando a possibilidade de que os GIST tenham a sua origem não somente relacionada à célula de Cajal, mas também a uma célula ainda mais precursora com potencial de múltiplas diferenciações.

Um dos marcadores prognósticos mais estudados em GIST é o Ki67 [9, 20-26] demonstrando índices mais elevados na categoria de alto risco e índices mais baixos nas categorias de menor risco Este achado também foi observado no nosso estudo com $p=0,001$. O ponto de corte de 3% adotado neste estudo foi obtido através da Curva *ROC*, tomando como base a mortalidade, apresentando uma sensibilidade de 62,5% e especificidade de 65,8%. Diferentes pontos de corte têm sido descritos na literatura com uma variação de 0,82 a 10% para o índice proliferativo do Ki67, sendo o índice de 5% o mais frequentemente adotado [9, 21-23, 69]. O Ki-67 no nosso estudo mostrou nítida correlação com o índice mitótico, $r_s=0,526$; $p<0,001$ (correlação de Spearman), fato este observado também por Carrillo e cols. [20]. Nilsson e cols.,

em sua série, encontraram dois fatores de risco independentes de mau prognóstico para GIST: tamanho tumoral e o Ki-67 elevado (Regressão de Cox) [5]. Um estudo brasileiro de 42 casos mostrou ter havido uma redução da sobrevida dos pacientes portadores de GIST com índices de Ki67 >5% ($p < 0,001$) [106]. Ozguc e cols. identificaram três fatores independentes de mau prognóstico: Ki-67 > 0,82%, idade inferior a 49 anos e ressecção incompleta da lesão [22]. Wong e cols., em uma série de 108 GIST, observaram na sua análise multivariada que um índice mitótico elevado pode ser o melhor marcador independente de mau prognóstico, inclusive superior ao índice proliferativo do Ki-67 [21]. Em nosso estudo, o índice proliferativo do Ki67 e o índice mitótico foram identificados como os dois fatores independentes de mau prognóstico pela regressão de Cox com $p=0,043$ e $p=0,036$, respectivamente. Observamos também que a curva de sobrevida para os casos com Ki-67 > 3% foi de 6,8 anos enquanto que para os casos com Ki67<3% este período foi de 11 anos.

O gene supressor *CDKN2A* (p16^{INK4A}), importante inibidor do ciclo celular, tem sido relacionado às diversas neoplasias malignas e também a GIST [75-77, 79]. GIST mais agressivos, tendo a sua expressão diminuída [75-79]. No presente estudo, não houve uma diferença estatisticamente significativa entre as categorias de risco e a expressão diminuída do p16^{INK4A}, o que pode ser explicado pelo fato de termos uma amostra relativamente pequena, quando comparada a outras séries. Alguns estudos com um número de casos comparáveis ao nosso, também mostram uma tendência a uma diminuição da expressão do p16^{INK4A} em GIST malignos [23], mas ainda sem significância estatística. A análise multivariada realizada em estudos maiores, como o de Schneider e cols., em que 284 casos de GIST foram analisados, identificaram como fatores independentes de mau prognóstico: a perda da expressividade do p16^{INK4A}, a presença de necrose e a presença de metástases [76]. O mesmo foi observado por Huang e cols. em sua série de 339 GIST, em que a perda da expressão do p16^{INK4A} foi significativa em GIST mais agressivos ($p=0,035$) [24]. Entretanto, em relação à curva de sobrevida, ela foi menor para GIST p16^{INK4A} negativos (7,2anos) quando comparada a GIST p16^{INK4A} positivos (11,1anos).

Alguns estudos não encontraram uma diferença estatisticamente significativa para um aumento da expressão do p53 em GIST mais agressivos [21, 71]. Outros, entretanto, apontam o p53 como um marcador prognóstico a ser considerado [73, 79, 107]. O estudo brasileiro de Lopes e cols. em 513 GIST avaliou, além do Ki67, o p53, o CD44v3 (moléculas de adesão) e o EGFR (fator de crescimento epidérmico). O p53 foi detectado em somente 2,6% destes casos, todos de

alto risco; o EGFR foi positivo em 84,4% porém presente em todas as categorias de risco e o CD44v3 foi negativo em todos os casos independente da sua categoria de risco [39].

Sabah e cols., em 2006, realizaram um amplo painel imuno-histoquímico em 23 casos para avaliar a expressão de proteínas reguladoras da apoptose e de proteínas reguladoras envolvidas na fase G1-S do ciclo celular, entre eles Rb, E2F1, ciclina D1, CDK4, CDK6, p27, p21 p53, Mdm, Bcl2 e Bax. Neste estudo, os autores concluíram estarem os GIST malignos associados a um aumento da expressão de p53 e de E2F1 e a uma diminuição da expressão do p27 e do p16^{INK4A} [79].

A pesquisa de novos marcadores, como os marcadores angiogênicos, vem sendo realizada mais recentemente em GIST e poderão vir a ter um importante papel prognóstico nestas neoplasias. Dentre estes marcadores está o VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular), o VEGFR (receptor do fator de crescimento do endotélio vascular), o HIF-1 alfa (*hypoxia-inducible factor-1 alfa*) e a densidade microvascular. Um aumento da expressão de VEGF em GIST parece ser um fator preditor independente de mortalidade em 10 anos [108]. O VEGF age diretamente sobre células endoteliais, principalmente através de seu receptor VEGFR-2, provocando a sua migração, divisão e formação de neovasos. Existem diversos fatores que modulam a síntese e secreção de VEGF como o HIF-1 alfa. Um aumento da expressão do HIF-1 alfa está associado à GIST classificados na categoria de alto risco [27].

Estudos mutacionais em GIST têm demonstrado altas taxas de mutações localizadas sobretudo nos genes *c-Kit* e *PDGFRA*. Um estudo comparativo entre oito populações, todas com uma amostragem superior a 100 casos, mostra taxas mutacionais que variam de 50,8% a 92,9% para estes dois genes (quadro 4). Taxas mais altas, entre 28,3 e 68,8%, foram observadas para o exon11 do gene *c-Kit* e taxas mais baixas entre 0% e 18,1% para o exon 9 deste mesmo gene [40]. Para o gene *PDGFRA* a taxa de mutações variou de 0% a 22,5%, sendo que GIST com mutação no *PDGFRA* geralmente são tumores epitelioides gástricos com baixo potencial de malignidade e frequentemente apresentam mutação do tipo mutação de ponto p.D842V no exon 18 deste gene [45]. O estudo brasileiro em GIST, que aborda aspectos mutacionais mostra uma taxa geral de 70.3% para estes dois genes [39]. No presente estudo, analisamos somente as mutações do gene *c-Kit* e encontramos 29/60 (48,3%) de mutações para o exon 11. Na literatura, o percentual de positividade para mutações no exon 11 do gene *c-Kit* varia entre 28,3% e 68,8% [40]. Nossos dados estão próximos aos 47,55% relatados por Martin e cols. na Espanha [109],

mas estão abaixo dos 58,1% relatados por Lopes e cols. no Brasil [39]. Esta diferença pode ser devida a variações na composição étnica brasileira, já que nossa amostra é restrita a casos do Rio Grande do Sul, enquanto que Lopes e colaboradores analisaram casos provenientes de diferentes pontos do país.

Uma revisão realizada por Lasota e Miettinen (2006), com a finalidade de identificar os principais tipos de mutações, reuniram 441 mutações localizadas no exon11 do gene *c-Kit* a partir de sete diferentes estudos [36]. Nesta revisão, as deleções e deleções/inserções foram encontradas em 53,3% a 81% dos casos (média de 66,9%), as mutações de ponto em 16,3% a 27,3% (média de 21,5%), as duplicações em 0% a 14,3% (média de 8,8%) e outros tipos em 0% a 5,9% (média de 2,7%) (quadro 9).

Quadro 9 - Ocorrência dos diferentes tipos de mutações para o exon 11 do gene *c-Kit*.

| Estudo | Tipo de Mutação KIT exon 11 | | | | |
|-------------------|-----------------------------|--------------------|------------------|------------------|------------|
| | del/delins | Pm | dup | outras | Total |
| Lasota e cols. | 17 (81%) | 4 (19%) | 0 | 0 | 21 |
| Tamigushi e cols. | 54 (76.1%) | 14 (19.7%) | 0 | 3 (4.2%) | 71 |
| Rubin e cols. | 20 (76.1%) | 9 (26.5%) | 3 (8.8%) | 2 (5.9%) | 34 |
| Wardelman e cols. | 12 (63.2%) | 4 (21.1%) | 2 (10.5%) | 1 (5.3%) | 19 |
| Antonescu e cols. | 51 (63%) | 20 (24.7%) | 8 (8.9%) | 2 (2.5%) | 81 |
| Martin e cols. | 40 (53.3%) | 21 (27.3%) | 9 (14.3%) | 4 (4%) | 74 |
| Andersson e cols. | 101 (71.6%) | 23 (16.3%) | 17 (12.1%) | 0 | 141 |
| Presente estudo* | 10 (34.4%) | 12 (41.7%) | 4 (13.7%) | 3 (10.3%) | 29 |
| Total | 305 (64.8%) | 107 (22.7%) | 43 (9.1%) | 15 (3.1%) | 470 |

(Lasota e Miettinen ,2006 , adaptada, [36]) * Presente estudo n=29

Tornillo, em 2006, observou em um estudo de revisão, que as mutações do exon 11 estão mais frequentemente localizadas entre os codons 556 e 560, sendo que as deleções foram observadas principalmente entre os codons 557-559 e as mutações de ponto entre os codons 559 e 560. Outros estudos mostram que deleções ou deleções/inserções são mais frequentemente observadas entre os codons 550-561 sendo a mais comum a deleção Trp557-Lys558del [110]. Em nosso estudo, foram identificadas 18 diferentes mutações (mutações de ponto, deleções, deleções associadas à mutação de ponto e duplicações), sendo que algumas destas mutações se repetiram (tabela 3). As mutações mais frequentes foram: p.Trp557Arg, presente em 13,8% dos casos, p.Val560Asp em 10,3% e dup-27_Lys550 também em 10,3% dos casos. Dentre as 18 mutações identificadas, 16 ocorreram entre os codons 550 e 560, o que está de acordo com a literatura [30, 63, 83-85]. As mutações do tipo deleção (deleção simples e deleção associada à mutação de ponto) foram as mais frequentemente observadas.

Kontogianni e cols. observaram que GIST com mutação do tipo deleção têm um comportamento mais agressivo ($p < 0,003$) [83]. O mesmo foi observado em outros estudos [30][84][110][111][112]. Mutações do tipo deleções no exon 11, com ou sem mutação de ponto associada, assim como a perda de alelo selvagem (perda somática) em GIST correlacionaram-se com um pior prognóstico $p < 0,004$ (Yong em 2008) [81]. Neste estudo não encontramos esta associação, provavelmente pelo número pequeno de mutações analisadas.

Lasota e Miettinen afirmaram serem os GIST gástricos, com mutação do tipo deleção no exon 11 mais agressivos do que os GIST gástricos com mutação de ponto [30]. Estes autores correlacionaram estes achados com a resposta terapêutica e observaram que GIST com mutação do tipo deleção no exon11 apresentaram boa resposta ao mesilato de imatinib, fato este também observado por outros autores [30, 63, 110-111].

As mutações no exon 9 são menos frequentes, têm localização preferencial intestinal e as duplicações são o tipo mais comum de mutação encontrada, envolvendo principalmente os codons 502-503 [30, 45]. Identificamos uma mutação do tipo p.Y503X para este exon.

Lopes e cols. realizaram com sucesso o sequenciamento em 74 casos dos 110 selecionados (67,2%), percentual este comparável ao do presente estudo, de 70,5% [39]. É provável que, em nosso estudo, uma das dificuldades encontradas para o sequenciamento tenha sido o fato de a amostra ser constituída por blocos muito antigos (os casos mais antigos datam de 1993), onde

pode ocorrer uma degradação do material genético. Esta mesma dificuldade foi relatada por outros pesquisadores [39, 41, 45].

O tempo de seguimento dos nossos pacientes foi bastante variável, com um tempo médio de 2,5 anos \pm (2,8) e mediana de 1,5 anos. Muitos casos neste estudo foram diagnosticados nos últimos três anos, limitando o tempo de acompanhamento dos mesmos. O último caso incluído nesta série data de julho de 2009. A taxa de recorrência nesta série foi de 25,8%, sendo que entre os nossos casos recorrentes se encontram os 10 casos que evoluíram com metástases e 12 dos 14 casos que apresentaram margens cirúrgicas comprometidas nos laudos anatomopatológicos iniciais, salientando a importância da ressecção completa da lesão, com margens cirúrgicas livres, na abordagem inicial. A taxa de recorrência em estudos com um tempo de seguimento maior tem sido em torno 29 a 54% [60, 63]

O nosso percentual de metástases foi de 11,9 %. Este percentual se encontra abaixo dos 27% a 54% referidos na literatura e é provável que isto também esteja relacionado ao fato de termos um tempo de seguimento menor para os nossos pacientes comparados a outros estudos [39, 59-60, 78]. Contudo, encontramos uma diferença estatisticamente significativa nas curvas de sobrevida com média de sobrevivência de 5,0 anos (IC 95%:2,4 a 7,7) para os pacientes que apresentaram metástases e de 10,8 anos (IC 95%:9,6 a 12,1) para os que não apresentaram metástases, ($p=0,025$) (figura 14).

O percentual de sobrevida livre de doença por cinco anos na literatura é bastante variável, entre 29% e 48% [41, 112-113] e percentuais de 50% a 60% têm sido descritos para pacientes com ressecção completa inicial ou doença primária localizada [60, 95]. Somente 12,5 % dos pacientes nesta série tiveram um tempo de seguimento por mais de cinco anos, limitando assim a possibilidade de um estudo comparativo.

A taxa de óbito relacionado ao GIST na literatura é bastante variável e depende da localização do tumor. Miettinen e cols., em uma análise de mais de 1765 casos de GIST gástricos encontrou uma taxa de óbito de 17%. Taxas de óbitos duas vezes mais elevadas, foram descritas para GIST de outras localizações como jejuno e íleo e GIST localizados em mesentério, omento e retroperitônio [13]. Na nossa série o percentual de óbitos foi bem mais baixo, de 9,5%, provavelmente também relacionado ao fato de termos um tempo de acompanhamento curto para a maioria dos nossos casos. Os oito óbitos relacionados a GIST em nossa série eram de pacientes com tumores que pertenciam à categoria de alto risco. Ao analisarmos os pacientes portadores de

GIST de alto risco com óbito e alto risco sem óbito (tabela 6), observamos na análise multivariada que os óbitos apresentaram maior proporção de tipo histológico fusocelular ($p=0,029$) e uma tendência a ter um p16^{INK4A} negativo ($p=0,079$).

Somente 10 pacientes com doença clinicamente avançada receberam mesilato de imatinib, porém fizeram uso descontínuo da medicação. Por este motivo, não foi possível avaliar a relação do uso desta medicação com a sobrevida dos pacientes.

Nosso estudo realizado no extremo sul do Brasil, assim como o estudo brasileiro de Lopes e cols., com amostras provenientes de diferentes regiões do Brasil, mostram não haver diferenças importantes quanto aos aspectos morfológicos, imuno-histoquímicos, clínicos e moleculares entre os GIST diagnosticados e acompanhados no Brasil e GIST de várias outras instituições americanas, europeias ou asiáticas, aonde estes tumores vem sendo amplamente estudados.

Perspectivas futuras em GIST poderão advir com o emprego de novos marcadores imuno-histoquímicos como DOG1.1 e o anticorpo anti-PDGFR α principalmente em casos de GIST CD117 negativos. Além destes, é provável que marcadores prognósticos como Ki67, p16^{INK4A}, p53 e outros do ciclo celular venham a fazer parte do painel imuno-histoquímicos de rotina para estas neoplasias. Espera-se ainda o desenvolvimento de marcadores de importância terapêutica, entre eles os marcadores angiogênicos que poderão ser de grande utilidade para o uso de fármacos com atividade anti-angiogênica, como é o caso do sunitinib [94, 114].

A identificação dos tipos de mutações observadas no gene *c-Kit* e no gene *PDGFRA* poderá vir a fazer parte da investigação diagnóstica inicial, principalmente para a detecção de GIST potencialmente mais agressivos e para a orientação de tratamentos quimioterápicos moleculares específicos.

8) Conclusões

Entre as 138 amostras diagnosticadas como neoplasias mesenquimais do trato gastrointestinal, foram identificados 85 casos de GIST. Esses foram caracterizados do ponto de vista anatomopatológico, imuno-histoquímico, clínico, molecular e avaliados os fatores de risco.

8.1) O tipo morfológico predominante foi o fusocelular, presente em 74,1% dos casos. A classificação de risco (*NIH*), que leva em conta as variáveis: índice mitótico e tamanho tumoral, mostrou que 28,2% dos GIST nesta série pertenciam à categoria de risco muito baixo e baixo, 23,9% à categoria de risco intermediário e 47,9% à categoria de alto risco.

8.2) O painel imuno-histoquímico diagnóstico mostrou CD117 positivo em 97,6% e o CD34 em 72,9% dos casos. O painel imuno-histoquímico prognóstico mostrou uma negatividade para o p16^{INK4A} em 35,3% e um Ki67 > 3% em 32,9% dos GIST neste estudo.

8.3) Não houve uma predominância de sexo e a média de idade foi de 58,4 anos. A localização mais frequente foi a gástrica (45,9%) seguida da intestinal (37,6%). A curva de sobrevida mostrou um tempo de seguimento de 2,5 anos (\pm 2,8) e uma mediana de 1,5 anos. O tempo médio de sobrevida foi de 10,3 anos (IC 95%: 8,9 a 11,6) A taxa de recorrência foi de 25,8% e a de metástase de 11,9%.

8.4) Em 70% das nossas amostras foi possível a realização do sequenciamento e foram encontradas 29 mutações para o exon 11 do gene *c-Kit*: 12 mutações de ponto, 10 deleções, 04 duplicações e 03 mutações de ponto associadas à deleções.

8.5) Quanto à sobrevida, ambos marcadores prognósticos tiveram associação, sendo que houve maior probabilidade de óbito nos pacientes com Ki-67 > 3% e p16^{INK4A} negativo. Contudo, na análise multivariada, o p16^{INK4A} não se manteve estatisticamente significativo. Em relação às categorias de risco, o Ki67 > 3% teve nítida associação com a categoria de alto risco (*NIH*).

8.6) Não houve uma associação significativa entre as mutações nem os tipos de mutação com as categorias de risco e a sobrevida dos pacientes

8.7) Das variáveis que compõem a categoria de risco, apenas o índice mitótico apresentou associação significativa com a sobrevida dos pacientes, sendo que os pacientes com $> 10/50$ CGA apresentaram maior risco para óbito, conforme análise multivariada.

9) Referências Bibliográficas:

1. Blackstein, M.E., et al., *Gastrointestinal stromal tumours: consensus statement on diagnosis and treatment*. Can J Gastroenterol, 2006. **20**(3): p. 157-63.
2. Min, K.W. and M. Leabu, *Interstitial cells of Cajal (ICC) and gastrointestinal stromal tumor (GIST): facts, speculations, and myths*. J Cell Mol Med, 2006. **10**(4): p. 995-1013.
3. Kindblom, L.G., et al., *Gastrointestinal pacemaker cell tumor (GIPACT): gastrointestinal stromal tumors show phenotypic characteristics of the interstitial cells of Cajal*. Am J Pathol, 1998. **152**(5): p. 1259-69.
4. Miettinen, M., M. Sarlomo-Rikala, and J. Lasota, *Gastrointestinal stromal tumors: recent advances in understanding of their biology*. Hum Pathol, 1999. **30**(10): p. 1213-20.
5. Nilsson, B., et al., *Gastrointestinal stromal tumors: the incidence, prevalence, clinical course, and prognostication in the preimatinib mesylate era--a population-based study in western Sweden*. Cancer, 2005. **103**(4): p. 821-9.
6. Pithorecky, I., et al., *Gastrointestinal stromal tumors: current diagnosis, biologic behavior, and management*. Ann Surg Oncol, 2000. **7**(9): p. 705-12.
7. Miettinen, M. and J. Lasota, *Gastrointestinal stromal tumors--definition, clinical, histological, immunohistochemical, and molecular genetic features and differential diagnosis*. Virchows Arch, 2001. **438**(1): p. 1-12.
8. DeMatteo, R.P., et al., *Two hundred gastrointestinal stromal tumors: recurrence patterns and prognostic factors for survival*. Ann Surg, 2000. **231**(1): p. 51-8.
9. Hasegawa, T., et al., *Gastrointestinal stromal tumor: consistent CD117 immunostaining for diagnosis, and prognostic classification based on tumor size and MIB-1 grade*. Hum Pathol, 2002. **33**(6): p. 669-76.
10. Fletcher, C.D., et al., *Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: A consensus approach*. Hum Pathol, 2002. **33**(5): p. 459-65.
11. Miettinen, M., et al., *Evaluation of malignancy and prognosis of gastrointestinal stromal tumors: a review*. Hum Pathol, 2002. **33**(5): p. 478-83.
12. Gold, J.S. and R.P. Dematteo, *Combined surgical and molecular therapy: the gastrointestinal stromal tumor model*. Ann Surg, 2006. **244**(2): p. 176-84.
13. Miettinen, M., et al., *Gastrointestinal stromal tumors of the jejunum and ileum: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 906 cases before imatinib with long-term follow-up*. Am J Surg Pathol, 2006. **30**(4): p. 477-89.
14. D'Amato, G., et al., *Update on the biology and therapy of gastrointestinal stromal tumors*. Cancer Control, 2005. **12**(1): p. 44-56.
15. Shinomura, Y., et al., *Pathophysiology, diagnosis, and treatment of gastrointestinal stromal tumors*. J Gastroenterol, 2005. **40**(8): p. 775-80.
16. Blay, J.Y., et al., *Consensus meeting for the management of gastrointestinal stromal tumors. Report of the GIST Consensus Conference of 20-21 March 2004, under the auspices of ESMO*. Ann Oncol, 2005. **16**(4): p. 566-78.
17. Graadt van Roggen, J.F., M.L. van Velthuysen, and P.C. Hogendoorn, *The histopathological differential diagnosis of gastrointestinal stromal tumours*. J Clin Pathol, 2001. **54**(2): p. 96-102.
18. Abraham, S.C., *Distinguishing gastrointestinal stromal tumors from their mimics: an update*. Adv Anat Pathol, 2007. **14**(3): p. 178-88.

19. Dow, N., et al., *Gastrointestinal stromal tumors: differential diagnosis*. Semin Diagn Pathol, 2006. **23**(2): p. 111-9.
20. Carrillo, R., et al., *Prognostic significance of DNA ploidy and proliferative index (MIB-1 index) in gastrointestinal stromal tumors*. Hum Pathol, 1997. **28**(2): p. 160-5.
21. Wong, N.A., et al., *Prognostic indicators for gastrointestinal stromal tumours: a clinicopathological and immunohistochemical study of 108 resected cases of the stomach*. Histopathology, 2003. **43**(2): p. 118-26.
22. Ozguc, H., et al., *Analysis of prognostic and immunohistochemical factors in gastrointestinal stromal tumors with malignant potential*. J Gastrointest Surg, 2005. **9**(3): p. 418-29.
23. Bertolini, V., et al., *Gastrointestinal stromal tumors--frequency, malignancy, and new prognostic factors: the experience of a single institution*. Pathol Res Pract, 2008. **204**(4): p. 219-33.
24. Huang, H.Y., et al., *Immunohistochemical expression of p16INK4A, Ki-67, and Mcm2 proteins in gastrointestinal stromal tumors: prognostic implications and correlations with risk stratification of NIH consensus criteria*. Ann Surg Oncol, 2006. **13**(12): p. 1633-44.
25. Takeyama, H., et al., *Expression of alpha6 integrin subunit is associated with malignancy in gastric gastrointestinal stromal tumors*. Med Sci Monit, 2007. **13**(2): p. CR51-6.
26. Nemoto, Y., et al., *Correlation of enhanced cell turnover with prognosis of gastrointestinal stromal tumors of the stomach: relevance of cellularity and p27kip1*. Pathol Int, 2006. **56**(12): p. 724-31.
27. Chen, W.T., et al., *Hypoxia-inducible factor-1alpha is associated with risk of aggressive behavior and tumor angiogenesis in gastrointestinal stromal tumor*. Jpn J Clin Oncol, 2005. **35**(4): p. 207-13.
28. Imamura, M., et al., *Prognostic significance of angiogenesis in gastrointestinal stromal tumor*. Mod Pathol, 2007. **20**(5): p. 529-37.
29. Hirota, S., et al., *Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors*. Science, 1998. **279**(5350): p. 577-80.
30. Lasota, J. and M. Miettinen, *Clinical significance of oncogenic KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumours*. Histopathology, 2008. **53**(3): p. 245-66.
31. Tabone, S., et al., *KIT overexpression and amplification in gastrointestinal stromal tumors (GIST)*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1741**(1-2): p. 165-72.
32. Nickl, N.J., *Gastrointestinal stromal tumors: new progress, new questions*. Curr Opin Gastroenterol, 2004. **20**(5): p. 482-7.
33. Went, P.T., et al., *Prevalence of KIT expression in human tumors*. J Clin Oncol, 2004. **22**(22): p. 4514-22.
34. Sihto, H., et al., *KIT and platelet-derived growth factor receptor alpha tyrosine kinase gene mutations and KIT amplifications in human solid tumors*. J Clin Oncol, 2005. **23**(1): p. 49-57.
35. Miettinen, M., L.H. Sobin, and J. Lasota, *Gastrointestinal stromal tumors of the stomach: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 1765 cases with long-term follow-up*. Am J Surg Pathol, 2005. **29**(1): p. 52-68.
36. Lasota, J. and M. Miettinen, *KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors (GIST)*. Semin Diagn Pathol, 2006. **23**(2): p. 91-102.
37. Subramanian, S., et al., *Gastrointestinal stromal tumors (GIST) with KIT and PDGFRA mutations have distinct gene expression profiles*. Oncogene, 2004. **23**(47): p. 7780-90.

38. Singer, S., et al., *Prognostic value of KIT mutation type, mitotic activity, and histologic subtype in gastrointestinal stromal tumors*. J Clin Oncol, 2002. **20**(18): p. 3898-905.
39. Lopes, L.F., E.B. Ojopi, and C.E. Bacchi, *Gastrointestinal stromal tumor in Brazil: clinicopathology, immunohistochemistry, and molecular genetics of 513 cases*. Pathol Int, 2008. **58**(6): p. 344-52.
40. Tzen, C.Y., M.N. Wang, and B.L. Mau, *Spectrum and prognostication of KIT and PDGFRA mutation in gastrointestinal stromal tumors*. Eur J Surg Oncol, 2008. **34**(5): p. 563-8.
41. Liegl, B., J.L. Hornick, and A.J. Lazar, *Contemporary pathology of gastrointestinal stromal tumors*. Hematol Oncol Clin North Am, 2009. **23**(1): p. 49-68, vii-viii.
42. Heinrich, M.C., et al., *PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors*. Science, 2003. **299**(5607): p. 708-10.
43. Heinrich, M.C., et al., *Correlation of kinase genotype and clinical outcome in the North American Intergroup Phase III Trial of imatinib mesylate for treatment of advanced gastrointestinal stromal tumor: CALGB 150105 Study by Cancer and Leukemia Group B and Southwest Oncology Group*. J Clin Oncol, 2008. **26**(33): p. 5360-7.
44. Hopkins, T.G., M. Marples, and D. Stark, *Sunitinib in the management of gastrointestinal stromal tumours (GIST)*. Eur J Surg Oncol, 2008. **34**(8): p. 844-50.
45. Rubin, B.P., *Gastrointestinal stromal tumours: an update*. Histopathology, 2006. **48**(1): p. 83-96.
46. Mazur, M.T. and H.B. Clark, *Gastric stromal tumors. Reappraisal of histogenesis*. Am J Surg Pathol, 1983. **7**(6): p. 507-19.
47. Miettinen, M., M. Virolainen, and R. Maarit Sarlomo, *Gastrointestinal stromal tumors--value of CD34 antigen in their identification and separation from true leiomyomas and schwannomas*. Am J Surg Pathol, 1995. **19**(2): p. 207-16.
48. Robinson, T.L., et al., *Gastrointestinal stromal tumors may originate from a subset of CD34-positive interstitial cells of Cajal*. Am J Pathol, 2000. **156**(4): p. 1157-63.
49. Miettinen, M. and J. Lasota, *Gastrointestinal stromal tumors: review on morphology, molecular pathology, prognosis, and differential diagnosis*. Arch Pathol Lab Med, 2006. **130**(10): p. 1466-78.
50. Steigen, S.E. and T.J. Eide, *Trends in incidence and survival of mesenchymal neoplasm of the digestive tract within a defined population of northern Norway*. APMIS, 2006. **114**(3): p. 192-200.
51. Rink, L. and A.K. Godwin, *Clinical and molecular characteristics of gastrointestinal stromal tumors in the pediatric and young adult population*. Curr Oncol Rep, 2009. **11**(4): p. 314-21.
52. Miettinen, M., J. Lasota, and L.H. Sobin, *Gastrointestinal stromal tumors of the stomach in children and young adults: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 44 cases with long-term follow-up and review of the literature*. Am J Surg Pathol, 2005. **29**(10): p. 1373-81.
53. Li, F.P., et al., *Familial gastrointestinal stromal tumor syndrome: phenotypic and molecular features in a kindred*. J Clin Oncol, 2005. **23**(12): p. 2735-43.
54. Agaimy, A., et al., *Epithelioid gastric stromal tumours of the antrum in young females with the Carney triad: a report of three new cases with mutational analysis and comparative genomic hybridization*. Oncol Rep, 2007. **18**(1): p. 9-15.

55. Agaimy, A., et al., *Minute gastric sclerosing stromal tumors (GIST tumorlets) are common in adults and frequently show c-KIT mutations*. Am J Surg Pathol, 2007. **31**(1): p. 113-20.
56. Agaimy, A., et al., *Microscopic gastrointestinal stromal tumors in esophageal and intestinal surgical resection specimens: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular study of 19 lesions*. Am J Surg Pathol, 2008. **32**(6): p. 867-73.
57. Agaimy, A., et al., *Occurrence of other malignancies in patients with gastrointestinal stromal tumors*. Semin Diagn Pathol, 2006. **23**(2): p. 120-9.
58. Liszka, L., et al., *Coexistence of gastrointestinal stromal tumors with other neoplasms*. J Gastroenterol, 2007. **42**(8): p. 641-9.
59. Quek, R. and S. George, *Gastrointestinal stromal tumor: a clinical overview*. Hematol Oncol Clin North Am, 2009. **23**(1): p. 69-78, viii.
60. Joensuu, H., *Gastrointestinal stromal tumor (GIST)*. Ann Oncol, 2006. **17 Suppl 10**: p. x280-6.
61. Elliott, D.D., C.V. Fanning, and N.P. Caraway, *The utility of fine-needle aspiration in the diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: a cytomorphologic and immunohistochemical analysis with emphasis on malignant tumors*. Cancer, 2006. **108**(1): p. 49-55.
62. Chatzipantelis, P., et al., *Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration cytology of pancreatic neuroendocrine tumors: a study of 48 cases*. Cancer, 2008. **114**(4): p. 255-62.
63. Hou, Y.Y., et al., *Impact of KIT and PDGFRA gene mutations on prognosis of patients with gastrointestinal stromal tumors after complete primary tumor resection*. J Gastrointest Surg, 2009. **13**(9): p. 1583-92.
64. Lehnert, T., et al., *Surgical treatment of soft tissue tumors of the stomach*. Eur J Surg Oncol, 1990. **16**(4): p. 352-9.
65. Miettinen, M. and J. Lasota, *Gastrointestinal stromal tumors: pathology and prognosis at different sites*. Semin Diagn Pathol, 2006. **23**(2): p. 70-83.
66. Montgomery, E., et al., *Beta-catenin immunohistochemistry separates mesenteric fibromatosis from gastrointestinal stromal tumor and sclerosing mesenteritis*. Am J Surg Pathol, 2002. **26**(10): p. 1296-301.
67. Endl, E. and J. Gerdes, *The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function*. Exp Cell Res, 2000. **257**(2): p. 231-7.
68. Semple, J.W. and B.P. Duncker, *ORC-associated replication factors as biomarkers for cancer*. Biotechnol Adv, 2004. **22**(8): p. 621-31.
69. Toquet, C., et al., *Elevated (> or = 10%) MIB-1 proliferative index correlates with poor outcome in gastric stromal tumor patients: a study of 35 cases*. Dig Dis Sci, 2002. **47**(10): p. 2247-53.
70. Nakamura, N., et al., *Prognostic significance of expressions of cell-cycle regulatory proteins in gastrointestinal stromal tumor and the relevance of the risk grade*. Hum Pathol, 2005. **36**(7): p. 828-37.
71. Gumurdulu, D., et al., *Expression of COX-2, PCNA, Ki-67 and p53 in gastrointestinal stromal tumors and its relationship with histopathological parameters*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(3): p. 426-31.
72. Al-Bozom, I.A., *p53 expression in gastrointestinal stromal tumors*. Pathol Int, 2001. **51**(7): p. 519-23.

73. Martinez-Consuegra, N., et al., [*Expression of p53 and BCL-2 as prognostic markers and for anatomical location in gastrointestinal stromal tumors (GIST). Clinico-pathological and immunohistochemistry study of 19 cases*]. Rev Gastroenterol Mex, 2006. **71**(3): p. 269-78.
74. Corless, C.L., J.A. Fletcher, and M.C. Heinrich, *Biology of gastrointestinal stromal tumors*. J Clin Oncol, 2004. **22**(18): p. 3813-25.
75. Sabah, M., et al., *Loss of heterozygosity of chromosome 9p and loss of p16INK4A expression are associated with malignant gastrointestinal stromal tumors*. Mod Pathol, 2004. **17**(11): p. 1364-71.
76. Schneider-Stock, R., et al., *Loss of p16 protein defines high-risk patients with gastrointestinal stromal tumors: a tissue microarray study*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(2 Pt 1): p. 638-45.
77. Ricci, R., et al., *Role of p16/INK4a in gastrointestinal stromal tumor progression*. Am J Clin Pathol, 2004. **122**(1): p. 35-43.
78. Steigen, S.E. and T.J. Eide, *Gastrointestinal stromal tumors (GIST): a review*. APMIS, 2009. **117**(2): p. 73-86.
79. Sabah, M., et al., *Altered expression of cell cycle regulatory proteins in gastrointestinal stromal tumors: markers with potential prognostic implications*. Hum Pathol, 2006. **37**(6): p. 648-55.
80. Kinoshita, K., et al., *c-kit gene mutation at exon 17 or 13 is very rare in sporadic gastrointestinal stromal tumors*. J Gastroenterol Hepatol, 2003. **18**(2): p. 147-51.
81. Kitamura, Y., *Gastrointestinal stromal tumors: past, present, and future*. J Gastroenterol, 2008. **43**(7): p. 499-508.
82. Keun Park, C., et al., *Prognostic stratification of high-risk gastrointestinal stromal tumors in the era of targeted therapy*. Ann Surg, 2008. **247**(6): p. 1011-8.
83. Kontogianni-Katsarou, K., et al., *KIT exon 11 codon 557/558 deletion/insertion mutations define a subset of gastrointestinal stromal tumors with malignant potential*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(12): p. 1891-7.
84. Andersson, J., et al., *Gastrointestinal stromal tumors with KIT exon 11 deletions are associated with poor prognosis*. Gastroenterology, 2006. **130**(6): p. 1573-81.
85. Lasota, J., et al., *KIT codon 558 insertions in gastrointestinal stromal tumors. Analysis of 17 rare KIT mutants*. Hum Pathol, 2008. **39**(12): p. 1728-36.
86. Roberts, P.J. and B. Eisenberg, *Clinical presentation of gastrointestinal stromal tumors and treatment of operable disease*. Eur J Cancer, 2002. **38 Suppl 5**: p. S37-8.
87. van Oosterom, A.T., et al., *Safety and efficacy of imatinib (STI571) in metastatic gastrointestinal stromal tumours: a phase I study*. Lancet, 2001. **358**(9291): p. 1421-3.
88. Joensuu, H., et al., *Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor*. N Engl J Med, 2001. **344**(14): p. 1052-6.
89. Din, O.S. and P.J. Woll, *Treatment of gastrointestinal stromal tumor: focus on imatinib mesylate*. Ther Clin Risk Manag, 2008. **4**(1): p. 149-62.
90. Zalcborg, J.R., et al., *Outcome of patients with advanced gastro-intestinal stromal tumours crossing over to a daily imatinib dose of 800 mg after progression on 400 mg*. Eur J Cancer, 2005. **41**(12): p. 1751-7.
91. Dematteo, R.P., et al., *Adjuvant imatinib mesylate after resection of localised, primary gastrointestinal stromal tumour: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial*. Lancet, 2009. **373**(9669): p. 1097-104.

92. Heinrich, M.C., et al., *Primary and secondary kinase genotypes correlate with the biological and clinical activity of sunitinib in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor*. J Clin Oncol, 2008. **26**(33): p. 5352-9.
93. Liegl, B., et al., *Heterogeneity of kinase inhibitor resistance mechanisms in GIST*. J Pathol, 2008. **216**(1): p. 64-74.
94. Demetri, G.D., et al., *Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: a randomised controlled trial*. Lancet, 2006. **368**(9544): p. 1329-38.
95. Rutkowski, P., et al., *Risk criteria and prognostic factors for predicting recurrences after resection of primary gastrointestinal stromal tumor*. Ann Surg Oncol, 2007. **14**(7): p. 2018-27.
96. Miettinen, M., L.H. Sobin, and J. Lasota, *Gastrointestinal stromal tumors presenting as omental masses--a clinicopathologic analysis of 95 cases*. Am J Surg Pathol, 2009. **33**(9): p. 1267-75.
97. Coura, R., et al., *An alternative protocol for DNA extraction from formalin fixed and paraffin wax embedded tissue*. J Clin Pathol, 2005. **58**(8): p. 894-5.
98. Hassan, I., et al., *Clinical, pathologic, and immunohistochemical characteristics of gastrointestinal stromal tumors of the colon and rectum: implications for surgical management and adjuvant therapies*. Dis Colon Rectum, 2006. **49**(5): p. 609-15.
99. Corless, C.L., et al., *KIT mutations are common in incidental gastrointestinal stromal tumors one centimeter or less in size*. Am J Pathol, 2002. **160**(5): p. 1567-72.
100. Joensuu, H., *Risk stratification of patients diagnosed with gastrointestinal stromal tumor*. Hum Pathol, 2008. **39**(10): p. 1411-9.
101. Lee, H.E., et al., *Characteristics of KIT-negative gastrointestinal stromal tumours and diagnostic utility of protein kinase C theta immunostaining*. J Clin Pathol, 2008. **61**(6): p. 722-9.
102. Tzen, C.Y. and B.L. Mau, *Analysis of CD117-negative gastrointestinal stromal tumors*. World J Gastroenterol, 2005. **11**(7): p. 1052-5.
103. Espinosa, I., et al., *A novel monoclonal antibody against DOG1 is a sensitive and specific marker for gastrointestinal stromal tumors*. Am J Surg Pathol, 2008. **32**(2): p. 210-8.
104. Miettinen, M., Z.F. Wang, and J. Lasota, *DOG1 antibody in the differential diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: a study of 1840 cases*. Am J Surg Pathol, 2009. **33**(9): p. 1401-8.
105. Liegl, B., et al., *Monoclonal antibody DOG1.1 shows higher sensitivity than KIT in the diagnosis of gastrointestinal stromal tumors, including unusual subtypes*. Am J Surg Pathol, 2009. **33**(3): p. 437-46.
106. Oliveira, R.P.B., et al., *GIST: avaliações morfológica e imuno-histoquímica do prognóstico*. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, 2009. **45**(1): p. 49-54.
107. Feakins, R.M., *The expression of p53 and bcl-2 in gastrointestinal stromal tumours is associated with anatomical site, and p53 expression is associated with grade and clinical outcome*. Histopathology, 2005. **46**(3): p. 270-9.
108. Takahashi, R., et al., *Expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in gastrointestinal stromal tumor of the stomach*. Oncology, 2003. **64**(3): p. 266-74.
109. Martin, J., et al., *Deletions affecting codons 557-558 of the c-KIT gene indicate a poor prognosis in patients with completely resected gastrointestinal stromal tumors: a study by the Spanish Group for Sarcoma Research (GEIS)*. J Clin Oncol, 2005. **23**(25): p. 6190-8.

110. Tornillo, L. and L.M. Terracciano, *An update on molecular genetics of gastrointestinal stromal tumours*. J Clin Pathol, 2006. **59**(6): p. 557-63.
111. Steigen, S.E., et al., *Mutations in gastrointestinal stromal tumors--a population-based study from Northern Norway*. APMIS, 2007. **115**(4): p. 289-98.
112. Kim, T.W., et al., *Prognostic significance of c-kit mutation in localized gastrointestinal stromal tumors*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(9): p. 3076-81.
113. DeMatteo, R.P., et al., *Results of tyrosine kinase inhibitor therapy followed by surgical resection for metastatic gastrointestinal stromal tumor*. Ann Surg, 2007. **245**(3): p. 347-52.
114. Judson, I.R., *Prognosis, imatinib dose, and benefit of sunitinib in GIST: knowing the genotype*. J Clin Oncol, 2008. **26**(33): p. 5322-5.