

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA

Gisele Pereira de Carvalho

Avaliação imunoistoquímica da expressão das proteínas Akt e VEGFR e seu valor prognóstico em tumores estromais do trato gastrointestinal (GISTs).

Porto Alegre  
2012

Gisele Pereira de Carvalho

Avaliação imunoistoquímica da expressão das proteínas Akt e VEGFR e seu valor prognóstico em tumores estromais do trato gastrointestinal (GISTs).

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul para obtenção do título de Doutor em Clínica Médica e Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Bernardo Garicochea  
Co-orientadora: Profª. Dra. Rosângela Vieira de Andrade

Porto Alegre  
2012

## FICHA CATALOGRÁFICA

C331a Carvalho, Gisele Pereira de

Avaliação imunoistoquímica da expressão das proteínas Akt e VEGFR e seu valor prognóstico em tumores estromais do trato gastrointestinal (GISTs) / Gisele Pereira de Carvalho. - Porto Alegre: PUCRS, 2012.

65 f.: gráf. il. tab. Inclui artigo de periódico submetido à publicação.

Orientador: Prof. Dr. Bernardo Garicochea.

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosângela Vieira de Andrade.

Tese (Doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Doutorado em Medicina e Ciências da Saúde. Área de Concentração: Clínica Médica.

1. IMUNOISTOQUÍMICA. 2. TUMORES DO ESTROMA GASTROINTESTINAL . 3. NEOPLASIAS GASTROINTESTINAIS. 4. PROTEÍNAS TIROSINAS FOSFATASE. 5. PROTEÍNAS PROTO-ONCOGÊNICAS AKT. 6. PTEN FOSFOIDROLASE. 7. ESTUDOS RETROSPECTIVOS. 8. ESTUDOS TRANSVERSAIS I. Garicochea, Bernardo. II. Andrade, Rosângela Vieira de . III. Título.

C.D.D. 616.99433

C.D.U. 616.33-006:577.27(043.2)

N.L.M. QW 504.5

Rosária Maria Lúcia Prena Geremia  
Bibliotecária CRB 10/196

Gisele Pereira de Carvalho

Avaliação imunohistoquímica da expressão das proteínas Akt e VEGFR e seu valor prognóstico em tumores estromais do trato gastrointestinal (GISTs).

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul para obtenção do título de Doutor em Clínica Médica e Ciências da Saúde.

Aprovada em: \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA:

\_\_\_\_\_  
Dra. Alessandra Menezes Morelle - HMM

\_\_\_\_\_  
Dra. Ana Elizabeth Figueiredo – FAENFI – PUCRS

\_\_\_\_\_  
Dr. Marcelo Toneto- PUCRS

\_\_\_\_\_  
Dra. Sheila Schuch Ferreira – PUCRS

Porto Alegre  
2012

Dedico este trabalho e minha formação  
profissional à minha mãe e avó materna,  
que são para mim, modelos de sabedoria  
e amor incondicional.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

Ao Dr. Bernardo Garicochea, agradeço pelas inúmeras oportunidades, momentos de aprendizado, crescimento pessoal e profissional.

Além de um agradecimento especial, registro minha profunda admiração pelo médico competente, pesquisador qualificado, professor, um mestre que tem uma habilidade indiscutível de partilhar seus conhecimentos. Ao ensinar, o faz com tanto entusiasmo que é possível aprender sobre biologia molecular entre outras coisas como se estivéssemos assistindo a um filme de ficção! Foi assim, que ao conversar sobre a possibilidade da construção de um projeto para o doutorado que acabei me encantando ao ouvir falar, pela primeira vez, nos tumores estromais do trato gastrointestinal. Não foi preciso mais do que 05 minutos para que me convencesse de que realmente valeria a pena estudar esta patologia. Em poucos dias escrevi um projeto sobre um tema a que recém fora apresentada e, pelo qual, acabei me apaixonando.

Ao meu orientador, que muito me ensinou:

“Um problema só surge quando estão presentes todas as condições para solucioná-lo” (Karl Marx)

Se aos amigos não dizemos Adeus....Dr. Bernardo, até breve!

## AGRADECIMENTOS

As minhas irmãs amadas Tanisi e Alessandra por todo o amor, carinho e apoio.

Ao meu pai, Gildo (*in memoriam*) por acreditar nas potencialidades das filhas, pelo amor e principalmente pelo otimismo com que encarava a vida.

Ao meu marido, Luis Alberto, pela ajuda e grande incentivo.

As amigas e colegas, professoras da Faculdade de Enfermagem da PUCRS pelo apoio e ajuda durante esta etapa final mantendo-me encorajada a prosseguir na busca do meu sucesso profissional.

A Silvana Lunardini, amiga fiel, sempre disponível auxiliando no que fosse preciso, inclusive na árdua tarefa de coleta dos blocos de parafina superando, até mesmo, a “fobia” de aranhas. Agradeço também aos aprendizados do laboratório.

As colegas Priscilla Almeida e Tânia Mielke pela parceria e incentivo. Por todos os momentos em que necessitei ficar ausente da Unidade de Pesquisa Clínica do Serviço de Oncologia. Por ter sido encorajada a seguir nas atividades do doutorado e ao mesmo tempo manter as atividades da pesquisa clínica.

Ao colega Carlos Fedrigo pela disponibilidade em ajudar, principalmente, nesta etapa final.

Ao Dr. Marcelo Toneto pelo apoio e pacientes encaminhados.

A Dra Sheila S. Ferreira pelo grande apoio, carinho, encaminhamento de pacientes e principalmente por me passar imenso entusiasmo ao pesquisar os tumores estromais do trato gastrointestinal.

Aos amigos, secretários do Serviço de Oncologia, Márcia, Mirian e Rudimar pela amizade e pela disponibilidade para ajudar com prontuários e impressão de exames.

A Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, por me permitir fazer parte desta maravilhosa Instituição e, em especial, a coordenação da Pós Graduação da Faculdade de Medicina pelo apoio, tornando possível a conclusão deste trabalho.

Aos pacientes, meu especial agradecimento, carinho e profunda admiração por terem sido um exemplo de luta e esperança, nos surpreendendo a cada dia ao nos mostrarem o quanto o ser humano é capaz de suportar. Agradeço por acreditarem na ciência como uma alternativa para um tratamento cada vez melhor. Saudades das amigas Luciane e Jacinta.

## RESUMO

**Introdução:** GISTs são raros, correspondendo de 1 a 3% de todas as neoplasias do trato gastrointestinal, entretanto, são as neoplasias mesenquimais mais comuns desta localização. Possuem uma apresentação, comportamento clínico e resposta à terapia heterogêneos. O prognóstico pode ser grosseiramente estimado pelo tamanho tumoral ao diagnóstico, topografia e índice mitótico. Apesar da utilidade destes fatores de prognóstico de simples obtenção, a heterogeneidade da doença exige que marcadores mais específicos sejam aplicados para uma avaliação individual não apenas prognóstica ao diagnóstico, mas também preditiva ao tratamento com novas drogas disponíveis. A ativação aberrante das proteínas da via de sinalização PI3K/Akt/PTEN é um fenômeno relativamente comum em neoplasias epiteliais e hematológicas, com repercussão tanto na agressividade da neoplasia como na sua resistência adquirida a tratamentos anti-neoplásicos. Além da sinalização para mecanismos de sobrevivência, a via PI3K/Akt/PTEN está envolvida na ativação de angiogênese por meio da transcrição de VEGF e secundariamente do seu receptor endotelial, VEGFR. O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão das proteínas VEGFR, Akt e PTEN em pacientes com GIST ao diagnóstico, na tentativa de correlacionar a mesma com desfechos clínicos. Paralelamente acompanhamos o efeito do nível de expressão destas proteínas em um subgrupo de pacientes com doença avançada que recebeu a medicação Mesilato de Imatinib (Glivec®). **Método:** Avaliação imunoistoquímica com método TMA de 48 espécimes de GISTs utilizando os anticorpos monoclonais para Akt e VEGFR. A hiper-expressão de Akt foi verificada em 33,3% e VEGFR em 75% das amostras. Na análise do grupo geral de pacientes, a hiper-expressão de Akt correlacionou-se com uma SLP (sobrevida livre de progressão) estatisticamente encurtada ( $p > 0.05$ ) exclusivamente para casos com doença metastática. Esta correlação não foi observada em casos com doença não inicial (estágios I a III). No entanto, mesmo em doença avançada, a hiper-expressão de Akt não teve impacto na sobrevida global. Como o grupo de pacientes com doença avançada foi o grupo que recebeu Glivec®, a correlação com SLP e hiper-expressão de Akt se manteve. A ausência de expressão de VEGFR se associou com melhor sobrevida global (SG) em todos os estágios (incluindo os pacientes que receberam Glivec®), mas não com sobrevida livre de doença (SLD). Este dado sugere que os pacientes com baixa expressão de

VEGFR poderiam ter uma doença de biologia mais indolente, mesmo que a taxa de recorrência seja idêntica ao grupo com VEGFR hiper-expresso. Conclusões: os resultados deste estudo sugerem que a baixa expressão de VEGFR é um fator de prognóstico favorável em pacientes com doença em qualquer estágio. A hiperexpressão de Akt associa-se a uma menor SLP apenas em casos avançados, sugerindo que a ativação desta via poderia ser um mecanismo adquirido em etapas finais da doença que conferem resistência ao Glivec®.

## *ABSTRACT*

Gastrointestinal sarcomatoid tumors (GIST) are rare malignancies, corresponding to 1 - 3% of all GI cancers. Nevertheless, GISTs are the most common GI mesenchymal malignancies. GISTs are heterogeneous in presentation, clinical course and response to therapy. Their prognosis can be roughly estimated at diagnosis by assessing tumor size, mitotic index and the topography of the primary lesion. Despite the proved utility of these prognostic factors, their limitations are well documented, and a more refined set of biological markers are much needed. The abnormal activation of the cell survival signaling pathway provided by PI3K/Akt/PTEN proteins is a well known feature in advanced epithelial and hematological malignancies, impacting the aggressiveness of the disease as well as the resistance to different traditional therapies or biological agents. Besides their multi-effect in cell survival mechanisms, the PI3K/Akt/PTEN pathway is a powerful activator of angiogenesis via VEGF protein family transcription. The different isoforms of VEGF will in turn activate the VEGF receptor (VEGFR) at the surface of endothelial cells. Therefore, VEGFR is a reliable marker of angiogenesis in human tumors. We sought to evaluate the expression of VEGFR and Akt proteins in a series of GIST patients at diagnosis, treated in a single institution, in order to correlated the level of expression of these proteins to clinical outcomes, such as overall survival (OS) and disease free survival (DFS). The level of expression of these proteins was also correlated to the same outcomes in a subgroup of patients with advanced disease who received more than three months of therapy with Imatinib Mesylate (Gleevec®). Methods – 48 GIST patients were evaluated. Immunohistochemistry for VEGFR and Akt was performed by tissue microarray. Results – Akt hyperexpression was statistically correlated with a shorter DFS in the group of patients with metastatic disease (all of them receiving Gleevec®). This correlation was not observed in early cases (defined as curable disease – stages I to III). We have not observed correlation between Akt expression and OS in any clinical stage. Lower VEGFR expression was associated to a significant better OS in all stages (including patients receiving Gleevec®). Conversely, DFS was not affected by the level of expression of VEGFR. CONCLUSIONS – Low VEGFR expression was related to a better prognosis in any clinical stage of GIST, reflected in larger OS. The fact that this effect was observed in

Gleevec® treated patients suggests that the better response to the drug is much more related to the biology of the tumor than to the treatment itself. Akt showed also a promising role as a prognostic marker for disease free survival in advanced disease, indicating that GISTs with hyperexpressed Akt pathway behave more aggressively or may be less sensitive to Gleevec®.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Variáveis incluídas no Nomograma de GIST .....	18
Figura 2 - Estrutura esquemática das mutações de KIT e PDGFRA em GISTs .....	22
Figura 3 - Representação esquemática da via de sinalização PI3K/Akt/PTEN e exemplos de moléculas conhecidas que atuam na angiogênese pela via PI3K/Akt. 23	
Figura 4 – Sinalização intracelular mediada pelo Akt .....	24
Figura 5 – Placenta: controle negativo, 200X .....	33
Figura 6 – Rim: controle negativo, 100X.....	33
Figura 7 – PTEN: controle positivo (placenta), 100X .....	34
Figura 8 - VEGFR2: controle positivo (placenta), 100X .....	34
Figura 9 – Akt: controle positivo (tumor em rim), 100X .....	34
Figura 10 - Curvas de SG segundo estadiamento .....	44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estadiamento TNM para tumores estromais do trato gastrointestinal de todos os sítios.....	19
Tabela 2 - Anticorpos e respectivos clones, diluições e controles positivos usados no procedimento de imunistoquímica. ....	32
Tabela 3 - Características clínico-patológicas da população estudada (n=48).....	37
Tabela 4 - Descrição dos casos com história clínica de outra neoplasia e tumores sincrônicos.....	38
Tabela 5 - Características imunistoquímicas da população estudada (n=48).....	40
Tabela 6 – Análise da SG conforme a imunexpressão de Akt e VEGFR, segundo os estádios.....	42
Tabela 7 – Análise da SLP conforme a imunexpressão de Akt e VEGFR e o grupo de estágio IV.....	43
Tabela 8 - Análise da SG e imunexpressão de Akt e VEGFR conforme uso de Glivec®. ....	46

## LISTA DE SIGLAS

AJCC - *American Joint Committee on Cancer*  
Akt – quinase treonina serina  
BSA – solução de albumina bovina  
FDA - *Food and Drug Administration*  
GIST – *Gastrointestinal Stromal Tumor* (tumor estromal do trato gastrointestinal)  
HSL – Hospital São Lucas  
ICESP – Instituto do Câncer do Estado de São Paulo  
IGFR-1 - Insulin-like growth factor type-1  
IH - imunoistoquímica  
KIT – proteína tirosina-quinase  
*KIT*- gene tirosina-quinase  
PBS – fosfato tampão  
PDGFA – fator de crescimento derivado de plaquetas alfa  
PDGFRA – receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas alfa  
PI3K – fosfatidil-inositol 3-quinase  
PTEN – proteína tensina fosfatase  
*PTEN* – gene tensina fosfatase  
PUCRS – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
RTK – receptor tirosina-quinase  
SCF – *stem-cell factor*  
SPSS – *Statistical Package to Social Sciences*  
TCLE – termo de consentimento livre e esclarecido  
TGF – fator de crescimento fibroblástico  
TGF $\alpha$  – fator de crescimento transformador alfa  
TGF $\beta$  – fator de crescimento transformador beta  
TGI – trato gastrointestinal  
TMA - tissue macro array  
TNF- $\alpha$  – fator de necrose tumoral alfa  
VEGF – fator de crescimento endotelial vascular  
VEGFR – receptor do fator de crescimento endotelial vascular

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
1.1	Estadiamento	17
1.2	Diagnóstico Patológico	20
1.3	Biologia Molecular dos GIST	21
1.4	Via de sinalização PI3K-Akt/PTEN	23
1.5	Angiogênese	25
1.6	Sobrevida e Tratamento	26
<b>2</b>	<b>HIPÓTESE</b>	<b>29</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>30</b>
3.1	Objetivo Principal	30
3.2	Objetivos Secundários	30
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODO</b>	<b>31</b>
4.1	Considerações Éticas	31
4.2	Imunoistoquímica	31
4.3	Análise por Microscopia Óptica	34
4.4	Avaliação da Imunorreatividade das Células Tumorais	34
4.5	Método Estatístico	35
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>36</b>
5.1	Caracterização da amostra	36
5.2	Análise Imunoistoquímica de VEGFR, Akt e PTEN	41
5.3	Análise de sobrevida global e VEGFR/Akt	41
5.4	Análise da SG e imunexpressão de VEGFR e Akt estratificada por estadios	42
5.5	Análise da SLP e imunexpressão de VEGFR e Akt	43
5.6	Análise de SLD e imunexpressão de VEGFR e Akt	44
5.7	Análise da imunexpressão de VEGFR e Akt e uso de Glivec®	45
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>47</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>53</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>54</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>61</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os tumores estromais do trato gastrointestinal (GISTs – *Gastrointestinal Stromal Tumors*) são neoplasias provenientes de células marca-passo mesenquimais (células de Cajal) originalmente encontradas no trato gastrointestinal, mas que podem ocorrer em outras áreas como no retroperitônio, mesentério e omento (MIETTINEN et al., 1999; REITH et al., 2000; WEISS, 2001). GISTs são raros, correspondendo de 1 a 3% de todas as neoplasias do trato gastrointestinal (TGI) (MCGRATH 1987; LIGHT 1988; NG et al., 1992). Entretanto, os GISTs são as neoplasias mesenquimais mais comuns do TGI. Em 1983 MAZUR e CLARK introduziram o termo “tumor estromal”. No entanto, tal denominação foi instituída somente por volta de 1990, quando o CD34 foi descoberto como um marcador para tumores estromais que se originam do trato gastrointestinal (MIETTINEN et al., 1995). A incidência anual de GIST é de aproximadamente 10 casos por um milhão de habitantes conforme estudos populacionais (MUCCIARINI et al., 2007; NILSSON et al., 2005, STEIGEN et al., 2006). Em recente estudo estima-se que este número possa chegar em 15 casos por milhão de habitantes por ano (LIEGL-ATZWANGER et al., 2010). A exata incidência de GIST é difícil de determinar, uma vez que, estes tumores foram reconhecidos apenas recentemente como entidade patológica distinta. No Brasil, especificamente, a falta de dados epidemiológicos dos tumores estromais pode estar relacionada às sub-notificações, bem como a falta de bancos de dados epidemiológicos que se proponham a captar casos, não somente de pacientes tratados e acompanhados na própria Instituição, como também em centros vizinhos visto que a incidência desta neoplasia é pouco freqüente.

Os GISTs geralmente ocorrem em indivíduos acima de 50 anos de idade sendo que a média de idade varia de 55 a 65 anos (VAN DER ZWAN et al., 2005). São raros antes dos 40 anos de idade e extremamente raros em crianças; a maioria dos tumores identificados como GIST em crianças são na realidade, tumores inflamatórios miofibroblásticos (DEMETRI, 2001). Apresentam características benignas e malignas, sendo o comportamento maligno geralmente identificado pelo aumento da atividade mitótica com conseqüente proliferação tumoral. Os sintomas associados a esta neoplasia são: dor abdominal, disfagia, saciedade precoce e obstrução. A ocorrência de anemia é rara podendo surgir devido a sangramento

crônico ou hemorragia decorrente da erosão da mucosa abdominal ou gastrointestinal (CHIARA; DEI TOS, 2011). De acordo com NILSSON e cols. (2005) apenas 20% dos GISTs são assintomáticos e identificados durante o estadiamento ou acompanhamento de outras neoplasias e 10% diagnosticados durante autópsias, sendo 70% dos casos sintomáticos. Os tumores estromais do trato gastrointestinal ocorrem em qualquer área do trato gastrointestinal sendo mais comuns no estômago (60%), jejuno e íleo (30%), duodeno (5%), colorretal (4%) e raramente no esôfago e apêndice podendo também ocorrer fora do trato gastrointestinal (MIETTINEN et al., 2005; MIETTINEN et al., 2006; DeMATTEO et al., 2000).

A média de tamanho do GIST ao diagnóstico é de aproximadamente 5-7cm de diâmetro, no entanto, os tumores podem apresentar-se com diâmetros de 30-40cm (JOENSUU et al., 2011).

### **1.1 Estadiamento**

A escolha da melhor terapia para o tratamento dos GISTs tem sido baseada em características genótípicas e fenotípicas. Tais características vêm trazendo novos paradigmas no estadiamento e conseqüentemente modificando a escolha do tratamento. A primeira proposta de critério de estratificação de risco foi apresentada por FLETCHER e cols. (2002) a qual continha quatro níveis de risco para recidiva baseado no tamanho inicial do tumor em centímetros e índice mitótico por 50 campos de grande aumento. Após este consenso, uma nova classificação considerou os tumores gástricos com melhor prognóstico quando comparados aos GISTs intestinais (MIETTINEM; LASOTA, 2006). Posteriormente HUANG e cols. (2007) modificaram a denominação dos grupos de risco passando a classificá-los como níveis I a IV incluindo importante valor ao tamanho inicial do tumor além de manter a taxa mitótica como uma das variáveis de classificação. GOLD e cols. (2009) desenvolveram e validaram um nomograma (gráfico linear identificando variáveis) para estadiamento e probabilidade de sobrevida livre de recidiva após ressecção cirúrgica de GIST primário. Desta forma, o referido nomograma auxilia na escolha da terapia adjuvante com Mesilato de Imatinib (Glivec®) para pacientes com doença localizada baseando-se no risco de recidiva. Para tanto, devem ser consideradas as seguintes variáveis: tamanho tumoral, localização e índice mitótico. Por outro lado, também é importante identificar e distinguir os pacientes com GIST metastático daqueles pacientes que apresentam múltiplos tumores esporádicos

estromais do trato gastrointestinal. No caso destes pacientes com múltiplos tumores esporádicos, estudos apontam evidência de distintas mutações em diferentes neoplasias demonstrando origens independentes para os tumores sincrônicos (GASPAROTTO et al., 2008; AGAIMY et al., 2009).

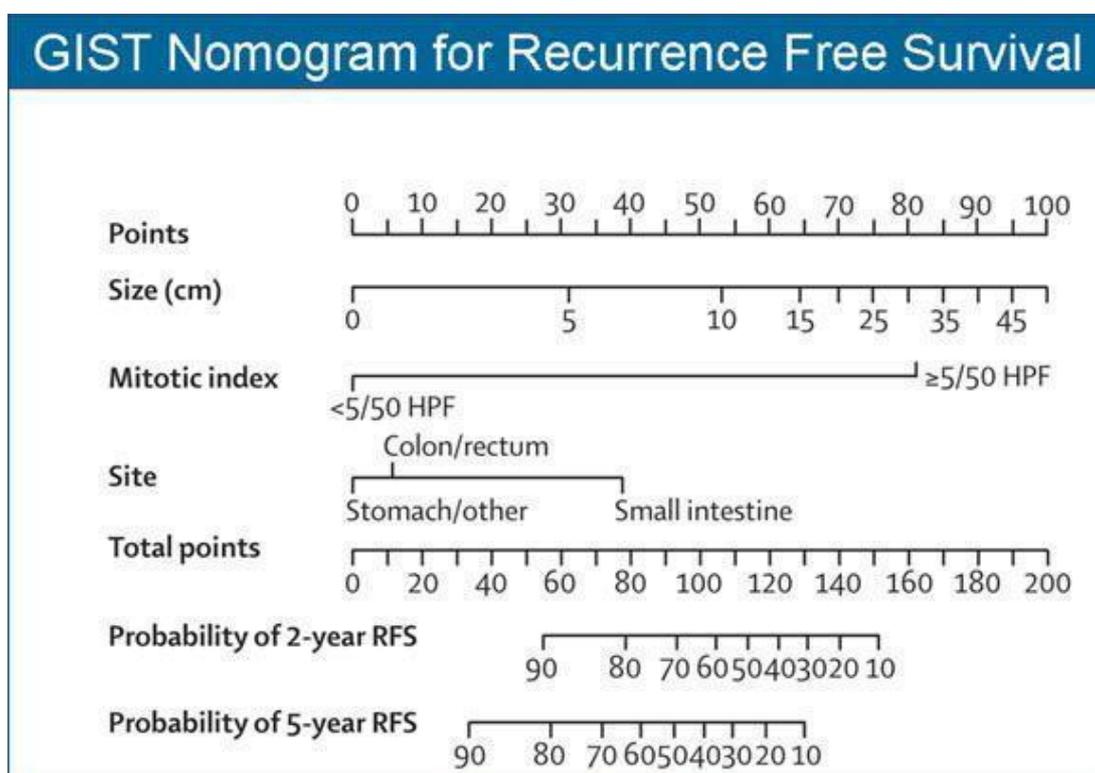


Figura 1 - Variáveis incluídas no Nomograma de GIST

De acordo com o manual da *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) o estadiamento clínico e patológico dos GISTs apresenta-se nas categorias TNM de onde T representa o tamanho tumoral avaliado pelo exame físico, imagem e/ou por exploração cirúrgica; N representa o número de linfonodos comprometidos avaliados pelo exame físico, imagem e/ou exploração cirúrgica e M representa a presença de metástases avaliadas no exame físico, imagem e/ou exploração cirúrgica. A classificação do grau histológico está somente relacionada ao índice mitótico tumoral, conforme demonstrado na tabela a seguir.

Tabela 1 - Estadiamento TNM para tumores estromais do trato gastrointestinal de todos os sítios.

<b>Tumor Primário (T)</b>				
TX	Tumor primário não pode ser avaliado			
T0	Nenhuma evidência de tumor primário			
T1	Tumor ≤ 2cm			
T2	Tumor > 2cm e ≤ 5cm			
T3	Tumor > 5cm e ≤ 10cm			
T4	Tumor > 10cm na sua maior dimensão			
<b>Linfonodos Regionais (N)</b>				
NX	Linfonodos regionais não podem ser avaliados			
N0	Nenhum linfonodo regional metastático			
N1	Linfonodo regional metastático			
<b>Grau histológico (G)*</b>				
GX	O grau não pode ser avaliado			
G1	Baixo grau, taxa mitótica ≤ 5/50 HPF (campo de grande aumento)			
G2	Alto grau, taxa mitótica > 5/50 HPF (campo de grande aumento)			
*avaliado pela atividade mitótica				
<b>Grupos prognóstico/Estadiamento anatómico</b>				
Estágio	T	N	M	Taxa Mitótica
GIST Gástrico**				
IA	T1 ou T2	N0	M0	Baixo
IB	T3	N0	M0	Baixo
II	T1	N0	M0	Alto
	T2	N0	M0	Alto
	T4	N0	M0	Baixo
IIIA	T3	N0	M0	Alto
IIIB	T4	N0	M0	Alto
IV	Qualquer T	N1	M0	Qualquer taxa
	Qualquer T	Qualquer N	M1	Qualquer taxa

\*\* classificação também utilizada para tumores de omento

<b>Grupos prognóstico/Estadiamento anatômico</b>				
Estágio	T	N	M	Taxa Mitótica
GIST Intestinal***				
I	T1 ou T2	N0	M0	Baixo
I	T3	N0	M0	Baixo
IIIA	T1	N0	M0	Alto
	T4	N0	M0	Baixo
IIIB	T2	N0	M0	Alto
	T3	N0	M0	Alto
	T4	N0	M0	Alto
IV	Qualquer T	N1	M0	Qualquer taxa
	Qualquer T	Qualquer N	M1	Qualquer taxa

\*\*\* classificação também utilizada para GIST de esôfago, colorretal, mesentério e peritônio.

## 1.2 Diagnóstico Patológico

No que se referem aos achados citológicos, os GISTs possuem duas variações morfológicas representadas pelos subtipos epitelióides e fusiformes, sendo este último o mais freqüente (WIECZOREK et al., 2001; ELLIOTT et al., 2006).

A imunoistoquímica tem um papel importante no diagnóstico diferencial dos GISTs. Várias neoplasias que se originam da parede interna do trato gastrointestinal podem ter características morfológicas semelhantes aos GISTs. As quais incluem: leiomioma, leiomiossarcoma, tumor desmóide intra-abdominal, schwannoma e neurofibroma. A maioria dos GISTs são fortemente positivos quando marcados com anticorpos direcionados contra a proteína KIT (CD117). Por ser uma proteína de sinalização transmembrana a coloração do CD117 é interpretada como positiva tanto na membrana, no citoplasma quanto em ambos (FLETCHER 2002; De SILVA, REID 2003; BADALAMENTI ET AL., 2007). No entanto, nem todos os GISTs são fortemente positivos para CD117 e outros completamente não-reativos. Os GISTs com negatividade para CD117 geralmente apresentam positividade maior no receptor tirosina-quinase do fator de crescimento derivado de plaquetas – alfa (PDGFRA) do que no KIT, estando o PDGFRA mutado (HEINRICH et al., 2003; MEDEIROS et al., 2004). Aproximadamente 70% dos GISTs são positivos tanto para CD117 quanto para CD34, o que ajuda a confirmar o diagnóstico de GIST. Sendo o CD34 o melhor indicador do fenotípico maligno dos GISTs (WANG; BONNER, 2000). A expressão de CD34 ocorre em aproximadamente 70% dos casos, actina do

músculo liso 40%, proteína S100 em 5% dos casos e raramente desmina (LOPES et al., 2007).

### 1.3 Biologia Molecular dos GIST

Do ponto de vista molecular, o funcionamento e desenvolvimento normal das células intestinais do Cajal dependem do receptor Kit (HUIZINGA et al., 1995; MAEDA et al., 1992; TORIHASHI et al., 1995). Desta forma, os GISTs se caracterizam por geralmente apresentarem expressão aberrante de dois marcadores associados às células mesenquimais primitivas, CD34 e c-Kit (ou CD117). (SARLOMO-RIKALA et al., 1998; MIETTINEN et al., 1995) O c-Kit é um receptor tirosina-quinase transmembrana no qual a porção extracelular se ativa a partir da ligação com o *stem-cell factor* (SCF) (MAJUNDER et al., 1988; BLUME-JENSEN et al., 1991). A porção intracelular contém um domínio tirosina-quinase que se ativa por dimerização desencadeando uma cascata de sinalização celular que controla funções celulares como, proliferação, diferenciação, apoptose e adesão celular (BLECHMAN et al., 1993; ZHANG et al., 2000). Desta forma, os GISTs se caracterizam por geralmente apresentarem expressão aberrante de dois marcadores associados às células mesenquimais primitivas, CD34 e c-Kit (ou CD117). (SARLOMO-RIKALA et al., 1998; MIETTINEN et al., 1995) Adicionalmente, mutações no gene PDGFRA mapeado no mesmo cromossomo também promovem tal efeito celular (HEINRICH et al., 2003; CORLESS et al., 2004; JOENSEN et al., 2011). É importante salientar que tais mutações são excludentes, ou seja, não existem casos de mutações em PDGFRA e *KIT* simultaneamente no mesmo tumor. Tais mutações encontradas em GISTs estão localizadas no exons 8, 9, 11, 13 ou 17 no *KIT* e 12, 14 ou 18 no PDGFRA podendo envolver substituições, deleções ou inserções. A estrutura esquemática do *KIT* e receptores tirosina-quinase PDGFRA, bem como suas mutações, está apresentada na figura 2. A mutação mais comum no *KIT* afeta o domínio logo abaixo da membrana celular que é decodificado pelo exon 11, região de maior frequência de mutações em GIST (HEINRICH et al., 2003).

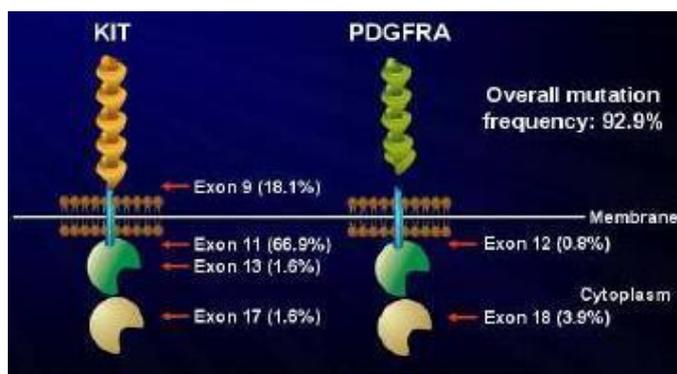


Figura 2 - Estrutura esquemática das mutações de KIT e PDGFRA em GISTs

Contudo, *KIT* e *PDGFRA* são ativados pela ligação de seus respectivos ligantes, SCF e PDGFA na região EC, constituindo uma sinalização oncogênica. A ligação com o ligante resulta na homo-dimerização do receptor e subsequente fosforilação cruzada de tirosinas citoplasmáticas as quais servem como sítios de ligação para sinalização de diversas proteínas, conduzindo a ativação de substratos que regulam a proliferação celular, adesão, motilidade e sobrevivência. (BLUME-JENSEN et al., 1991).

Certamente muitos outros eventos moleculares que envolvem a sinalização e vias de sobrevivência celular estão afetados em GIST. Estes eventos podem explicar a heterogeneidade da doença e especialmente a resposta variável e temporária a agentes-alvos. A ativação de vias de sinalização e de sobrevivência celular, seja pela aquisição de mutações em genes centrais nestes eventos, seja pela amplificação da expressão dos mesmos, vem sendo alvo de intensa investigação nas neoplasias humanas. Estas alterações obedecem a determinados padrões em diversas etapas da progressão de um tumor e explicam a resistência a drogas e a velocidade com que uma célula maligna progride ou se dissemina.

A via de sinalização PI3K-Akt/PTEN encontra-se freqüentemente afetada em tumores humanos, e vem sendo alvo de investigação de uma nova geração de drogas alvo capaz de conter sua sinalização descontrolada. Esta via sinaliza diretamente proteínas que intermediam entre diversas funções, a proliferação celular, apoptose e regulação da produção de novos vasos (angiogênese).

Curiosamente, em GIST tanto a via PI3K-Akt/PTEN como angiogênese foram pouco estudadas em doença avançada até o momento, resultado provável da

raridade da doença como da sua recente definição como entidade isolada dos outros tipos de sarcoma.

#### 1.4 Via de sinalização PI3K-Akt/PTEN

Vários componentes da via PI3K/Akt/PTEN estão envolvidos no processo de tumorigênese (VIVANCO; SAWYERS et al., 2002; CANTLEY, 2002). O PI3K, Akt e PDK1 são importantes na regulação de vários processos celulares incluindo proliferação, sobrevivência, metabolismo de carboidratos e motilidade além de evidências de que estas quinases são importantes componentes no mecanismo molecular de doenças como câncer, diabetes e inflamação crônica (STEIN et al., 2000; STEIN et al., 2001). Contudo a via PI3K/Akt/PTEN é um alvo atrativo para desenvolvimento de novas drogas inibindo a proliferação celular revertendo a supressão da apoptose e a resistência à terapia citotóxica em células neoplásicas.

De acordo com recente artigo de revisão publicado por OKUMURA e cols.(2012), o VEGF e o VEGFR são os maiores indutores da angiogênese associados à angiogênese tumoral em inúmeros tumores sólidos e leucemias. O VEGF se liga ao VEGFR conduzindo a ativação do PI3K pela via de sinalização PI3K/Akt. A sinalização PI3K/Akt regula a angiogênese através alteração da expressão de VEGF, conforme demonstra a figura 3 (OKUMURA et al., 2012).

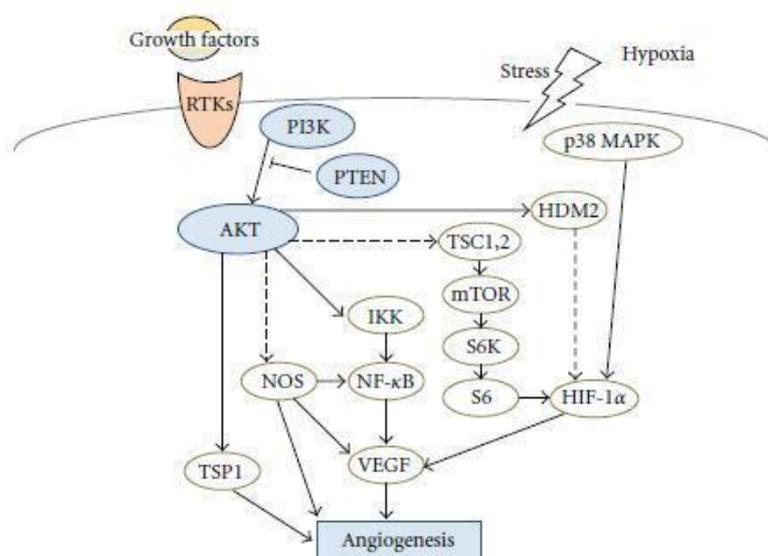


Figura 3 - Representação esquemática da via de sinalização PI3K/Akt/PTEN e exemplos de moléculas conhecidas que atuam na angiogênese pela via PI3K/Akt.

Em adição, a survivina, proteína pró-apoptótica também regulada pela via PI3K (MARTINELLI et al., 2006; ZHA, et al., 2010) está hiper-regulada nas células endoteliais em resposta ao VEGF. A survivina e o VEGF também atuam como quimioprotetores nas células endoteliais, protegendo-as de drogas indutoras da apoptose. Este papel quimioprotetor requer a ativação da via PI3K/Akt (TRAN, et al., 2002).

A quinase-treonina-serina (Akt) funciona como um regulador da sobrevivência, proliferação, metabolismo e migração celular. A Akt ativada modula a função de vários substratos relacionados a progressão do ciclo celular na transição das fase G1/S e G2/M, e também pela fosforilação direta das próprias proteínas alvo (TAPON et al., 2001). A desregulação da quinase Akt, decorrente da mutação no gene *Akt*, está frequentemente associada com doenças humanas como diabetes e câncer (CHENG et al., 1992). Alterações na sinalização do Akt em neoplasias, também resulta de mutações originadas no início da cascata de fosforilação celular partindo do fosfatidil-inositol 3-quinase (PI3K) e da proteína análogo tensina-fosfatase (PTEN) conforme demonstra figura 4.

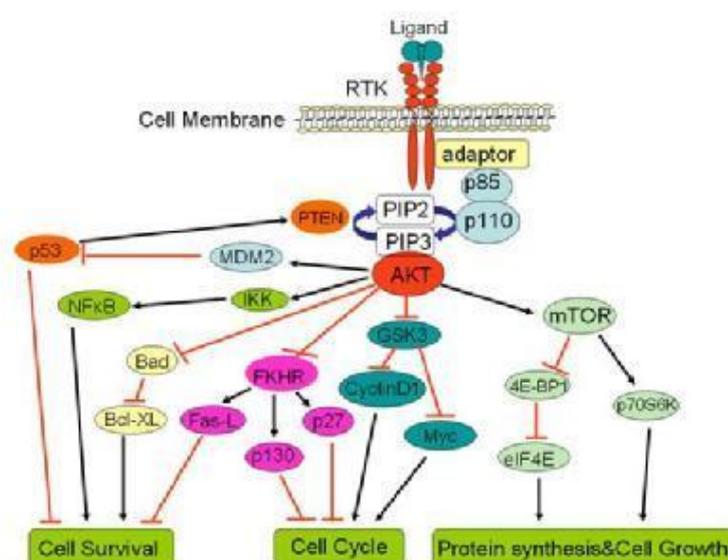


Figura 4 – Sinalização intracelular mediada pelo Akt

O gene *PTEN* (análogo tensina-fosfatase) é um gene supressor tumoral localizado na região cromossômica 10q23 que atua como um regulador da síntese

protéica de um número de processos celulares, incluindo a angiogênese, através da inibição da síntese do VEGF (GU et al., 1999). Sua ativação regula o crescimento e sobrevivência celular através da atividade fosfatase lipídica e a adesão e invasão através da atividade da proteína tirosina fosfatase (TAMURA et al., 1999; WHANG et al., 1998). O *PTEN* é um dos genes que apresentam maior frequência de mutação (SANSAL ; SELLERS, 2004). O LOH (perda de heterozigosidade) do cromossomo 10q (inativação do *PTEN*) conduz a um aumento permanente dos níveis de sinalização da via PI3K/Akt, geralmente resultando no aumento da proliferação celular e resistência a apoptose (JIANG; LI, 2009).

De acordo com estudo de Ricci e cols. (2004) a avaliação imunoistoquímica do *PTEN* parece ser um método promissor para avaliação prognóstica em GISTs.

### 1.5 Angiogênese

A angiogênese é o processo pelo qual uma estrutura estimula a produção de novos vasos sanguíneos através de processos controlados e dependentes de fatores estimuladores e inibidores. Possui quatro estágios: aumento da permeabilidade capilar, produção de enzimas que degradam a matriz extracelular e promovem a migração de células endoteliais, diferenciação de novos vasos e estabilização e maturação de vasos por moléculas que recrutam células mesenquimais (BUSSOLINO et al., 1997).

A indução da angiogênese é mediada por múltiplas moléculas que são liberadas tanto pelas células tumorais quanto por células normais; incluindo as células endoteliais, epiteliais, mesoteliais e leucócitos. Entre as famílias de moléculas responsáveis pela angiogênese está a família do fator de crescimento fibroblástico (TGF), fator de crescimento endotelial derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ), fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (FOLKMAN 1995; FOX 1996) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (STEPHAN et al., 1996).

A angiogênese tem um papel importante na sobrevivência das células neoplásicas, no local do crescimento tumoral e no desenvolvimento de metástases à distância (FOLKMAN, 1995).

O VEGF é um mitógeno, potente fator angiogênico, que regula a proliferação endotelial celular e a permeabilidade vascular (STEPHAN et al., 1996). O ligante VEGF possui três tipos de receptores tirosina-quinase: VEGFR1/FLT1,

VEGFR2/KDR e VEGFR3/FLT4, dos quais o VEGFR2 tem papel importante na angiogênese induzida pelo VEGF (ELLIS; HICKLIN, 2008).

Geralmente a necrose é ocasionada por suprimento insuficiente de sangue, o qual é necessário para o crescimento celular. No entanto, em células tumorais a necrose atua como um precursor para eventos moleculares angiogênicos (KLEIHUES; COVENEY, 2000). A hipóxia é um modulador fisiológico importante para o VEGF, ativando níveis transcricionais e pós-transcricionais, tanto na angiogênese normal quanto na angiogênese tumoral (MACHEIN; PLATE, 2000). A expressão do VEGF é um preditor útil do comportamento agressivo biológico dos GISTs, tendo a angiogênese associada ao VEGF um papel importante, pelo menos em parte, no prognóstico dos GISTs (IAMAMURA, et al., 2007). Em adição a regulação do VEGF, a expressão de receptores de VEGF também estará aumentada. Os receptores do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFRs) são receptores do tipo tirosina-quinase ativados através da dimerização induzida por seus ligantes.

## **1.6 Sobrevida e Tratamento**

A sobrevida dos pacientes com GIST vêm aumentando nos últimos anos a partir do conhecimento da epidemiologia e biologia molecular destes tumores e estratificação de risco bem como a resistência às drogas. No entanto, o tratamento cirúrgico de doença primária localizada é a primeira opção para esta neoplasia, sendo que 50% destes terão recidiva do tumor depois da ressecção de GIST primário (NCCN, 2008). A biópsia não é mandatória antes da cirurgia, exceto para casos em que se considera a possibilidade de tratamento neoadjuvante. A meta da cirurgia é a remoção do tumor com margens livres e a linfadenectomia geralmente não é necessária, pois os GISTs raramente metastatizam para linfonodo (<5%) (DEMATTEO et al., 2000; APARICIO et al., 2004).

De acordo com o artigo de revisão de Corless e cols. (2011) durante a última década os GISTs têm servido como um importante modelo no campo de terapias alvo moleculares para tumores sólidos. A introdução de terapias inibidoras tirosina-quinase conduziu á uma rápida evolução no entendimento da biologia molecular destes tumores. Um estudo publicado por Bishop e cols. (1985) mostrou que a inativação de tirosinas-quinases específicas era suficiente para reverter o processo

de transformação celular. Atualmente, as tirosinas-quinases têm sido alvos terapêuticos promissores a partir de uma série de estratégias utilizadas para interromper as vias oncogênicas que estão ativadas (SNYDER et al., 2006).

A ativação descontrolada de vias dependentes de tirosina-quinases em GIST, por conta das mutações em *kit* e PDGF, logo se mostrou um modelo ideal para o estudo de pequenas moléculas com atividade clínica inegável em outros tumores humanos que também dependiam destas vias, como a leucemia mielóide crônica e certos tipos de leucemia linfóide aguda. E, de fato, algumas destas moléculas conhecidas coletivamente como inibidores de tirosina-quinase, logo se mostraram um potencial extraordinário ao induzirem respostas objetivas e prolongadas em muitos pacientes com GIST.

Os GISTs possuem mutação no *Kit* localizado no cromossomo 4. Este gene codifica uma proteína transmembrana que serve como receptor do fator de crescimento do *stem cell factor* (SCF). A proteína transmembrana tem um domínio intracelular contendo a enzima tirosina-quinase, a qual, uma vez ativada, propaga uma cascata de atividades celulares conduzindo a divisões celulares (DESHAIES et al., 2010). A mutação do *Kit* causa uma descontrolada ativação na tirosina-quinase independentemente do fator SCF. A ativação da tirosina-quinase envolve ligantes de uma molécula de trifosfato de adenosina para ativar o sítio da tirosina-quinase. A terapia alvo com Glivec® (ou STI-571), específico inibidor de proteínas produzidas pelos genes mutados de KIT e PDGFR, atua ocupando o sítio de ligação prevenindo a fosforilação e ativação da enzima (RUBIN et al., 2000). Aproximadamente 80% destes pacientes se beneficiaram da terapia (VANDER et al., 2005). Os GISTs foram os primeiros tumores sólidos em que os inibidores tirosina-quinase foram altamente efetivos proporcionando o desenvolvimento e teste destes inibidores em outros tipos de câncer humano (JOENSUU; DEMATTEO, 2011).

A terapia adjuvante com o inibidor tirosina-quinase (Glivec®) prolonga a sobrevida livre de doença (SLD) podendo melhorar a sobrevida global (SG) (JOENSUU; DE MATTEO, 2011). O estudo clínico fase III randomizado NCT00116935, apresentou um significativo benefício com a utilização do Glivec® por um período de 12 meses em pacientes que se submeteram a ressecção cirúrgica. Porém, no Brasil, embora a utilização do Imatinib na adjuvância conste em

bula, esta medicação não é liberada pelo serviço público ficando este uso a critério médico e mediante liminar judicial.

Desde a aprovação do Imatinib pelo *Food and Drug Administration* (FDA) em 2002, esta terapia alvo tem se mantido como primeira linha sistêmica para tratamento de GISTs. Nos últimos 10 anos, os resultados demonstram um sucesso temporário com média de sobrevida livre de progressão (SLP) menor de dois anos conforme ensaios clínicos fase III (BLANKE et al., 2008; VERWEIJ et al., 2004). A progressão é primeiramente atribuída ao desenvolvimento de mutações secundárias que conferem resistência ao Imatinib (MALEDDU et al., 2009). Nos casos de falha a terapia com Glivec® por resistência ou intolerância, o Sunitinib (Sutent®) torna-se uma alternativa de tratamento por ser também um inibidor tirosina-quinase atingindo receptores como o VEGFR, PDGFRA e  $\beta$ . Desta forma, o Sutent® atua bloqueando a angiogênese via inibição da expressão de VEGF. A aprovação desta droga pelo FDA ocorreu em 2006 tendo indicação não somente para GIST com falha a terapia com Glivec®, mas, também para outras neoplasias como tumor renal avançado e tumor neuroendócrino pancreático.

## **2 HIPÓTESE**

Expressão aberrante de Akt ou perda de função de PTEN têm sido apontadas como um dos principais fenômenos de resistência de terapias-alvo em cânceres humanos. Da mesma forma, tumores que se apresentam com defeitos nestas proteínas costumam ter prognóstico mais sombrio e serem mais avançados ao diagnóstico, além de menos sensíveis a tratamentos quimioterápicos. A hipótese deste trabalho é que a perda da integridade da via AKT, mediada pela expressão desta proteína, do seu inibidor PTEN ou de um dos seus produtos de ativação, VEGFR, deve afetar a taxa de proliferação de células de GIST assim como a resistência destas células a drogas inibidoras de tirosina-quinase. A escolha deste tumor como modelo de estudo de resistência molecular a drogas deve-se a dependência extrema e homogênea do mesmo a ativação por tirosina-quinases e da escassez de estudos sobre fatores de prognóstico e de resistência a terapias alvo neste tipo de tumor.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Principal**

Determinar a expressão das proteínas AKT, PTEN e VEGFR por imunohistoquímica em espécimes de GIST.

#### **3.2 Objetivos Secundários**

Determinar o perfil epidemiológico da população em estudo.

Correlacionar a expressão de AKT, PTEN e VEGFR em GIST com a sobrevida global (SG) e sobrevida livre de progressão (SLP) para pacientes que receberam tratamento com Imatinib por, pelo menos 3 meses.

Avaliar a associação entre a expressão inicial de AKT, PTEN e VEGFR ao diagnóstico em amostras de GIST e a sobrevida livre de doença (SLD) e SG.

## **4 MATERIAL E MÉTODO**

Trata-se de um estudo retrospectivo e transversal realizado no Serviço de Oncologia do Hospital São Lucas da PUCRS (HSL-PUCRS). A amostra foi constituída, por conveniência, de pacientes com diagnóstico de GIST (confirmados e revisados pelo Serviço de Patologia desta Instituição) que utilizaram o Glivec® por pelo menos três meses como tratamento adjuvante ou paliativo, pacientes que foram submetidos ao tratamento cirúrgico com intuito curativo e aqueles que realizaram somente biópsia. Além destes critérios de inclusão também foram considerados a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), bem como, amostra de tecido tumoral viável para análise laboratorial. O critério de utilização do Glivec® por no mínimo 3 meses, foi adotado para criar uma possibilidade de avaliação da atuação desta droga. Além disto, os pacientes que participaram de estudos clínicos com utilização de novas drogas ou com drogas usuais, porém com doses aumentadas também foram excluídos desta amostra. A obtenção dos dados demográficos e clínicos foi feita através da coleta direta do documento fonte dos pacientes (prontuário do paciente). Para auxiliar na coleta de dados foi utilizada uma ficha clínica contendo as variáveis de interesse (anexo 1) a qual foi desenhada exclusivamente para este estudo com o auxílio do Software TELEFORM versão 10.2. Após o preenchimento das fichas, as mesmas foram digitalizadas no programa TELEFORM 10.2 e os dados transcritos para uma planilha Excell facilitando o processamento dos dados e posterior tratamento estatístico.

### **4.1 Considerações Éticas**

O presente estudo baseou-se na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde, como instrumento norteador dos aspectos éticos. Desta forma, todos os casos apresentaram um TCLE institucional (anexo 2) autorizando a natureza do estudo. O estudo foi iniciado somente após aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital São Lucas da PUC-RS, 09/01/2009 conforme ofício nº 024/09 (anexo 3).

### **4.2 Imunoistoquímica**

A imunoistoquímica (IH) é um método de análise aplicada em tecidos a qual permite identificar, com auxílio de anticorpos específicos, características protéicas mais variadas. O procedimento de IH foi realizado em lâminas TMA (*tissue macro*

*array*), conhecida como técnica de arranjo em matriz de amostras teciduais. Esta técnica permite a elaboração de um bloco de parafina contendo amostras tumorais obtidas de vários blocos de parafina originais, desta forma, simplifica o trabalho e diminui o custo da determinação da expressão do marcador.

Os anticorpos primários foram diluídos em anti-Akt (clone Ser473 , Cell Signaling Technology), anti-VEGFR2 (clone MM0003-7G63 Cell Signaling Technology) e anti-PTEN (clone D4.3, Cell Signaling Technology) usando como diluente a solução salina tamponada com fosfato tampão (PBS). Os dados referentes aos clones e controles, bem como às diluições estão descritos na tabela abaixo.

Tabela 2 - Anticorpos e respectivos clones, diluições e controles positivos usados no procedimento de imunistoquímica.

<b>Anticorpo</b>	<b>Clone</b>	<b>Diluição</b>	<b>Controle +</b>
Akt	Ser473	1:200	TUMOR RENAL
VEGFR2	7G63	1:200	PLACENTA
PTEN	D4.3	1:100	PLACENTA

As reações foram realizadas seguindo-se os seguintes passos:

- a) Foram realizados cortes histológicos com 3 $\mu$ m de espessura em micrótomo rotativo Leica RT2150;
- b) Desparafinização: utilização de estufa histológica (DeLeo) por 20 minutos a temperatura de 69°C, 2 incubações em xilol por 5 minutos cada e 5 incubações com álcool etílico 99°C por 2 minutos cada, após, lavagem corrente até remoção completa do álcool;
- c) Recuperação antigênica: mediante incubação das lâminas em solução de ácido cítrico 10mM pH 6.0 (Merck, EUA) em panela a vapor; após a fervura da água da panela as lâminas foram colocadas em uma cuba em solução de recuperação por 40 minutos. Esfriamento à temperatura ambiente. Lavagens com água destilada;

- d) Bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 5% diluída em álcool metílico, em dois banhos de 15 minutos cada. Lavagens em água destilada. Após, lavagem com solução PBS 10mM pH 7,4 por 5 minutos;
- e) O bloqueio de ligações inespecíficas foi realizado com leite em pó desnatado 10% em tampão PBS;
- f) Incubação das lâminas com o anticorpo primário (específico para o antígeno), diluído em solução de albumina bovina (BSA) (Sigma, EUA) a 1% e azida sódica NaN<sub>3</sub> (Inlab, São Paulo) 0,1% em PBS, em incubadora BOD: 30minutos a 37°C e, em seguida, 18horas (over night) a 5°C. Lavagens em tampão PBS com 3 trocas de 5 minutos cada;
- g) Para detecção da reação antígeno-anticorpo foram utilizados anticorpo secundário biotilado e complexo avidina-HRP;
- h) A marcação foi realizada utilizando como cromógeno a diaminabenzina (DAB, DAKO) e a contra-coloração com Hematoxilina de Harris por 1minuto desidratadas em uma série de lavagens com álcool etílico a 99°, clarificadas em xilol e montadas com bálsamo do Canadá e lamínula.

Os controles, ilustrados abaixo, utilizados nas reações imunoistoquímicas compreenderam um controle sabidamente positivo (placenta) para os anticorpos em estudo e um controle negativo com incubação em PBS e eliminação do anticorpo primário, seguindo-se dos demais procedimentos imunoistoquímicos.

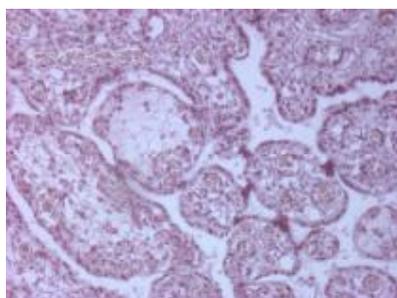


Figura 5 – Placenta: controle negativo, 200X

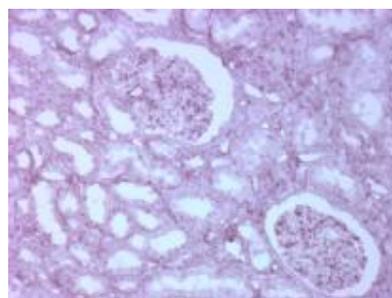


Figura 6 – Rim: controle negativo, 100X

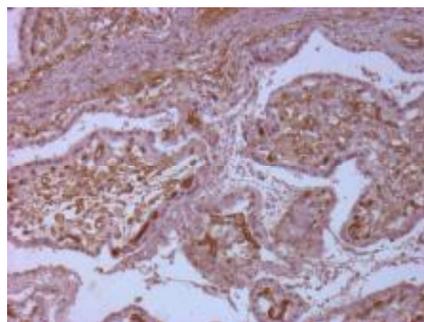
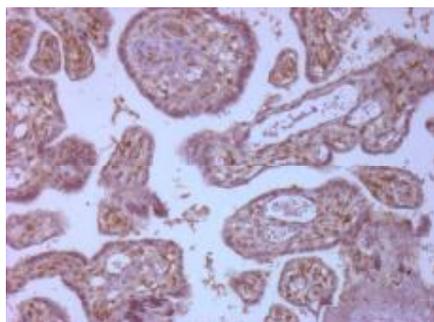


Figura 7 – PTEN: controle positivo (placenta), 100X      Figura 8 - VEGFR2: controle positivo (placenta), 100X

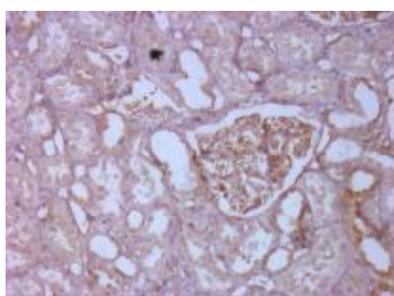


Figura 9 – Akt: controle positivo (tumor em rim), 100X

#### 4.3 Análise por Microscopia Óptica

Todas as lâminas de TMA coradas com os anticorpos VEGFR, Akt e PTEN foram analisadas pela patologista Dra. Renata Coudry do Instituto de Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) em microscópio com magnificação de 400X.

#### 4.4 Avaliação da Imunorreatividade das Células Tumorais

A avaliação da imunorreatividade das células tumorais foi realizada para os anticorpos VEGFR, Akt e PTEN seguindo um padrão de classificação semi-quantitativo. A imunorreatividade citoplasmática por IH foi determinada como sendo ausente (0), fraca (1), moderada (2) ou forte (3). Por se tratar de amostras por TMA não foi avaliado a extensão e, sim, somente a intensidade da imunorreatividade.

#### 4.5 Método Estatístico

A análise dos dados teve como abordagem inicial a estatística descritiva com a distribuição de frequências simples e relativa, bem como, média, desvio padrão e amplitude para a idade, onde o estudo da distribuição ocorreu pelo teste de Kolmogorov-Smirnov.

Para a comparação das variáveis categóricas entre os dois grupos envolveu o teste Exato de Fisher e, nas comparações entre variáveis contínuas foram utilizados os teste t-Student, Mann Whitney, Kruskal Wallis e coeficiente de correlação de Spearman. Para a análise de sobrevida, foi utilizado o método de Kaplan-Meier e a comparação entre as curvas de sobrevida acumulada pelo teste log-rank.

Os dados receberam tratamento estatístico através do software SPSS 17.0 (*Statistical Package to Social Sciences for Windows* - SPSS Inc., Chicago, IL, USA, 2008) onde, para critérios de decisão foi adotado o nível de significância ( $\alpha$ ) de 5%.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Caracterização da amostra

Dos 78 casos de GIST atendidos no HSL-PUCRS no período de 1999 a 2011, somente 48 preencheram os critérios de inclusão. Destes, 91,7% (44) foram espécimes provenientes de ressecção cirúrgica e 8,3% (4) de biópsia. A média de idade ao diagnóstico foi de 59,4 anos, com mínima de 29 anos e máxima de 84 anos de idade. Sessenta e nove por cento dos pacientes eram do sexo feminino e 31% (15) do sexo masculino.

Por se tratar de um estudo transversal, os dados clínicos foram atualizados em abril de 2012 e as referidas amostras foram oriundas de material emblocado em parafina no período descrito acima (1999 a 2011) e antes do início de qualquer terapia sistêmica.

O diagnóstico de GIST foi confirmado por IH como parte dos critérios de inclusão. Sendo que 10,4% (5) das amostras obtiveram diagnóstico inicial pelo anátomo-patológico de leiomiossarcoma e 6,2% (3) diagnóstico inicial de sarcoma indiferenciado. A localização mais freqüente foi no estômago acometendo 37,5% (18) dos pacientes, 29,1% (14) intestino delgado, 12,5% (6) intestino grosso, 12,5% (6) extra trato gastrointestinal, 4,2% (2) reto e 4,2% (2) esôfago, conforme demonstra a tabela 3.

No que se referem aos sinais e sintomas observados ao diagnóstico a dor abdominal, alterações intestinais e perda de peso foram as queixas mais frequentes dos 48 pacientes, 39,5% (19) e 23% (11) e 23% (11) respectivamente.

O tamanho médio dos tumores foi de 7,5cm, variando de 0,3 a 28 cm. Dos 48 tumores, 12,5% (6) foram  $\leq 2$ cm, 29,1% (14) apresentaram tamanho  $> 2$  e  $\leq 5$ cm, 23% (11) tamanho  $> 5$  e  $\leq 10$ cm e 35,4% (17) apresentaram tamanho superior a 10cm.

Tabela 3 - Características clínico-patológicas da população estudada (n=48)

Casos	Gênero	Idade	Sinais e Sintomas ao diagnóstico	Diagnóst	Localiz	Tamanho	Margens	Porf Inv	Macro
1	F	72	DOR ABDOMINAL	GIST	DELG	4,5	Livres	Indeterm	Cística
2	F	72	CONSTIPAÇÃO ASTENIA PERDA PESO	GIST	EST	10,7	Livres	Serosa	Nodular
3	F	69	DOR EPIGÁSTRICA E PERDA PESO	GIST	EST	4,6	Livres	músc sub	Nodular
4	F	72	DOR ABDOMINAL	GIST	EST	11	Livres	s/invasão	Nodular
5	M	73	CONSTIPAÇÃO	GIST	IGROS	9	Livres	Serosa	Nodular
6	M	84	DOR EPIGÁSTRICA E PERDA PESO	GIST	EST	10,9	Comp	Serosa	ulcerada
7	M	69	ACHADO OCASIONAL	GIST	DELG	9,5	Livres	Serosa	Nodular
8	F	56	ANEMIA	GIST	RETROP	16	Comp	Serosa	ulcerada
9	M	65	SEM IFORMAÇÕES	GIST	EST	3	Livres	s/invasão	Nodular
10	F	61	DOR ABDOMINAL, NÁUSEA/VÔMITOS	GIST	I. GROS	7	Livres	Muscular	polipóide
11	F	69	DOR ABDOMINAL E PERDA PESO	GIST	DELG	9,5	Livres	Serosa	Nodular
12	F	56	SEM IFORMAÇÕES	GIST	EST	2,5	Livres	s/invasão	Nodular
13	F	29	HEMATÊMESE, PERDA DE PESO	GIST	EST	5	Comp	Serosa	ulcerada
14	F	67	DOR ABDOMINAL PERDA DE PESO	LEIOMIO	EST	4,1	Livres	Serosa	Nodular
15	M	64	DOR ABDOMINAL	GIST	DELG	23,7	Livres	Fígado	Nodular
16	F	51	SEM IFORMAÇÕES	GIST	ESOF	4,2	Livres	Serosa	Nodular
17	F	52	DOR ABDOMINAL DIARRÉIA	GIST	DELG	7,2	Livres	Serosa	NA
18	F	77	DOR ABDOMINAL	GIST	EST	10,8	Livres	ulcerada	NA
19	M	83	SEM IFORMAÇÕES	GIST	RETROP	14	Livres	s/invasão	Lobular
20	F	52	SEM IFORMAÇÕES	GIST	DELG	1,3	Livres	Serosa	Nodular
21	F	75	CONSTIPAÇÃO E DOR ABDOMINAL	GIST	EST	5,0	Livres	Mucosa	Nodular
22	F	67	CONSTIPAÇÃO	GIST	IGROS	13,4	Comp	muscular	Nodular
23	F	34	NÁUSEAS E VÔMITOS	LEIOMIO	DELG	13,5	Livres	Fígado	NA
24	M	59	DOR LOMBAR	LEIOMIO	RETROP	16	Livres	muscular	bosselada
25	M	71	DOR ABDOMINAL	GIST	EST	1	Livres	s/invasão	Nodular
26	M	48	DOR ABDOMINAL	SARCOMA	DELG	7,0	Livres	Adiposo	úlcerada
27	M	63	ACHADO OCASIONAL	GIST	EST	11,3	Livres	s/invasão	bosselada
28	F	68	DIARRÉIA E PERDA PESO	GIST	EST	1,1	Livres	s/invasão	NA
29	M	56	ACHADO OCASIONAL	GIST	EST	4,0	Livres	s/invasão	Nodular
30	F	44	DIARRÉIA E PERDA PESO	GIST	IGROS	3,5	Livres	s/invasão	bosselada
31	M	47	INAPETÊNCIA, DOR ABDOMINAL	LEIOMIO	RETROP	28,0	Livres	NA	Nodular
32	M	46	ACHADO OCASIONAL - TU SINCRON	GIST	RETO	0,3	NA	NA	NA
33	M	48	DOR ABDOMINAL	GIST	DELG	13	Livres	Mucosa	Nodular
34	F	62	ACHADO OCASIONAL - TU SINCRON	GIST	DELG	4,5	NA	NA	NA
35	F	58	DOR ABDOMINAL	GIST	PERIT	6,6	Livres	s/invasão	Mixóide
36	F	63	ACHADO OCASIONAL POR EDA - TU SINCRÔNICO	GIST	EST	0,6	NA	NA	NA
37	F	46	CONSTIPAÇÃO	LEIOMIO	RETO	12	Comp	muscular	Nodular
38	F	61	DOR ABDOMINAL E DIARRÉIA TU SINCRÔNICO	GIST	DELG	18,5	Comp	Mucosa	Nodular
39	F	33	DOR ABDOMINAL E PERDA PESO	SARCOMA	IGROS	5,0	Livres	Submuc	polipóide
40	F	65	ACHADO OCASIONAL POR EDA	GIST	EST	5,2	Livres	Submuc	Ovóide
41	F	64	PIROSE	GIST	ESOF	8,3	Livres	s/invasão	Nodular
42	F	45	ANEMIA E ASTENIA	GIST	EST	5,6	Livres	muscular	Nodular
43	F	55	DISTENSÃO ABDOMINAL	GIST	PERIT	9,5	Comp	NA	Nodular
44	F	57	PERDA DE PESO	GIST	DELG	0,3	NA	NA	NA
45	F	79	DOR ABDOMINAL PERDA PESO	GIST	DELG	17,5	Livres	s/invasão	Nodular
46	F	56	DOR ABDOMINAL CONSTIPAÇÃO	SARCOMA	IGROS	3,2	Comp	Mucosa	Nodular
47	F	79	MELENA, HEMATÊMESE	GIST	DELG	7,6	Livres	Mucosa	Nodular
48	M	32	DOR E DISTENSÃO ABDOMINAL	GIST	EST	3,1	Livres	Mucosa	Nodular

LEGENDA: F: feminino; M: masculino, NA – não avaliado; Comp: comprometida; DELG: intestino delgado; EST: estômago; I.Grosso: intestino grosso; submuc: submucosa; s/invasão: sem invasão, TU SINCRON: tumor sincrônico.

Dos 48 pacientes, 14,6% (7) o diagnóstico de GIST foi feito de forma acidental, sendo que destes, três casos foram de tumores sincrônicos. A tabela 4 descreve 12 casos, vinte e cinco por cento da amostra, que apresentaram história clínica de outra neoplasia, incluindo tumores sincrônicos. Dos pacientes vivos até o momento, somente 16,7% (2) encontram-se vivos e sem doença sendo que 42% (5) evoluíram para óbito, com uma mediana de sobrevida global de 46,9 meses.

Tabela 4 - Descrição dos casos com história clínica de outra neoplasia e tumores sincrônicos.

Caso	Sexo	Idade	Hist Fam	História clínica	Localiz	Status	SG
3	F	69	NEG	CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE ESÔFAGO	EST	ÓBITO	27
11	F	69	POS	ADENOCARCINOMA DE COLON	DELG	VIVO S/ DOENÇA	92
23	F	34	NA	CÂNCER DE MAMA BILATERAL	DELG	ÓBITO	24
32	M	46	NEG	NEO CERVICAL E BRÔNQUICO SINCRÔNICO	RETO	VIVO C/ DOENÇA	14
34	F	62	NA	CARCINOMA EPIDERM PULMÃO SINCRÔNICO	DELG	VIVO C/ DOENÇA	17
36	F	63	POS	COLANGIOCARCINOMA SINCRÔNICO	EST	ÓBITO	22
37	F	46	NA	CA DE OVÁRIO	RETO	ÓBITO	8
39	F	33	POS	SÍNDROME DE GARDNER	GROSSO	VIVO C/ DOENÇA	86
41	F	64	POS	ADENOCARCINOMA DE RETO	ESÔF	VIVO S/ DOENÇA	37
43	F	55	NEG	NEOPLASIA UTERINA	PERIT	ÓBITO	98
47	F	79	NEG	CÂNCER MAMA E DE CÓLON	DELG	VIVO C/DOENÇA	106
48	M	32	POS	TUMOR POLIPÓIDE	EST	VIVO C/ DOENÇA	32

LEGENDA: NEG: negativo, POS: positivo, NA: não avaliado, EST: estômago, DEL: intestino delgado, PERIT: peritônio, ESOF: esôfago

A determinação do estadiamento foi realizada conforme proposto pela AJCC. É importante ressaltar que utilizamos a classificação pTNM (patológico). Os estádios IA e IB foram determinados para 33% (16) dos pacientes, 17% (8) estadios II, 8% (4) estadios IIIA e IIIB, e 42% (20) com estadios IV. O tempo mediano de recidiva para os pacientes com doença localizada foi de 25 meses, variando de 2 a 160 meses, ou seja, excluem-se aqui os casos de estadios IV.

No que se refere a sobrevida global, ao final de aproximadamente 160 meses de seguimento, 35,4% (n=17) dos investigados vieram a óbito, com uma probabilidade de sobrevida de 64,6% e estimativa de tempo mediano de 91,6 (IQR25-75% 34,5 a 148,7) meses.

Quarenta e quatro amostras foram oriundas de procedimento cirúrgico e 8,3% (4) oriundas de biópsia. Conforme descrição anátomo-patológico, das 44 cirurgias realizadas, o comprometimento da margem foi verificado em 18% (8) sendo que 82% (36) apresentaram margens livres. Em 20,4% (9) das abordagens cirúrgicas foi realizada ressecção linfonodal e, destes, dois pacientes apresentaram comprometimento. Sendo um caso com presença de metástases em 6 de 9 linfonodos ressecados e o segundo, o laudo anátomo-patológico apenas descrevia presença de neoplasia em linfonodos sem a identificação de quantos foram ressecados.

Os pacientes foram avaliados tanto por exame físico quanto por exames de imagem, aproximadamente 79%(38) dos pacientes realizaram tomografia computadorizada pré e pós-operatória e mantiveram o mesmo tipo de exame nas avaliações subsequentes de acompanhamento da doença. Por se tratar de um estudo de coorte transversal não houve padronização do tempo transcorrido entre a avaliação pós-cirúrgica e as demais avaliações de acompanhamento. Desta forma, o período entre cada avaliação variou de paciente para paciente.

No que tange ao tratamento, dos 48 pacientes, somente um não recebeu tratamento, pois apresentava tumor sincrônico (câncer de pulmão) o qual já estava recebendo outro esquema quimioterápico. Quanto aos demais 47 pacientes, 52,1% (25) realizaram somente cirurgia com intuito curativo; 27,1% (13) cirurgia + Glivec®; 8,3% (4) cirurgia + Glivec® + quimioterapia; 8,3% (4) cirurgia + quimioterapia; 2,1% (1) cirurgia + radioterapia + Glivec®.

Dos 17 pacientes que utilizaram o Glivec®, 31,2% (5), o fizeram no cenário metastático, enquanto que os demais 4,2 (2) utilizaram a referida medicação na adjuvância. Um destes pacientes recebeu Imatinib na adjuvância por apresentar tumor hepático sincrônico e o outro por apresentar co-morbidade cardiovascular e por ter GIST de tamanho tumoral classificado como T4.

Tabela 5 - Características imunoistoquímicas da população estudada (n=48)

Casos	Akt	VEGFR	Mitoses	AE1/AE3	$\alpha$ -SMA	CD117	CD34	Desmin	Ki67	NSE	PS100	Viment	PDGFR
1	FRA	FRA	NA	NA	NA	POS	POS	NA	5	NA	NA	POS	POS
2	FRA	FRA	NA	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NA	POS	NA	POS	NA
3	MOD	MOD	baixo	NA	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NA
4	MOD	FRA	2	NEG	POS	POS	NA	POS	1%	NA	POS	POS	NA
5	MOD	FRA	alto	NEG	POS	POS	NEG	NEG	5%	NA	NEG	POS	NEG
6	FOR	FRA	40	POS	NEG	POS	NA	NEG	15%	NA	POS	POS	POS
7	FOR	FRA	NA	POS	NEG	POS	NA	NA	2%	NA	NA	POS	POS
8	MOD	FOR	NA	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	4%	POS	NA	POS	NEG
9	FOR	FRA	2	NA	NEG	POS	NA	NEG	2%	NA	NEG	POS	NA
10	MOD	MOD	NA	NA	NA	POS	POS	NA	NA	NA	NEG	POS	NA
11	FRA	NUL	5	NEG	POS	POS	NEG	NEG	5%	POS	NEG	NEG	NA
12	FOR	NUL	NA	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	3%	NA	NEG	POS	NA
13	MOD	NUL	NA	NA	POS	POS	POS	NEG	2%	NA	NA	NA	NA
14	FOR	NUL	baixo	NA	NA	POS	POS	NEG	1%	NA	NA	POS	NA
15	FRA	NUL	NA	NEG	NEG	POS	POS	NEG	5%	NEG	POS	POS	NA
16	FRA	FOR	1	NA	POS	NA	POS	POS	1%	NA	NA	NA	POS
17	MOD	FRA	NA	NEG	POS	POS	POS	NEG	3%	POS	POS	POS	NA
18	MOD	NUL	NA	NA	POS	POS	POS	NEG	5%	NA	NEG	NA	NA
19	MOD	FRA	5	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	20%	NEG	NEG	POS	POS
20	MOD	FRA	1	NA	NEG	POS	NEG	NA	1%	NEG	NA	POS	NA
21	MOD	NUL	1	NA	NA	POS	POS	NEG	3%	NA	NEG	POS	NA
22	FRA	FRA	NA	NEG	NEG	POS	POS	NEG	2%	POS	NEG	NA	NA
23	MOD	MOD	NA	NA	NA	POS	NEG	NA	NA	NA	NEG	POS	NA
24	FRA	FRA	15	NA	NA	POS	POS	NA	5%	NA	NA	NA	NA
25	FOR	NUL	6	NA	NEG	POS	POS	NEG	10%	NEG	NEG	POS	NEG
26	MOD	NUL	NA	NA	POS	POS	POS	NEG	1%	NEG	POS	POS	NA
27	FOR	MOD	1	NEG	NEG	POS	POS	NA	1%	NA	NEG	POS	POS
28	MOD	MOD	5	NA	NA	POS	POS	NA	2%	NA	POS	POS	POS
29	MOD	FRA	6	NA	NEG	POS	NEG	NEG	8%	NA	NEG	NEG	NA
30	FRA	FOR	<5	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	1%	NA	NEG	NA	POS
31	FRA	MOD	NA	NEG	POS	POS	POS	NEG	5%	POS	POS	NA	NA
32	FRA	MOD	>10	NEG	NEG	POS	NA	NEG	10%	NA	NEG	POS	POS
33	MOD	MOD	5	NA	POS	POS	NA	NA	30%	NA	NEG	POS	POS
34	MOD	FRA	1	NA	NA	POS	POS	NA	3%	NA	NA	NA	POS
35	MOD	MOD	2	NEG	NEG	POS	NA	NEG	5%	NA	NEG	NA	POS
36	FOR	MOD	<1	NA	NA	POS	NA	NEG	NA	NA	NA	NA	POS
37	FOR	FOR	NA	NA	NA	POS	NA	POS	NA	NA	NEG	NA	NA
38	MOD	FRA	>10	NEG	POS	NEG	NEG	POS	50%	NA	NEG	POS	POS
39	FOR	FRA	NA	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	4%	NA	POS	POS	POS
40	MOD	FRA	5	NEG	POS	NEG	POS	POS	1%	NA	NEG	POS	POS
41	FRA	MOD	NA	NA	NA	POS	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
42	FOR	NUL	>5	NA	NA	NA	NEG	NEG	3%	POS	NEG	POS	NA
43	MOD	FRA	NA	POS	NA	POS	NEG	POS	2%	POS	POS	NA	NA
44	FOR	FRA	NA	NA	NA	POS	NA	NEG	NA	NA	NEG	POS	NA
45	FRAC	MOD	10	NA	NEG	POS	POS	POS	10%	NA	NA	NA	POS
46	FRAC	FRA	NA	NEG	NEG	POS	NA	NEG	NA	NA	NEG	POS	NA
47	MOD	NUL	NA	NEG	NEG	POS	POS	NEG	1%	POS	NEG	NA	NA
48	MOD	FRA	1	NEG	NEG	POS	POS	NEG	2%	NA	NEG	POS	NA

LEGENDA: NA: não avaliado, POS: positivo, NEG: negativo, MOD: moderado, FOR: forte, FRA: fraca, NUL: nula

A tabela 5 apresentada acima descreve o painel imunoistoquímico do diagnóstico de GIST além de incluir as análises de VEGFR e Akt, sendo estas apresentadas conforme resultados da imunorreatividade do marcador (nula, fraca, moderada e forte). Das amostras estudadas, somente dois espécimes não foram testados para CD117. A combinação de positividade para CD117 e CD34 ocorreu em 37,5% (18) das espécimes, sendo PDGFR positivo em 35,4% (17). A expressão de PS100 e Vimentina foi observada em 21% (10) e 64,6% (31) respectivamente. No entanto, a actina de músculo liso foi expressa em somente 29,2% (14) das espécimes.

## **5.2 Análise Imunoistoquímica de VEGFR, Akt e PTEN**

A avaliação IH do PTEN não apresentou nenhuma imunorreatividade nas amostras testadas. Desta forma, devido à imunoexpressão ter sido negativa em todas as amostras, os dados não foram incluídos nesta análise.

Avaliando inicialmente a associação entre Akt e VEGFR, o teste Exato de Fisher não apontou associação estatística significativa ( $\chi^2_{\text{calc}}=6,913$ ;  $p=0,743$ ), indicando que os dois marcadores apresentaram sim uma relação de independência. Buscou-se, também, verificar o quanto as diferenças se mostraram expressivas entre as duas variáveis (discrepâncias) e, de acordo com o teste de McNemar, as diferenças observadas entre as classificações dos dois marcadores mostraram-se significativas (McNemar: 16,43;  $p=0,013$ ). Dos 48 casos investigados o VEGFR classificou 50,0% ( $n=24$ ) como fraco e 16,7% ( $n=8$ ) como ausente, enquanto que, pela imunoexpressão do Akt estas proporções foram de 2,1% ( $n=1$ ) e 22,9% ( $n=11$ ). Desta forma, há evidências de que o Akt foi significativamente mais imunorreativo que o VEGFR na população estudada.

## **5.3 Análise de sobrevida global e VEGFR/Akt**

Na comparação da SG entre as imunorreações do marcador Akt, o Teste de Kruskal Wallis não detectou diferença estatística significativa ( $p>0,05$ ), indicando que, as diferenças observadas entre as médias (medianas) se devem ao acaso. No entanto quando a comparação da SG ocorreu em função da classificação do

VEGFR, a diferença significativa se configurou ( $p < 0,01$ ), indicando que, a SG do grupo com VEGFR ausente ( $90,0 \pm 39,6$ ) mostrou-se significativamente mais elevada que as médias das demais intensidades, sendo que, entre as intensidades: fraco, moderado e intenso as médias de SG não diferiram entre si.

#### 5.4 Análise da SG e imunexpressão de VEGFR e Akt estratificada por estádios

Avaliando a relação entre a SG e as classificações Akt e VEGFR estratificadas pelos estádios, observamos que existe relação estatística significativa ( $p < 0,05$ ) nos casos de doença primária (descritas na tabela como “estádios outros”) para aqueles pacientes que não apresentam imunexpressão de VEGFR. Ou seja, a ausência de VEGFR está relacionada a um aumento na SG em pacientes com doença primária. O mesmo não foi verificado na análise do marcador Akt.

Tabela 6 – Análise da SG conforme a imunexpressão de Akt e VEGFR, segundo os estádios

Estádios	Variáveis	SG			p(value) <sup>∞</sup>
		Média	Desvio padrão	Mediana	
	<b>Akt</b>				
<b>Outros</b>	Forte	38,9	45,1	26,3	0,791
	Fraco	59,6	45,1	59,5	
	Moderado	55,4	43,0	55,4	
	Negativo	36,8	---	---	
	<b>Akt</b>				
<b>IV</b>	Forte	15,7	15,6	13,7	0,590
	Fraco	36,5	28,7	36,0	
	Moderado	38,1	40,0	24,1	
	<b>VEGFR</b>				
<b>Outros</b>	Forte	25,3c	3,2	25,4	0,046
	Fraco	42,9b	43,9	34,8	
	Moderado	32,6b	19,1	26,8	
	Negativo	89,7 <sup>a</sup>	43,4	87,4	
	<b>VEGFR</b>				
<b>IV</b>	Forte	21,7	12,3	24,1	0,173
	Fraco	37,3	34,2	34,1	
	Moderado	14,4	14,0	13,7	
	Negativo	91,6	---	---	

<sup>∞</sup>: teste de Kruskal wallis – Post Hoc – Teste de Dunn, onde médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente a 5%;

### 5.5 Análise da SLP e imunexpressão de VEGFR e Akt

Levando em consideração o grupo com estadio IV, a SLP foi comparada entre as classificações do marcador Akt, o Teste de Kruskal Wallis detectou diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ), indicando que, a SLP média para o Akt forte ( $16,6 \pm 15,5$ ) mostrou-se significativamente menor que as médias observadas nas classificações fraco ( $37,0 \pm 29,0$ ;  $p < 0,05$ ) e moderado ( $38,3 \pm 40,1$ ;  $p < 0,05$ ). Quando a comparação da SLP ocorreu entre as imunexpressões de VEGFR as diferenças observadas não se configuraram em função do reduzido tamanho de amostra em cada classificação. No entanto, considerando as SLP médias observamos uma tendência de comportamento semelhante, de forma que, quanto maior o grau do marcador, menor a média de SLP.

Tabela 7 – Análise da SLP conforme a imunexpressão de Akt e VEGFR e o grupo de estágio IV

Variáveis	SLP			p(value) <sup>∞</sup>
	Média	Desvio padrão	Mediana	
<b>Akt</b>				
Fraco (n=9)	37,0a	29,0	36,0	0,042
Moderado (n=8)	38,3a	40,1	24,0	
Forte (n=3)	16,6b	15,5	14,0	
<b>VEGFR</b>				
Negativo (n=2)	92,0	---	---	0,175
Fraco (n=11)	37,3	34,4	34,0	
Moderado (n=3)	16,7	14,0	14,0	
Forte (n=4)	21,7	12,6	24,0	

<sup>∞</sup>: teste de Kruskal wallis – Post Hoc – Teste de Dunn, onde médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente a 5%;

Avaliando a relação entre estágio e óbito, foi detectada associação estatística significativa ( $p < 0,001$ ), de forma que, os pacientes no estágio IV apresentaram 2,5 (IC95%: 1,3 – 4,5) vezes mais chance de óbito que o grupo que apresentou outros estádios. Sobre a prevalência de óbito por estágio, verificou-se que no grupo com estágio IV a proporção foi de 65,0% (13/20), enquanto que, no grupo com outros estádios a proporção foi de 14,3% (4/28).

Nas estimativas de tempo de sobrevivência, verificou-se que o tempo mediano no grupo “outros estádios”, doença primária, foi de 135,6 meses (IQR<sub>25-75%</sub> 113,3 a

157,9) com probabilidade e de sobrevida de 83,0%; enquanto que, no grupo com estágio IV o tempo foi de 41,4 meses ( IQR<sub>25-75%</sub> 23,2 a 59,7) sendo observada um probabilidade de sobrevida de 16,7%. Na comparação das curvas de sobrevida Kaplan-Meier, foi detectada diferença significativa entre os pacientes com doença avançada (estadio IV) e doença primária (Outros estadios) (log rank test tempo meses – Mantel-Cox=12,493;  $p < 0,001$ ).

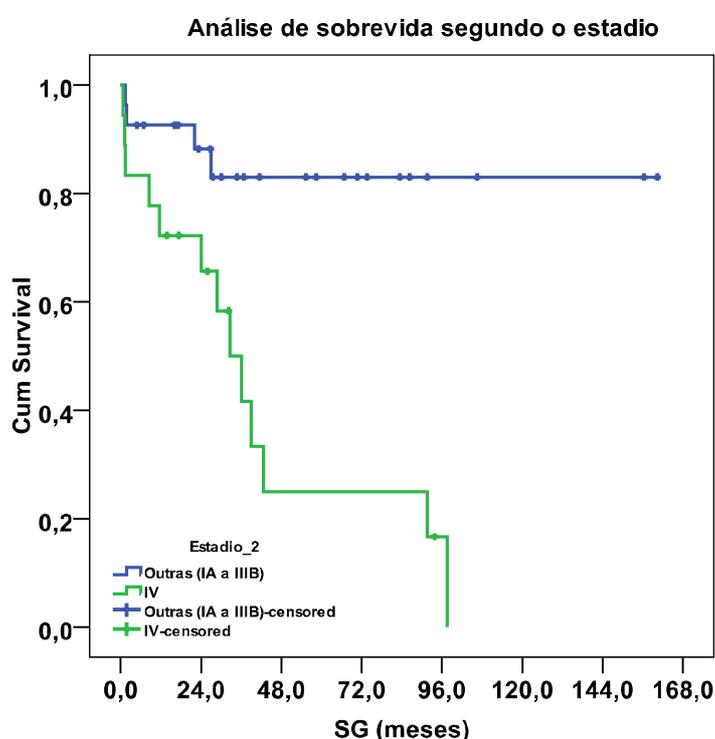


Figura 10 - Curvas de SG segundo estadiamento

### 5.6 Análise de SLD e imunexpressão de VEGFR e Akt

Avaliando a relação dos marcadores Akt e VEGFR em comparação com a SLD, para todos pacientes com doença primaria, foi detectada associação estatística significativa entre SLD e AKT ( $p < 0,05$ ), no entanto foi uma associação com baixo poder de inferência em função do reduzido tamanho de amostra diminuindo o poder estatístico do teste. Desta forma devemos acreditar que, para esta amostra, a

associação significativa não se configurou, cabendo aos resultados apresentados uma abordagem descritiva.

### **5.7 Análise da imunexpressão de VEGFR e Akt e uso de Glivec®**

Quando a SG foi comparada entre as imunexpressões de Akt na amostra estratificada pelo uso de Glivec®, não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas tanto no grupo que recebeu Imatinib quanto no grupo que não recebeu esta medicação ( $p>0,05$ ), indicando que a média da SG independe da intensidade deste marcador Akt, bem como, da utilização ou não do Glivec® conforme apresentado na tabela 8.

Nos resultados para o marcador VEGFR, a diferença significativa apontou que tanto no grupo de pacientes que utilizou o Imatinib quanto para o grupo que não fez uso desta medicação, a média da SG no grupo com intensidade nula/negativo mostrou-se significativamente mais elevada, quando comparado as demais classificações ( $p<0,05$ ). Ou seja, os investigados com o marcador “negativo” estão apresentando uma SG média maior, tanto para os pacientes que utilizaram o Imatinib quanto para os que não utilizaram esta medicação.

Desta forma, para o marcador VEGFR, a SG é significativamente maior no grupo com classificação nula/negativa, e este resultado independe do uso ou não do Glivec®.

Tabela 8 - Análise da SG e imunoe expressão de Akt e VEGFR conforme uso de Glivec®.

GLIVEC®	Variáveis	SG			p(value) <sup>∞</sup>
		Média	Desvio padrão	Mediana	
	<b>Akt</b>				
<b>SIM</b>	Forte	23,8	7,7	24,5	0,287
	Fraco	47,5	32,9	39,5	
	Moderado	64,8	38,1	80,0	
	Negativo	37,0	.	.	
	<b>Akt</b>				
<b>NÃO</b>	Forte	37,9	49,0	26,0	0,662
	Fraco	37,8	33,4	29,0	
	Moderado	42,3	45,8	25,5	
	<b>VEGFR</b>				
<b>SIM</b>	Forte	33,0			0,042
	Fraco	48,3	34,8	36,0	
	Moderado	34,8	23,4	27,0	
	Negativo	99,0	9,9	99,0	
	<b>VEGFR</b>				
<b>NÃO</b>	Forte	20,8	8,8	23,5	0,037
	Fraco	33,8	43,7	23,0	
	Moderado	20,8	13,2	26,5	
	Negativo – NULO	86,4	47,5	83,0	

<sup>∞</sup>: teste de Kruskal wallis – Post Hoc – Teste de Dunn, onde médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente a 5%;

## 6 DISCUSSÃO

A identificação dos tumores do estroma gastrointestinal como uma entidade única é relativamente recente. Nesta últimas duas décadas, a raridade do tumor não tornou uma tarefa fácil desvendar sua patogênese e características biológicas que possam explicar a heterogeneidade desta doença. Existe um comportamento biológico diversificado nestes tumores, os quais podem se apresentar desde tumores de baixo crescimento a neoplasias agressivas de crescimento rápido e grande capacidade de invasão para outros órgãos e até mesmo de recidiva abdominal (MACHAIRAS, 2010). Nosso estudo apresentou uma amostra de tumores bastante heterogênea a qual compreendeu casos diagnosticados desde 1999. Por este motivo, encontramos pacientes que receberam como tratamento para o GIST, além da cirurgia, a quimioterapia e radioterapia. Atualmente, se tem maior conhecimento do comportamento tumoral desta patologia de forma que não está indicada a realização de quimioterapia citotóxica e, tão pouco, radioterapia uma vez que não há resposta documentada para este neoplasia.

A amostra estudada apresentou 25% (12) de casos de pacientes que apresentaram história de segunda neoplasia, incluindo a ocorrência de tumores sincrônicos. De acordo com estudo de Orosz (2006) os GISTs podem coexistir com diferentes tipos de câncer de maneira sincrônica ou metacrônica.

Um achado aparentemente comum na fisiopatologia de quase todos (senão de todos) os casos de GIST é a ativação de vias de sinalização dependentes de tirosina-quinase, a partir de mutações com ganho de função em nos genes KIT e PDGFR-alfa. A sinalização continua promovida pela ativação destes receptores resulta na fosforilação de substratos diretamente envolvidos na sobrevivência celular, como JAK/STAT, Ras/MAPK e, especialmente, PI3K/Akt (MALEDDU, et al., 2009). PI3K/Akt constitui-se em um complexo crítico de proteínas-quinases selecionado evolutivamente em todos os tecidos humanos. A convergência de diversas vias de sinalização celular para este grupo de proteínas faz com que a sua desregulação seja um dos fenômenos mais comuns em câncer, especialmente em etapas mais avançadas da doença. Embora o presente estudo tenha demonstrado uma associação estatística entre a SLD e a imunoexpressão de Akt ( $p < 0,05$ ), ainda que com baixo poder de inferência em função do tamanho reduzido da amostra, fica clara a relação da presença do Akt e uma redução na sobrevida livre de doença.

Interessantemente, o complexo PI3k/Akt encontra-se frequentemente desregulado em tumores que conseguem criar mecanismos de resistência a tratamentos sistêmicos contra o câncer, seja por drogas convencionais, seja com terapias alvos recentemente desenvolvidas. O caso de GIST é exemplar neste sentido. O sucesso do tratamento da doença avançada com inibidores de tirosina-quinase é inegável. Neste caso, temos um caso raro de câncer completamente dependente da atividade anormal de um receptor de superfície tirosina-quinase dependente, seja kit, seja PDGFR-alfa. O problema é que mesmo que o ganho de sobrevida em pacientes com doença avançada que recebem Glivec® ou Sutent® seja tangível, a doença inevitavelmente progredirá em todos os pacientes.

Os mecanismos de resistência são comumente encontrados nos próprios receptores. A aquisição de novas mutações nos mesmos altera a estrutura terciária da molécula tornando-a quimicamente indisponível para o inibidor, que não consegue mais acoplar-se ao sítio de ligação. O clone portador desta nova mutação ganha preponderância sobre os clones originais, promovendo a resistência ao tratamento (ANTONESCU, et al., 2005). O aumento da ativação da via PI3K/Akt pode resultar de outros eventos moleculares bem documentados em diferentes tumores sólidos tratados com inibidores de receptores de tirosina-quinase, tais como: na resistência ao Trastuzumab (anticorpo anti-Her2) em câncer de mama, na resistência ao Lapatinib (inibidor de tirosina quinase intracelular de Her2) em câncer de mama ou ao Cetuximab (anticorpo anti-EGFR) em câncer colo-retal.

Mecanismos alternativos capazes de ativar a via PI3k/Akt ,que não dependam da resistência primária do receptor, podem envolver a ativação de outras vias redundantes a esta. Por exemplo, a ativação do fator de crescimento insulina-símile (Insulin-like growth factor type-1 -IGFR-1), um fator de crescimento de superfície, é um mecanismo observado com frequência, por exemplo, em resistência a agentes biológicos que bloqueiam receptores da família de fator de crescimento epitelial, utilizados para o tratamento de diversos tumores sólidos (HUBALEK, et al., 2010). A ativação da via Ras/MAPK, por meio de mutações com ganho de função também é amplamente relatada como mecanismo de resistência adquirida a inibidores de tirosina quinase em cânceres humanos (AWADA, et al., 2012)

Tão importante quanto os mecanismos descritos é a perda de função de proteínas que regulam a fosforilação de PI3K/Akt. Mutações ou deleções do gene

PTEN constituem um mecanismo de resistência a diversos agentes terapêuticos em câncer de mama colon, tireóide ou gliomas, por exemplo. A perda da função de PTEN também está associada a mau prognóstico e a casos mais avançados de câncer (GALLARDO, et al. 2012).

A participação destes mecanismos de ativação paralela de PI3K/Akt na resistência de GIST ao Glivec® ou ao Sutent® é ainda território especulativo. Os poucos dados que dispomos não buscaram responder esta questão no cenário de resistência primária ou secundária em GIST. Os dados que temos sobre ativação de Akt derivam exclusivamente de estudos de séries de pacientes ao diagnóstico. Um trabalho recente sugere que em linhagens celulares, a ativação de Akt e de proteínas a montante do mesmo na cascata de sinalização parece ser um fenômeno muito importante em células de GIST. Mas um estudo de uma série consecutiva de casos ao diagnóstico revelou que exclusivamente os tumores PDGFr-alfa dependentes, e não os tumores com mutação em kit, se utilizariam de um excesso de transdução de sinais pela via PI3K/Akt (SAPI, et al., 2011).

A expressão anormal em PTEN foi sugerida como um fator de progressão de doença em pacientes com GIST pela primeira vez em 2004 (RICCI, et al., 2004). Recentemente, a exposição prolongada de Sutent® em uma linhagem celular de GIST, levou à ativação de Akt por meio da metilação de PTEN, sugerindo que a resistência ao uso de inibidores de tirosina quinase pode ser um efeito da ativação indireta da via PI3K/Akt por meio da perda de função de PTEN (YANG, et al., 2012).

Desta forma, as evidências de que a ativação de Akt possa se relacionar à resistência de GIST aos tratamentos atuais ou ainda a doenças mais avançadas ou de pior prognóstico, são quase todas derivadas de estudos *in vitro* ou da extrapolação do que ocorre em outras neoplasias humanas. Uma avaliação de mais de 1200 *papers* contendo os descritores GIST + *Prognosis* or GIST + *Treatment* no Pubmed rendeu apenas um artigo clínico nos últimos 5 anos que abordou o efeito da ativação de Akt ( busca feita em 02 de Maio de 2012) no prognóstico ou resistência a tratamento em GIST. Este artigo utilizou-se da avaliação da expressão de PTEN como um “*surragate*” da atividade de PI3K/Akt, em conjunto com CD44 e Ki-67, na elaboração de um escore prognóstico em 104 pacientes com GIST. A presença de expressão de PTEN em mais de 50% das células (expressão em 1000 células – denominada de “*labeling index*”) analisadas revelou um subgrupo de pacientes com

90% de sobrevida global em 140 meses de acompanhamento. Apenas metade dos pacientes do subgrupo com PTEN menor que 50% de *labelling index* encontrava-se vivo após 80 meses de seguimento (LIANG, et al., 2012)

Cabe ressaltar, ainda que com baixo poder de inferência, a partir da análise dos resultados obtidos neste estudo houve uma relação direta entre a imunexpressão forte do Akt e diminuição da SLP. Tal limitação ora deve-se ao reduzido tamanho da amostra ora pela grande variabilidade no tempo de sobrevida o que acaba por reduzir o poder de decisão do teste estatístico.

VEGFR é o nome genérico de uma família de três receptores que respondem por angiogênese e linfangiogênese de acordo com o ligante ativador. Apesar do papel da desregulação da função de neoangiogênese ser bem documentado em câncer humano, os resultados de terapias que bloqueiam esta função em tumores até o momento foi desapontador. Existem diversas hipóteses que especulam porque o bloqueio promovido por agentes biológicos da expressão de receptores VEGFR ou dos ligantes VEGF seja tão modesta, mas seguramente todas passam pelo conhecimento limitado que ainda possuímos sobre o funcionamento deste sistema extremamente complexo.

Um estudo recente sobre o papel de VEGFR como fator de prognóstico em sarcomas sugere que apenas a expressão de VEGFR-3 teria relevância biológica nestes tumores mesenquimais sugerindo que o uso de agentes anti-VEGFR específicos teria maior chance de sucesso que o uso de agentes “genéricos” anti VEGFR (KILVAES, et al., 2010). Os resultados do presente trabalho indicam que a ausência da imunexpressão do VEGFR está relacionada a uma maior sobrevida global.

Estudos realizados especificamente em GIST são muito escassos. Apesar disto, estima-se que a relevância de diversos componentes da angiogênese seja mais relevante neste tipo de sarcoma que em seus similares de partes moles, como o rabdomyossarcoma, e o sarcoma de Ewing. O uso de inibidores de tirosina quinase sem efeito direto na expressão de fatores de angiogênese (Glivec®), ou com supressão direta nestes genes (Sutent®) resulta em redução sistemática da proliferação vascular e em resposta clínica objetiva (McAULIFE, et al., 2007; KIM e ZALUPSKI, 2011).

O estudo de VEGFR como fator de prognóstico em GIST é uma área pouco contemplada na literatura. Ainda que o efeito de Sutent® indique o efeito benéfico da redução na expressão de VEGFR, a expressão aumentada deste receptor ao diagnóstico assim como a sua correlação com outros fatores de prognóstico é uma área quase inexplorada nos estudos dos GISTs. No presente estudo foi possível observar que imunorreatividade nula do VEGFR está associada a um aumento na SG e esta relação se mantém ao estratificarmos os pacientes pelo uso ou não do Glivec®. Desta forma, podemos inferir que nossos resultados apontam para as potencialidades deste marcador como fator prognóstico em GIST. Ainda que, nenhum dos pacientes tenham sido tratados com um inibidor específico do VEGFR podemos inferir que se a SG está diretamente relacionada à expressão desta proteína. É extremamente tentadora a hipótese de que para os pacientes com alta imunorreatividade deste marcador ocorra um aumento no tempo de sobrevida na vigência de terapia alvo inibidora do VEGFR. Em outras palavras, um estudo prospectivo que comparasse os desfechos com o uso de Sutent® para pacientes com e sem hiper-expressão de VEGFR seria totalmente justificável a partir dos dados sugeridos pelo nosso trabalho.

Embora os GISTs sejam as neoplasias mesenquimais mais comuns do trato gastrointestinal eles representam 1% de todas as neoplasias do trato digestivo, configurando-os como uma doença rara (MACHAIRAS, 2010). Somado a isto, ainda contamos com uma heterogeneidade nas características comportamentais destes tumores. Desta forma, estudos biológicos envolvendo este tipo de neoplasia requerem um envolvimento de um número maior de pacientes. Como alternativa, estudos multicêntricos captariam um número suficiente de pacientes. Este é um cenário em que estudos multicêntricos reunindo grande número de pacientes seria, possivelmente, a única forma de responder uma série de questões sobre que terapêutica seria mais adequada para que grupo de pacientes.

O número de novas moléculas capazes de interferir na via Akt ou em mecanismos de angiogênese passa da centena. O número de protocolos clínicos envolvendo estas moléculas conta-se às dezenas no site do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos. A experiência com outras neoplasias indica que estas duas vias apresentam desregulação variável dependendo de cada paciente, muitas vezes sem que haja uma repercussão no fenótipo da doença. No presente estudo,

identificamos que a expressão de Akt e VEGFR é de fato desigual em diferentes tumores. Mais ainda, que a sua expressão parece se associar a diferenças em desfechos clínicos de pacientes com GIST.

No que se refere à imunoexpressão do Akt somente a imunoexpressão forte apresentou redução estatisticamente confirmada na SG dos pacientes. O fato de que a SLD não foi afetada pelo nível de expressão de Akt pode indicar que os casos com Akt com expressão mais baixa indicam uma variante menos agressiva (mais indolente) da doença, sem afetar a taxa de recidiva. Portanto, mesmo os pacientes tendo uma taxa livre de doença idêntica nos grupos Akt forte ou Akt fraco, indicando que este marcador não identifica bons ou maus respondedores a terapias atuais, a sobrevida geral maior observada no grupo Akt fraco sugere que estes pacientes levam um tempo mais longo para óbito. Este dado é muito interessante, apesar de exploratório, e merece ser estudado em estudos prospectivos com casuísticas maiores.

O passo seguinte seria um estudo prospectivo, em que múltiplas proteínas de vias de sinalização associadas ao Akt e VEGFR pudessem ser estudadas em pacientes que recebem terapias-alvo, na tentativa de observar associações de expressão anômala destas proteínas com respostas mais ou menos favoráveis. Acima de tudo, acreditamos que o presente estudo já estabelece bases para que protocolos clínicos possam ser desenhados com drogas alvo distintas, levando-se em conta o tipo de defeito preponderantemente encontrado.

## 7 CONCLUSÃO

A imunoexpressão das proteínas Akt, PTEN e VEGFR foram verificadas através da técnica de imunistoquímica. No entanto, somente o Akt e VEGFR foram passíveis de análise, uma vez que, todas as amostras testadas para o PTEN apresentaram imunorreatividade nula. Setenta e cinco por cento das espécimes testadas para VEGFR apresentaram imunorreatividade moderada e forte enquanto que para o Akt somente 33.3% obtiveram esta avaliação.

O perfil epidemiológico da população estudada é semelhante ao descrito na literatura.

Ao analisarmos a imunoexpressão dos marcadores para o grupo de pacientes que utilizou o Imatinib por pelo menos 3 meses, observamos que, existe relação entre a imunoexpressão nula/ausente VEGFR e aumento na SG tanto para o grupo que utilizou o Imatinib quanto para o grupo que não utilizou esta medicação. A mesma constatação não foi configurada na análise do Akt.

Foi verificada associação estatisticamente significativa, ainda que com baixo poder de inferência, entre o marcador Akt e a SLD e SLP. Desta forma, a hiperexpressão deste marcador está associada a uma menor SLD e SLP. No que se refere à SG dos pacientes, a ausência de expressão do VEGFR configurou a população estudada uma maior SG. No entanto, a imunoexpressão do marcador Akt não mostrou nenhuma relação com a SG.

## REFERÊNCIAS

AGAIMY, A. et al. Multiple sporadic gastrointestinal stromal tumours arising at different gastrointestinal sites: pattern of involvement of the muscularis propria as a clue to independent primary GISTs. **Virchows Arch**, v. 455, n. 2, p. 101-8, Aug 2009.

ANDERSSON, J. et al. The complexity of KIT gene mutations and chromosome rearrangements and their clinical correlation in gastrointestinal stromal (pacemaker cell) tumors. **Am J Pathol**, v. 160, n. 1, p. 15-22, Jan 2002.

ANTONESCU, C. R. et al. Acquired resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumor occurs through secondary gene mutation. **Clin Cancer Res**, v. 11, n. 11, p. 4182-90, Jun 1 2005.

APARICIO, T. et al. Prognostic factors after surgery of primary resectable gastrointestinal stromal tumours. **Eur J Surg Oncol**, v. 30, n. 10, p. 1098-103, Dec 2004.

AWADA, A.; BOZOVIC-SPASOJEVIC, I.; CHOW, L. New therapies in HER2-positive breast cancer: A major step towards a cure of the disease? **Cancer Treat Rev**, p. Feb 2 2012.

BADALAMENTI, G. et al. Gastrointestinal stromal tumors (GISTs): focus on histopathological diagnosis and biomolecular features. **Ann Oncol**, v. 18 Suppl 6, p. vi136-40, Jun 2007.

BLANKE, C. D. et al. Phase III randomized, intergroup trial assessing imatinib mesylate at two dose levels in patients with unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors expressing the kit receptor tyrosine kinase: S0033. **J Clin Oncol**, v. 26, n. 4, p. 626-32, Feb 1 2008.

BLUME-JENSEN, P. et al. Activation of the human c-kit product by ligand-induced dimerization mediates circular actin reorganization and chemotaxis. **EMBO J**, v. 10, n. 13, p. 4121-8, Dec 1991.

BUSSOLINO, F.; MANTOVANI, A.; PERSICO, G. Molecular mechanisms of blood vessel formation. **Trends Biochem Sci**, v. 22, n. 7, p. 251-6, Jul 1997.

CALLEGARI-JACQUES, S. M. **Bioestatística: princípios e aplicações**. Porto Alegre: Artmed, 2003.

CANTLEY, L. C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. **Science**, v. 296, n. 5573, p. 1655-7, May 31 2002.

CHENG, J. Q. et al. AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 19, p. 9267-71, Oct 1 1992.

CORLESS, C. L.; BARNETT, C. M.; HEINRICH, M. C. Gastrointestinal stromal tumours: origin and molecular oncology. **Nat Rev Cancer**, v. 11, n. 12, p. 865-78, Dec 2011.

CORLESS, C. L.; FLETCHER, J. A.; HEINRICH, M. C. Biology of gastrointestinal stromal tumors. **J Clin Oncol**, v. 22, n. 18, p. 3813-25, Sep 15 2004.

CORLESS, C. L.; HEINRICH, M. C. Molecular pathobiology of gastrointestinal stromal sarcomas. **Annu Rev Pathol**, v. 3, p. 557-86, 2008.

DE SILVA, C. M.; REID, R. Gastrointestinal stromal tumors (GIST): C-kit mutations, CD117 expression, differential diagnosis and targeted cancer therapy with Imatinib. **Pathol Oncol Res**, v. 9, n. 1, p. 13-9, 2003.

DEMATTEO, R. P. et al. Two hundred gastrointestinal stromal tumors: recurrence patterns and prognostic factors for survival. **Ann Surg**, v. 231, n. 1, p. 51-8, Jan 2000.

DESHAIES, I. et al. Gastrointestinal stromal tumor (GIST) recurrence following surgery: review of the clinical utility of imatinib treatment. **Ther Clin Risk Manag**, v. 6, p. 453-8, 2010.

ELLIOTT, D. D.; FANNING, C. V.; CARAWAY, N. P. The utility of fine-needle aspiration in the diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: a cytomorphologic and immunohistochemical analysis with emphasis on malignant tumors. **Cancer**, v. 108, n. 1, p. 49-55, Feb 25 2006.

ELLIS, L. M.; HICKLIN, D. J. Pathways mediating resistance to vascular endothelial growth factor-targeted therapy. **Clin Cancer Res**, v. 14, n. 20, p. 6371-5, Oct 15 2008.

FLETCHER, C. D. et al. Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: a consensus approach. **Int J Surg Pathol**, v. 10, n. 2, p. 81-9, Apr 2002.

FOX SB, GATTER KC, HARRIS AL. Tumour angiogenesis. **J Pathol**, 179, p. 232-37, 1996.

GALLARDO, A. et al. Increased signalling of EGFR and IGF1R, and deregulation of PTEN/PI3K/Akt pathway are related with trastuzumab resistance in HER2 breast carcinomas. **Br J Cancer**, v. 106, n. 8, p. 1367-73, Apr 10 2012.

GASPAROTTO, D. et al. Multiple primary sporadic gastrointestinal stromal tumors in the adult: an underestimated entity. **Clin Cancer Res**, v. 14, n. 18, p. 5715-21, Sep 15 2008.

**Gastrointestinal stromal tumors.** New York: Springer, 2010. ISBN 9788847018686.

GOLD, J. S. et al. Development and validation of a prognostic nomogram for recurrence-free survival after complete surgical resection of localised primary gastrointestinal stromal tumour: a retrospective analysis. **Lancet Oncol**, v. 10, n. 11, p. 1045-52, Nov 2009.

GU, J. et al. Shc and FAK differentially regulate cell motility and directionality modulated by PTEN. **J Cell Biol**, v. 146, n. 2, p. 389-403, Jul 26 1999.

HEINRICH, M. C. et al. PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. **Science**, v. 299, n. 5607, p. 708-10, Jan 31 2003.

HIROTA, S. et al. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. **Science**, v. 279, n. 5350, p. 577-80, Jan 23 1998.

HUANG, H. Y. et al. A modification of NIH consensus criteria to better distinguish the highly lethal subset of primary localized gastrointestinal stromal tumors: a subdivision of the original high-risk group on the basis of outcome. **Surgery**, v. 141, n. 6, p. 748-56, Jun 2007.

HUBALEK, M. et al. Resistance to HER2-targeted therapy: mechanisms of trastuzumab resistance and possible strategies to overcome unresponsiveness to treatment. **Wien Med Wochenschr**, v. 160, n. 19-20, p. 506-12, Nov 2010.

HUIZINGA, J. D. et al. W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. **Nature**, v. 373, n. 6512, p. 347-9, Jan 26 1995.

IMAMURA, M. et al. Prognostic significance of angiogenesis in gastrointestinal stromal tumor. **Mod Pathol**, v. 20, n. 5, p. 529-37, May 2007.

JIANG, B. H.; LIU, L. Z. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. **Adv Cancer Res**, v. 102, p. 19-65, 2009.

JOENSUU, H. et al. One vs three years of adjuvant imatinib for operable gastrointestinal stromal tumor: a randomized trial. **JAMA**, v. 307, n. 12, p. 1265-72, Mar 28 2012.

KILVAER, T. K. et al. Profiling of VEGFs and VEGFRs as prognostic factors in soft tissue sarcoma: VEGFR-3 is an independent predictor of poor prognosis. **PLoS One**, v. 5, n. 12, p. e15368, 2010.

KIM, E. J; ZALUPSKI M.N. Systemic therapy for advanced gastrointestinal stromal tumors: beyond imatinib. **J Surg Oncol**, v. 8, n.104, p. 901-6, 2011.

KLEIHUES, P.; CAVENEE, W. K.; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Pathology and genetics of tumours of the nervous system**. Lyon: IARC Press, 2000. 314 p. ISBN 9283224094.

LIANG, Y. M. et al. Prognostic significance of PTEN, Ki-67 and CD44s expression patterns in gastrointestinal stromal tumors. **World J Gastroenterol**, v. 18, n. 14, p. 1664-71, Apr 14 2012.

LIEGL-ATZWANGER, B.; FLETCHER, J. A.; FLETCHER, C. D. Gastrointestinal stromal tumors. **Virchows Arch**, v. 456, n. 2, p. 111-27, Feb 2010.

LOPES, J. M.; GOUVEIA, A.; PIMENTA, A. O papel da anatomia patológica no diagnóstico e prognóstico dos GISTs. **Revista Portuguesa de Cirurgia** v. 1, p. 35-39, 2007.

MACHAIRAS, A.; KARAMITOPOULOU, E.; TSAPRALIS, D.; KARATZAS, T.; MACHAIRAS, N.; MISIAKOS, EP. Gastrointestinal stromal tumors (GISTs): na update experience. **Dig Dis Sci**, v.12, n.55, p.3315-27, Dec-2010.

MACHEIN, M. R.; PLATE, K. H. VEGF in brain tumors. **J Neurooncol**, v. 50, n. 1-2, p. 109-20, Oct-Nov 2000.

MAEDA, H. et al. Requirement of c-kit for development of intestinal pacemaker system. **Development**, v. 116, n. 2, p. 369-75, Oct 1992.

MAJUMDER, S. et al. c-kit protein, a transmembrane kinase: identification in tissues and characterization. **Mol Cell Biol**, v. 8, n. 11, p. 4896-903, Nov 1988.

MALEDDU, A. et al. Mechanisms of secondary resistance to tyrosine kinase inhibitors in gastrointestinal stromal tumours (Review). **Oncol Rep**, v. 21, n. 6, p. 1359-66, Jun 2009.

MARTINELLI, S. et al. Targeting survivin via PI3K but not c-akt/PKB by anticancer drugs in immature neutrophils. **Oncogene**, v. 25, n. 52, p. 6915-23, Nov 2 2006.

MAZUR, M. T.; CLARK, H. B. Gastric stromal tumors. Reappraisal of histogenesis. **Am J Surg Pathol**, v. 7, n. 6, p. 507-19, Sep 1983.

MCAULIFFE, J. C. et al. Association of intratumoral vascular endothelial growth factor expression and clinical outcome for patients with gastrointestinal stromal tumors treated with imatinib mesylate. **Clin Cancer Res**, v. 13, n. 22 Pt 1, p. 6727-34, Nov 15 2007.

MCGRATH, P. C. et al. Gastrointestinal sarcomas. Analysis of prognostic factors. **Ann Surg**, v. 206, n. 6, p. 706-10, Dec 1987.

MEDEIROS, F. et al. KIT-negative gastrointestinal stromal tumors: proof of concept and therapeutic implications. **Am J Surg Pathol**, v. 28, n. 7, p. 889-94, Jul 2004.

MIETTINEN, M.; LASOTA, J. Gastrointestinal stromal tumors--definition, clinical, histological, immunohistochemical, and molecular genetic features and differential diagnosis. **Virchows Arch**, v. 438, n. 1, p. 1-12, Jan 2001.

\_\_\_\_\_. Gastrointestinal stromal tumors: pathology and prognosis at different sites. **Semin Diagn Pathol**, v. 23, n. 2, p. 70-83, May 2006.

MIETTINEN, M.; LASOTA, J.; SOBIN, L. H. 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**, v. 29, n. 10, p. 1373-81, Oct 2005.

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**, v. 30, n. 4, p. 477-89, Apr 2006.

MIETTINEN, M.; VIROLAINEN, M.; MAARIT SARLOMO, R. Gastrointestinal stromal tumors--value of CD34 antigen in their identification and separation from true leiomyomas and schwannomas. **Am J Surg Pathol**, v. 19, n. 2, p. 207-16, Feb 1995.

MUCCIARINI, C. et al. Incidence and clinicopathologic features of gastrointestinal stromal tumors. A population-based study. **BMC Cancer**, v. 7, p. 230, 2007.

NG, E. H. et al. Prognostic factors influencing survival in gastrointestinal leiomyosarcomas. Implications for surgical management and staging. **Ann Surg**, v. 215, n. 1, p. 68-77, Jan 1992.

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**, v. 103, n. 4, p. 821-9, Feb 15 2005.

OKUMURA, N. et al. PI3K/AKT/PTEN Signaling as a Molecular Target in Leukemia Angiogenesis. **Adv Hematol**, v. 20, n.12, p. 8430-85, 2012.

Orosz Z, Balázs D, Sápi Z, Tiszlavicz L, Tornóczy T. Reclassification of gastrointestinal mesenchymal tumors. **Magy Onkol**, v.4, n.50, 287-92, Jan 2006.

REITH, J. D. et al. Extragastrointestinal (soft tissue) stromal tumors: an analysis of 48 cases with emphasis on histologic predictors of outcome. **Mod Pathol**, v. 13, n. 5, p. 577-85, May 2000.

RICCI, R. et al. Role of PTEN in gastrointestinal stromal tumor progression. **Arch Pathol Lab Med**, v. 128, n. 4, p. 421-5, Apr 2004.

RUBIN, B. P. et al. KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors. **Cancer Res**, v. 61, n. 22, p. 8118-21, Nov 15 2001.

SANSAL, I.; SELLERS, W. R. The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. **J Clin Oncol**, v. 22, n. 14, p. 2954-63, Jul 15 2004.

SAPI, Z. et al. The activated targets of mTOR signaling pathway are characteristic for PDGFRA mutant and wild-type rather than KIT mutant GISTs. **Diagn Mol Pathol**, v. 20, n. 1, p. 22-33, Mar 2011.

SARLOMO-RIKALA, M. et al. CD117: a sensitive marker for gastrointestinal stromal tumors that is more specific than CD34. **Mod Pathol**, v. 11, n. 8, p. 728-34, Aug 1998.

SNYDER, M. A. et al. A mutation at the ATP-binding site of pp60v-src abolishes kinase activity, transformation, and tumorigenicity. **Mol Cell Biol**, v. 5, n. 7, p. 1772-9, Jul 1985.

STEIGEN, S. E.; EIDE, T. J. Trends in incidence and survival of mesenchymal neoplasm of the digestive tract within a defined population of northern Norway. **APMIS**, v. 114, n. 3, p. 192-200, Mar 2006.

STEIN, R. C. Prospects for phosphoinositide 3-kinase inhibition as a cancer treatment. **Endocr Relat Cancer**, v. 8, n. 3, p. 237-48, Sep 2001.

STEIN, R. C.; WATERFIELD, M. D. PI3-kinase inhibition: a target for drug development? **Mol Med Today**, v. 6, n. 9, p. 347-57, Sep 2000.

STEPHAN, C. C.; BROCK, T. A. Vascular endothelial growth factor, a multifunctional polypeptide. **P R Health Sci J**, v. 15, n. 3, p. 169-78, Sep 1996.

TAMURA, M. et al. Tumor suppressor PTEN inhibition of cell invasion, migration, and growth: differential involvement of focal adhesion kinase and p130Cas. **Cancer Res**, v. 59, n. 2, p. 442-9, Jan 15 1999.

TAPON, N.; MOBERG, K. H.; HARIHARAN, I. K. The coupling of cell growth to the cell cycle. **Curr Opin Cell Biol**, v. 13, n. 6, p. 731-7, Dec 2001.

TORIHASHI, S. et al. c-kit-dependent development of interstitial cells and electrical activity in the murine gastrointestinal tract. **Cell Tissue Res**, v. 280, n. 1, p. 97-111, Apr 1995.

VAN DER ZWAN, S. M.; DEMATTEO, R. P. Gastrointestinal stromal tumor: 5 years later. **Cancer**, v. 104, n. 9, p. 1781-8, Nov 1 2005.

VERWEIJ, J. et al. Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumours with high-dose imatinib: randomised trial. **Lancet**, v. 364, n. 9440, p. 1127-34, Sep 25-Oct 1 2004.

VIVANCO, I.; SAWYERS, C. L. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 7, p. 489-501, Jul 2002.

WANG, Y. Z.; BONNER, J. C. Mechanism of extracellular signal-regulated kinase (ERK)-1 and ERK-2 activation by vanadium pentoxide in rat pulmonary myofibroblasts. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 22, n. 5, p. 590-6, May 2000.

WEISS, S. W.; GOLDBLUM, J. R.; ENZINGER, F. M. **Enzinger and Weiss's soft tissue tumors**. 4th. St. Louis: Mosby, 2001. xiv, 1622 p. ISBN 0323012000.

WIECZOREK, T. J. et al. Cytologic diagnosis of gastrointestinal stromal tumor with emphasis on the differential diagnosis with leiomyosarcoma. **Cancer**, v. 93, n. 4, p. 276-87, Aug 25 2001.

YANG, J. et al. Long-term exposure of gastrointestinal stromal tumor cells to sunitinib induces epigenetic silencing of the PTEN gene. **Int J Cancer**, v. 130, n. 4, p. 959-66, Feb 15 2012.

## **ANEXOS**



## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A limitada eficácia das formas atuais de tratamento para os tumores do trato gastrointestinal (GIST), conduzem à avaliação de novos estudos para o tratamento desta doença. Atualmente, dispomos somente de tratamento cirúrgico e para aqueles pacientes com doença muito avançada utiliza-se o tratamento com uma medicação oral. Algumas alterações identificadas em determinados tumores podem determinar a diferença entre uma célula normal e uma célula maligna e até mesmo auxiliar a identificar qual a resposta da célula tumoral ao receber determinado tratamento. A compreensão deste mecanismo poderá nos levar ao desenvolvimento de tratamentos mais eficazes para este tipo de doença.

Em virtude disso, estamos realizando um estudo onde analisaremos as alterações de algumas moléculas (PI3K/AKT/m-TOR, survivina e de VEGFR) que poderão auxiliar na escolha de um tratamento mais eficaz bem como, na descoberta de novas drogas. Você está sendo convidado(a) para participar do estudo: "Avaliação imuno-histoquímica da expressão de proteínas das vias sinalizadoras mtor/VEGFR e akt/PI3K em tumores estromais do trato gastrointestinal (GIST)". Neste estudo serão pesquisadas algumas moléculas no tumor removido durante o procedimento para o diagnóstico da sua doença ou do tratamento cirúrgico que você realizou. Para realizar esta análise, utilizaremos uma pequena parte do bloco de parafina contendo o tecido tumoral retirado durante o procedimento cirúrgico. Além desta amostra de tecido tumoral, serão coletados dados do seu prontuário (registros hospitalares) para que possamos analisar e correlacionar os achados laboratoriais da pesquisa das moléculas no tecido tumoral com os eventos que ocorreram com você durante todo o período do seu tratamento. Ao participar desta pesquisa você não terá prejuízo ou risco uma vez que não será realizado nenhum tipo de procedimento ou exame. Além disto, este estudo não lhe proporcionará benefício imediato, entretanto, poderá ajudar em estudos futuros para a busca de melhores e novas formas de tratamentos para os pacientes com tumores do trato gastrointestinal.

Fica assegurado a você o direito de não participar ou de retirar-se desta pesquisa a qualquer momento, sem que isso represente prejuízo ao seu

Comitê de Ética em Pesquisa  
CEP - PUCRS



atendimento médico hospitalar. Também asseguramos total sigilo das informações obtidas.

Estou ciente de que caso eu tenha dúvidas relacionadas ao estudo, poderei entrar em contato com os pesquisadores responsáveis por este estudo: Dr. Bernardo Garicochea pelo telefone (51) 33203319 e/ou com Enfª Gisele Pereira de Carvalho pelo telefone (51) 92676436. Para qualquer pergunta sobre meus direitos como participante deste estudo ou se penso que fui prejudicado pela minha participação, posso ligar para Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São Lucas da PUCRS no telefone: 51. 33203345.

Eu, ..... abaixo assinado declaro ter pleno conhecimento:

- do objetivo desta pesquisa;
- da utilização do bloco de parafina contendo amostra de tecido tumoral, o qual foi coletado na ocasião do diagnóstico ou do tratamento cirúrgico;
- que receberei respostas ou esclarecimentos a qualquer dúvida a cerca dos riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa e meu tratamento individual;
- da liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isso traga prejuízo à continuação do meu tratamento;
- que autorizo a utilização dos dados obtidos para pesquisa sem que eu seja identificado;
- que este termo é assinado em duas vias, ficando comigo uma das vias e outra para o pesquisador responsável.

De acordo,

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente

\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável pela aplicação do TCLE

\_\_\_\_\_  
Data

Comitê de Ética em Pesquisa  
CEP - PUCRS

*Ata*



OF.CEP-024/09

Porto Alegre, 09 de janeiro de 2009.

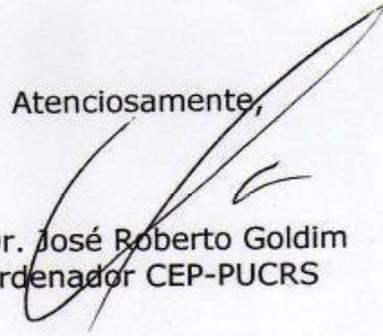
Senhor Pesquisador,

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 08/04418 intitulado: **"Análise imuno-histoquímica da expressão de proteínas das vias sinalizadoras mTOR/VEGFR e Akt/PI3K em tumores estromais do trato gastrointestinal (GIST)"**.

Salientamos que seu estudo pode ser iniciado a partir desta data.

Os relatórios parciais e final deverão ser encaminhados a este CEP.

Atenciosamente,

  
Prof. Dr. José Roberto Goldim  
Coordenador CEP-PUCRS

Ilmo. Sr.  
Dr. Bernardo Garicochea  
HSL  
N/Universidade

**PUCRS**

**Campus Central**

Av. Ipiranga, 6690 - 3º andar - CEP: 90610-000

Sala 314 - Fone Fax: (51) 3320-3345

E-mail: [cep@pucrs.br](mailto:cep@pucrs.br)

[www.pucrs.br/prppg/cep](http://www.pucrs.br/prppg/cep)

**De:** RSP <[rspline@fsp.usp.br](mailto:rspline@fsp.usp.br)>

**Data:** 16 de maio de 2012 13:04:41 BRT

**Para:** Gisele Carvalho <[gpcarvalho@terra.com.br](mailto:gpcarvalho@terra.com.br)>

**Assunto:** RSP - Confirmação do recebimento de artigo

Prezado(a) Senhor(a) Gisele Carvalho,

Acusamos o recebimento do artigo “Expressão de Akt e VEGFR como marcadores prognósticos ao diagnóstico e preditivos de resposta ao uso de Mesilato de Imatinib em tumores estromais do trato gastrointestinal (GISTs).”, enviado para análise na Revista de Saúde Pública, com vista a possível publicação. O artigo está registrado sob o protocolo nº 4358.

Para acompanhar o processo de avaliação, acesse o endereço [www.rsp.fsp.usp.br](http://www.rsp.fsp.usp.br)

Atenciosamente,

Secretaria RSP



- Informações Gerais
- Edição Atual
- Busca
- Política Editorial
- Instruções aos Autores
- Corpo Editorial
- Assinatura
- Sites Correlatos
- Fale Conosco
- Submissão de Artigos
- Sair



**Consulta Artigos Enviados**

Utilize esta tela para consultar os artigos enviados.

Em Avaliação:	Status
4358 - Expressão de Akt e VEGFR como marcadores pr...	Em avaliação na pré-análise

- Ver
- Reformulação
- Alterar
- Avaliações/Comentários

[Logout](#)

[:: voltar ::](#)



**Título:** Expressão de Akt e VEGFR como marcadores prognósticos ao diagnóstico e preditivos de resposta ao uso de Mesilato de Imatinib em tumores estromais do trato gastrointestinal (GISTs).

**Autores:** Gisele Pereira de Carvalho<sup>1</sup>, Rosângela Vieira de Andrade<sup>2</sup>,Sheila Shuch Ferreira<sup>3</sup>, Marcelo Toneto<sup>3</sup>, Renata Coudry <sup>4</sup> e Bernardo Garicochea<sup>5</sup>

**Introdução:** Os tumores estromais do trato gastrointestinal (GISTs – Gastrointestinal Stromal Tumors) são neoplasias provenientes de células marca-passo mesenquimais (células de Cajal) originalmente encontradas no trato gastrointestinal (TGI) , mas que podem ocorrer em outras áreas como no retroperitônio, mesentério e omento.<sup>12,16,23</sup> Embora representem as neoplasias mesenquimais mais comuns, são considerados raros por corresponderem de 1 a 3% de todas as neoplasias do TGI.<sup>9,14</sup> A incidência anual de GIST é de aproximadamente 10 casos por um milhão de habitantes conforme estudos populacionais.<sup>13,15,19</sup> Em recente estudo estima-se que este número possa chegar em 15 casos por milhão de habitantes por ano.<sup>4</sup> A exata incidência de GIST é difícil de determinar, uma vez que, estes tumores foram reconhecidos apenas recentemente como entidade patológica distinta. No Brasil, especificamente, a falta de dados epidemiológicos dos tumores estromais pode estar relacionada às sub-notificações, bem como a falta de bancos de dados epidemiológicos que se proponham a captar casos, não somente de pacientes tratados e acompanhados na própria Instituição, como também em centros vizinhos visto que a incidência desta neoplasia é pouco freqüente. Estes tumores têm características bastante heterogêneas, podendo surgir juntamente com outras neoplasias (tumores sincrônicos), acometem geralmente indivíduos entre de 55 a 65 anos de idade.<sup>22</sup> Ocorrem em qualquer parte do TGI

1.Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

2.Universidade Católica de Brasília,

3. Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

4. Instituto do Câncer do Estado de São Paulo e Hospital Sírio Libanês – São Paulo

5. Hospital Sírio Libanês – São Paulo

sendo mais freqüentes no estômago e intestino delgado podendo também ocorrer fora do TGI.<sup>10,11,1</sup>

A imunistoquímica tem um papel importante no diagnóstico diferencial dos GISTs no sentido de diferenciá-los de outras neoplasias que também ocorrem no TGI como: leiomioma, leiomiossarcoma, tumor desmóide intra-abdominal, schwannoma e neurofibroma. Do ponto de vista molecular, o funcionamento e desenvolvimento normal das células intestinais do Cajal dependem do receptor Kit.<sup>2,6,21</sup> Desta forma, os GISTs se caracterizam por geralmente apresentarem expressão aberrante de dois marcadores associados às células mesenquimais primitivas, CD34 e c-Kit (ou CD117).<sup>12,18</sup> Assim como em outras neoplasias malignas humanas, muitos outros eventos moleculares que envolvem a sinalização e vias de sobrevivência celular estão afetados em GIST e podem explicar a heterogeneidade da doença. Especialmente uma questão central no tratamento de formas avançadas da doença, que refere-se a resposta variável e temporária a agentes-alvos.

A ativação aberrante de vias de sinalização e de sobrevivência celular, seja pela aquisição de mutações em genes centrais nestes eventos, seja pela amplificação da expressão dos mesmos, vem sendo alvo de intensa investigação nas neoplasias humanas. A via de sinalização PI3K-AKT/PTEN encontra-se freqüentemente afetada em tumores humanos, e vem sendo alvo de investigação de uma nova geração de drogas alvo capaz de conter sua sinalização descontrolada. Esta via sinaliza diretamente proteínas que intermediam entre diversas funções, a proliferação celular, apoptose e regulação da produção de novos vasos (angiogênese). A sinalização PI3K/Akt regula a angiogênese através alteração da expressão de VEGF. Esta proteína é um mitógeno, potente fator angiogênico, que regula a proliferação endotelial celular e a permeabilidade vascular.<sup>20</sup> A expressão de VEGF pela célula tumoral estimula a expressão aumentada de uma família de receptores denominadas coletivamente de VEGFR, na superfície das células endoteliais, o que resultará em estímulo para a formação de novos vasos.

Pacientes que fazem uso de Mesilato de Imatinib (Glivec) para o tratamento de GIST em estado avançado, inevitavelmente apresentarão progressão da doença, apesar do ganho em sobrevida global conferido pela

droga. Os mecanismos mais estudados de resistência inicial ou adquirida ao Glivec consistem na emergência de clones com mutações em domínios de ligação da proteína Kit com a droga. Pouco se conhece sobre a emergência de clones com hiperexpressão na via AKT dependente ou com aumento na expressão de VEGF (medido, por exemplo, pela expressão de VEGFR). No presente trabalho procuramos observar se a expressão aumentada destas proteínas se relacionava com doença mais avançada e com prognóstico pior dentro de um mesmo estadiamento. Além disso, analisamos um grupo de pacientes que recebeu Glivec para doença avançada por mais de três meses para verificar se a expressão aumentada de Akt ou VEGFR poderia sinalizar uma resposta menos duradoura ao tratamento.

**Metodologia:** Trata-se de um estudo retrospectivo e transversal realizado no Serviço de Oncologia do Hospital São Lucas da PUCRS (HSL-PUCRS). A amostra foi constituída, por conveniência, de pacientes que apresentaram diagnóstico de GIST (confirmados e revisados pelo Serviço de Patologia desta Instituição) no período de 1999 e 2011. A população estudada incluiu pacientes que utilizaram o Imatinib por pelo menos três meses como tratamento para doença avançada e pacientes que foram submetidos somente ao tratamento cirúrgico com intuito curativo ou biópsia. Além destes critérios de inclusão também foram considerados a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), bem como, amostra de tecido tumoral viável para análise imunoistoquímica. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa local em janeiro de 2009 conforme ofício nº 024/09 baseando-se na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde. As variáveis em estudo incluíram: imunoexpressão dos marcadores VEGFR e Akt e os dados clínicos, dentre os quais podemos citar: gênero, idade, data do diagnóstico, tipo de tratamento, informações do exame anatomopatológico oriundos de biópsia ou cirurgia e imunoistoquímica, sinais e sintomas ao diagnóstico, tratamento recebido, etc. Estas informações foram coletadas de documentos fonte (prontuário hospitalar) e utilizados para caracterização do perfil epidemiológico da população. O tempo de acompanhamento destes pacientes variou de 1 a 160 meses, considerando a data do diagnóstico e o

desfecho clínico (óbito, sobrevida ou perda de acompanhamento) até a data do último contato realizada em 03 de maio de 2012. Todas as espécimes tumorais foram coletadas previamente ao tratamento sistêmico. A variável principal do estudo (expressão de VEGFR e Akt) foi analisada através da expressão imunistoquímica em blocos de parafina armazenados no Laboratório de Anatomia Patológica do HSL-PUCRS. A imunexpressão das proteínas VEGFR e Akt foram definidas conforme sua intensidade, sendo estas: ausente, fraca, moderada e forte. Os anticorpos primários utilizados foram: anti-Akt (clone Ser473, Cell Signaling Technology) e anti-VEGFR2 (clone MM0003-7G63 Cell Signaling Technology). A análise estatística dos dados teve como abordagem inicial uma etapa descritiva com a distribuição de frequências simples e relativa, bem como, média, desvio padrão e amplitude para a idade, onde o estudo da distribuição ocorreu pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para a comparação das variáveis categóricas entre os dois grupos envolveu o teste Exato de Fisher e, nas comparações entre variáveis contínuas foram utilizados: teste t-Student, Mann Whitney e Kruskal Wallis. Para a análise de sobrevida, foi utilizado o método de Kaplan-Meier e a comparação entre as curvas de sobrevida acumulada pelo teste log-rank. Os dados receberam tratamento estatístico através do software SPSS 17.0 (SPSS, 2008) onde, para critérios de decisão foi adotado o nível de significância ( $\alpha$ ) de 5%.

**Resultados:** Dos 78 casos de GIST atendidos no período de 1999 a 2011, somente 48 preencheram os critérios de inclusão, conforme descrito acima. Os dados epidemiológicos e anatomopatológicos dos pacientes incluídos no estudo estão descritos na tabela a seguir:

Tabela 1 - Características epidemiológicas e anatomopatológicas da população estudada (n=48)

Variáveis	Categoria	Total (%)
Idade	< 60 anos	22 (46%)
	≥ 60 anos	26 (54%)
Gênero	Masculino	15 (31%)
	Feminino	33 (69%)
Topografia	Gástrico	18 (37,5%)
	Intestino Delgado	14 (29,1%)
	Intestino Grosso	06 (12,5%)
	Reto	02 (4,2%)
	Extra-TGI	06 (12,5%)
	Esôfago	02 (4,2%)
Estadios	IA e IB	16 (33%)
	II	08 (17%)
	IIIA e IIIB	04 (8%)
	IV	20 (42%)
Procedimento Cirúrgico	Biópsia	4 (8,3%)
	Cirurgia	44 (91,7%)
Comprometimento de margens cirúrgicas	Comprometida	8 (18%)
	Livres	36 (82%)
Ressecção Linfonodal (n=9)	Linfonodos positivos	7 (78%)
	Linfonodos negativos	2 (22%)

No que se refere à sobrevida global (SG), pacientes com doença primária e metastática, ao final de aproximadamente 160 meses de seguimento, 35,4% (n=17) dos investigados vieram a óbito, com uma probabilidade de sobrevida de 64,6% e estimativa de tempo mediano de 91,6 (IQR25-75% 34,5 a 148,7) meses.

## **Análise de SG, estadios e expressão de Akt e VEGFR**

Avaliando a relação entre a SG e as classificações Akt e VEGFR estratificadas pelos estadios, observamos que existe relação estatística significativa ( $p < 0,05$ ) nos casos de doença primária (descritas na tabela como “estadios outros”) para aqueles pacientes que não apresentam imunexpressão de VEGFR. Ou seja, a ausência de VEGFR está relacionada a um aumento na SG em pacientes com doença primária. O mesmo não foi verificado na análise do marcador Akt. A tabela 2 descreve média, desvio padrão e mediana da SG, para as classificações Akt e VEGFR, segundo os estadios.

Tabela 2 Média, desvio padrão e mediana da SG, para as classificações AKT e VEGFR, segundo os estadios.

Estadios	Variáveis	SG			p(value) <sup>F</sup>
		Média	Desvio padrão	Mediana	
	<b>AKT</b>				
Outros	Forte	38,9	45,1	26,3	0,791
	Fraco	59,6	45,1	59,5	
	Moderado	55,4	43,0	55,4	
	Negativo	36,8	---	---	
	<b>AKT</b>				
IV	Forte	15,7	15,6	13,7	0,590
	Fraco	36,5	28,7	36,0	
	Moderado	38,1	40,0	24,1	
	<b>VEGFR</b>				
Outros	Forte	25,3 <sup>c</sup>	3,2	25,4	0,046
	Fraco	42,9 <sup>b</sup>	43,9	34,8	
	Moderado	32,6 <sup>b</sup>	19,1	26,8	
	Negativo	89,7 <sup>a</sup>	43,4	87,4	
	<b>VEGFR</b>				
IV	Forte	21,7	12,3	24,1	0,173
	Fraco	37,3	34,2	34,1	
	Moderado	14,4	14,0	13,7	
	Negativo	91,6	---	---	

§: teste de Kruskal wallis – Post Hoc – Teste de Dunn, onde médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente a 5%;

## **Análise da SLD e expressão de Akt e VEGFR**

Avaliando a relação dos marcadores Akt e VEGFR em comparação com a SLD, para todos pacientes com doença primaria, foi detectada associação estatística significativa entre SLD e AKT ( $p < 0,05$ ), no entanto foi uma

associação com baixo poder de inferência em função do reduzido tamanho de amostra diminuindo o poder estatístico do teste. Desta forma devemos acreditar que, para esta amostra, a associação significativa não se configurou, cabendo aos resultados apresentados uma abordagem descritiva.

### **Análise de SLP, estadio IV e expressão de Akt e VEGFR**

Levando em consideração o grupo com estadio IV, a SLP foi comparada entre as classificações do marcador AKT, o Teste de Kruskal Wallys detectou diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ), indicando que, a SLP média para o AKT forte ( $16,6 \pm 15,5$ ) mostrou-se significativamente menor que as médias observadas nas classificações fraco ( $37,0 \pm 29,0$ ;  $p < 0,05$ ) e moderado ( $38,3 \pm 40,1$ ;  $p < 0,05$ ). Quando a comparação da SLP ocorreu entre as imunorexpressões de VEGFR as diferenças observadas não se configuraram em função do reduzido tamanho de amostra em cada classificação. No entanto, considerando as SLP médias observamos uma tendência de comportamento semelhante, de forma que, quanto maior o grau do marcador, menor a média de SLP. Tabela 3 descreve média, desvio padrão e mediana para a SLP segundo Akt e VEGFR para o grupo em estadio IV.

Tabela 3 - Média, desvio padrão e mediana para a SLP segundo AKT e VEGFR para o grupo em estadio IV.

Variáveis	SLP			p(value)
	Média	Desvio padrão	Mediana	
<b>AKT</b>				
Fraco (n=9)	37,0a	29,0	36,0	0,042
Moderado (n=8)	38,3 <sup>a</sup>	40,1	24,0	
Forte (n=3)	16,6b	15,5	14,0	
<b>VEGFR</b>				
Negativo (n=2)	92,0	---	---	0,175
Fraco (n=11)	37,3	34,4	34,0	
Moderado (n=3)	16,7	14,0	14,0	
Forte (n=4)	21,7	12,6	24,0	

§: teste de Kruskal wallys – Post Hoc – Teste de Dunn, onde médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente a 5%;

## **Utilização do Imatinib e expressão de Akt e VEGFR**

Dos 48 pacientes incluídos no estudo somente 29,2%(17) receberam Mesilato de Imatinib, por um período médio de 14 meses, com o mínimo de 8 meses e o máximo de 96 meses. A referida medicação foi iniciada no cenário metastático.

Quando a SG foi comparada entre as imunoexpressões de AKT na amostra estratificada pelo Imatinib, não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas tanto no grupo que recebeu Imatinib quanto no grupo que não recebeu esta medicação ( $p>0,05$ ), indicando que a média da SG independe da intensidade deste marcador Akt, bem como, da utilização ou não do Imatinib conforme apresentado na tabela 8.

Nos resultados para o marcador VEGFR, a diferença significativa apontou que tanto no grupo de pacientes que utilizou o Imatinib quanto para o grupo que não fez uso desta medicação, a média da SG no grupo com intensidade nula/negativo mostrou-se significativamente mais elevada, quando comparado as demais classificações ( $p<0,05$ ). Ou seja, os investigados com o marcador “negativo” estão apresentando uma SG média maior, tanto para os pacientes que utilizaram o Imatinib quanto para os que não utilizaram esta medicação. Tabela 4 descreve média, desvio padrão e mediana para a SG, classificações Akt e VEGFR, segundo Glivec.

Tabela 4 - Média, desvio padrão e mediana para a SG, para as classificações AKT e VEGFR, segundo Glivec

GLIVEC	Variáveis	SG			p(value) <sup>F</sup>
		Média	Desvio padrão	Mediana	
	<b>AKT</b>				
<b>SIM</b>	Forte	23,8	7,7	24,5	0,287
	Fraco	47,5	32,9	39,5	
	Moderado	64,8	38,1	80,0	
	Negativo	37,0	.	.	
	<b>AKT</b>				
<b>NAÕ</b>	Forte	37,9	49,0	26,0	0,662
	Fraco	37,8	33,4	29,0	
	Moderado	42,3	45,8	25,5	
	<b>VEGFR</b>				
<b>SIM</b>	Forte	33,0			0,042
	Fraco	48,3	34,8	36,0	
	Moderado	34,8	23,4	27,0	
	Negativo	99,0	9,9	99,0	
	<b>VEGFR</b>				
<b>NAÕ</b>	Forte	20,8	8,8	23,5	0,037
	Fraco	33,8	43,7	23,0	
	Moderado	20,8	13,2	26,5	
	Negativo – NULO	86,4	47,5	83,0	

§: teste de Kruskal Wallis – Post Hoc – Teste de Dunn, onde médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente a 5%;

### **Discussão:**

A identificação dos tumores do estroma gastrointestinal como uma entidade única é relativamente recente. Nesta últimas duas décadas, a raridade do tumor não tornou uma tarefa fácil desvendar sua patogênese e características biológicas que possam explicar a heterogeneidade desta doença. Existe um comportamento biológico diversificado nestes tumores, os quais podem se apresentar desde tumores de baixo crescimento a neoplasias agressivas de crescimento rápido e grande capacidade de invasão para outros órgãos e até mesmo de recidiva abdominal.<sup>5</sup> Nosso estudo apresentou uma amostra de tumores bastante heterogênea a qual compreendeu casos diagnosticados desde 1999. Por este motivo, encontramos pacientes que receberam como tratamento para o GIST, além da cirurgia, a quimioterapia e radioterapia. Atualmente, se tem maior conhecimento do comportamento tumoral desta patologia de forma que não está indicada a realização de

quimioterapia citotóxica e, tão pouco, radioterapia uma vez que não há resposta documentada para este neoplasia.

Um achado aparentemente comum na fisiopatologia de quase todos (senão de todos) os casos de GIST é a ativação de vias de sinalização dependentes de tirosina-quinase, a partir de mutações com ganho de função em nos genes KIT e PDGFR-alfa. A sinalização contínua promovida pela ativação destes receptores resulta na fosforilação de substratos diretamente envolvidos na sobrevivência celular, como JAK/STAT, Ras/MAPK e, especialmente, PI3K/Akt.<sup>7</sup> PI3K/Akt constitui-se em um complexo crítico de proteínas-quinases selecionado evolutivamente em todos os tecidos humanos. A convergência de diversas vias de sinalização celular para este grupo de proteínas faz com que a sua desregulação seja um dos fenômenos mais comuns em câncer, especialmente em etapas mais avançadas da doença. Interessantemente, o complexo Pi3k/Akt encontra-se freqüentemente desregulado em tumores que conseguem criar mecanismos de resistência a tratamentos sistêmicos contra o câncer, seja por drogas convencionais, seja com terapias-alvo recentemente desenvolvidas. O caso de GIST é exemplar neste sentido. O sucesso do tratamento da doença avançada com inibidores de tirosina-quinase é inegável. Neste caso, temos um caso raro de câncer completamente dependente da atividade anormal de um receptor de superfície tirosina-quinase dependente, seja kit, seja PDGFR-alfa. O problema é que mesmo que o ganho de sobrevida em pacientes com doença avançada que recebem Imatinib ou Sunitinib seja tangível, a doença inevitavelmente progredirá em todos os pacientes.

Os dados que temos sobre ativação de AKT derivam exclusivamente de estudos de séries de pacientes ao diagnóstico. Um trabalho recente sugere que em linhagens celulares, a ativação de Akt e de proteínas a montante do mesmo na cascata de sinalização parece ser um fenômeno muito importante em células de GIST. Mas um estudo de uma série consecutiva de casos ao diagnóstico revelou que exclusivamente os tumores PDGFR-alfa dependentes, e não os tumores com mutação em kit, se utilizariam de um excesso de transdução de sinais pela via PI3K/AKT.<sup>17</sup>

Cabe ressaltar, ainda que com baixo poder de inferência, a partir da análise dos resultados obtidos neste estudo houve uma relação direta entre a imunoposição forte do Akt e diminuição da SLP. Tal limitação ora deve-se ao reduzido tamanho da amostra ora pela grande variabilidade no tempo de sobrevivência o que acaba por reduzir o poder de decisão do teste estatístico.

Estudos realizados especificamente em GIST são muito escassos. Apesar disto, estima-se que a relevância de diversos componentes da angiogênese seja mais relevante neste tipo de sarcoma que em seus similares de partes moles, como o rhabdomiossarcoma, e o sarcoma de Ewing. O uso de inibidores de tirosina quinase sem efeito direto na expressão de fatores de angiogênese (Imatinib), ou com supressão direta nestes genes (Sunitinib) resulta em redução sistemática da proliferação vascular e em resposta clínica objetiva.<sup>8,3</sup>

O estudo de VEGFR como fator de prognóstico em GIST é uma área pouco contemplada na literatura. Ainda que o efeito de Sunitinib indique o efeito benéfico da redução na expressão de VEGFR, a expressão aumentada deste receptor ao diagnóstico assim como a sua correlação com outros fatores de prognóstico é uma área quase inexplorada nos estudos dos GISTs. No presente estudo foi possível observar que imunorreatividade nula do VEGFR está associada a um aumento na SG e esta relação se mantém ao estratificarmos os pacientes pelo uso ou não do Imatinib. Desta forma, podemos inferir que nossos resultados apontam para as potencialidades deste marcador como fator prognóstico em GIST. Ainda que, nenhum dos pacientes tenham sido tratados com um inibidor específico do VEGFR podemos inferir que se a SG está diretamente relacionada à expressão desta proteína é extremamente tentadora a hipótese de que para os pacientes com alta imunorreatividade deste marcador ocorra um aumento no tempo de sobrevivência na vigência de terapia alvo inibidora do VEGFR. Em outras palavras, um estudo prospectivo que comparasse os desfechos com o uso de Sunitinib para pacientes com e sem hiper-expressão de VEGFR seria totalmente justificável a partir dos dados sugeridos pelo nosso trabalho.

Embora os GISTs sejam as neoplasias mesenquimais mais comuns do trato gastrointestinal eles representam 1% de todas as neoplasias do trato digestivo, configurando-os como uma doença rara.<sup>5</sup> Somado a isto, ainda

contamos com uma heterogeneidade nas características comportamentais destes tumores. Desta forma, estudos biológicos envolvendo este tipo de neoplasia requerem um envolvimento de um número maior pacientes. Como alternativa, estudos multicêntricos captariam um número suficiente de pacientes. Este é um cenário em que estudos multicêntricos reunindo grande número de pacientes seria possivelmente a única forma de responder uma série de questões sobre que terapêutica seria mais adequada para que grupo de pacientes.

O número de novas moléculas capazes de interferir na via Akt ou em mecanismos de angiogênese passa da centena. O número de protocolos clínicos envolvendo estas moléculas conta-se às dezenas no site do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos. A experiência com outras neoplasias indica que estas duas vias apresentam desregulação variável dependendo de cada paciente, muitas vezes sem que haja uma repercussão no fenótipo da doença. No presente estudo, identificamos que a expressão de Akt e VEGFR é de fato desigual em diferentes tumores. Mais ainda, que a sua expressão parece se associar a diferenças em desfechos clínicos de pacientes com GIST.

No presente trabalho, ao serem analisados os marcadores Akt e VEGFR, constatou-se uma forte relação entre a ausência de expressão de VEGFR e um aumento na sobrevida global dos pacientes. No que se refere à expressão do Akt somente a imunorreação forte apresentou redução estatisticamente confirmada na SG dos pacientes. Curiosamente, observamos uma relação direta entre a presença de necrose tumoral em espécimes oriundas de ressecção cirúrgica e a hiper-expressão de VEGFR (intensidades moderadas e fortes).

No entanto, ao compararmos a SG dos pacientes com a utilização do Imatinib estratificando a amostra para os marcadores VEGFR e Akt não foi identificado correlação com a imunoexpressão e aumento da SG em pacientes que utilizaram o Imatinib.

O passo seguinte seria um estudo prospectivo, em que múltiplas proteínas de vias de sinalização associadas ao Akt e VEGFR pudessem ser estudadas em pacientes que recebem terapias-alvo, na tentativa de observar associações

de expressão anômala destas proteínas com respostas mais ou menos favoráveis. Acima de tudo, acreditamos que o presente estudo já estabelece bases para que protocolos clínicos possam ser desenhados com drogas alvo distintas, levando-se em conta o tipo de defeito preponderantemente encontrado. Portanto, os nossos resultados sugerem que a baixa expressão de VEGFR é um fator de prognóstico favorável em pacientes com doença em qualquer estágio. A hiperexpressão de Akt associa-se a uma menor SLP apenas em casos avançados, sugerindo que a ativação desta via poderia ser um mecanismo adquirido em etapas finais da doença que conferem resistência ao Mesilato de Imatinib

## Referências

1. DeMatteo RP, Lewis JJ, Leung D, Mudan SS, Woodruff JM, Brennan MF. Two hundred gastrointestinal stromal tumors: recurrence patterns and prognostic factors for survival. *Annals of surgery*. 2000;231(1):51-8. Epub 2000/01/15.
2. Huizinga JD, Thuneberg L, Kluppel M, Malysz J, Mikkelsen HB, Bernstein A. W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature*. 1995;373(6512):347-9. Epub 1995/01/26.
3. Kim EJ, Zalupski MM. Systemic therapy for advanced gastrointestinal stromal tumors: beyond imatinib. *Journal of surgical oncology*. 2011;104(8):901-6. Epub 2011/11/10.
4. Liegl-Atzwanger B, Fletcher JA, Fletcher CD. Gastrointestinal stromal tumors. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2010;456(2):111-27. Epub 2010/02/19.
5. Machairas A, Karamitopoulou E, Tsapralis D, Karatzas T, Machairas N, Misiakos EP. Gastrointestinal stromal tumors (GISTs): an updated experience. *Digestive diseases and sciences*. 2010;55(12):3315-27. Epub 2010/08/21.
6. Maeda H, Yamagata A, Nishikawa S, Yoshinaga K, Kobayashi S, Nishi K. Requirement of c-kit for development of intestinal pacemaker system. *Development*. 1992;116(2):369-75. Epub 1992/10/01.
7. Maleddu A, Pantaleo MA, Nannini M, Di Battista M, Saponara M, Lolli C, et al. Mechanisms of secondary resistance to tyrosine kinase inhibitors in gastrointestinal stromal tumours (Review). *Oncology reports*. 2009;21(6):1359-66. Epub 2009/05/09.
8. McAuliffe JC, Lazar AJ, Yang D, Steinert DM, Qiao W, Thall PF, et al. Association of intratumoral vascular endothelial growth factor expression and clinical outcome for patients with gastrointestinal stromal tumors treated with imatinib mesylate. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13(22 Pt 1):6727-34. Epub 2007/11/17.
9. McGrath PC, Neifeld JP, Lawrence W, Jr., Kay S, Horsley JS, 3rd, Parker GA. Gastrointestinal sarcomas. Analysis of prognostic factors. *Annals of surgery*. 1987;206(6):706-10. Epub 1987/12/01.
10. Miettinen M, Lasota J, Sobin LH. Gastrointestinal stromal tumors of the stomach in children and young adults: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 44 cases with long-term follow-up and review of the literature. *The American journal of surgical pathology*. 2005;29(10):1373-81. Epub 2005/09/15.
11. Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: pathology and prognosis at different sites. *Seminars in diagnostic pathology*. 2006;23(2):70-83. Epub 2006/12/30.
12. Miettinen M, Virolainen M, Maarit Sarlomo R. Gastrointestinal stromal tumors--value of CD34 antigen in their identification and separation from true leiomyomas and schwannomas. *The American journal of surgical pathology*. 1995;19(2):207-16. Epub 1995/02/01.
13. Mucciarini C, Rossi G, Bertolini F, Valli R, Cirilli C, Rashid I, et al. Incidence and clinicopathologic features of gastrointestinal stromal tumors. A population-based study. *BMC cancer*. 2007;7:230. Epub 2007/12/22.
14. Ng EH, Pollock RE, Munsell MF, Atkinson EN, Romsdahl MM. Prognostic factors influencing survival in gastrointestinal leiomyosarcomas. Implications for surgical management and staging. *Annals of surgery*. 1992;215(1):68-77. Epub 1992/01/01.

15. Nilsson B, Bumming P, Meis-Kindblom JM, Oden A, Dortok A, Gustavsson 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):821-9. Epub 2005/01/14.
16. Reith JD, Goldblum JR, Lyles RH, Weiss SW. Extragastrointestinal (soft tissue) stromal tumors: an analysis of 48 cases with emphasis on histologic predictors of outcome. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2000;13(5):577-85. Epub 2000/05/29.
17. Sapi Z, Fule T, Hajdu M, Matolcsy A, Moskovszky L, Mark A, et al. The activated targets of mTOR signaling pathway are characteristic for PDGFRA mutant and wild-type rather than KIT mutant GISTs. *Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology, part B.* 2011;20(1):22-33. Epub 2011/02/18.
18. Sarlomo-Rikala M, Kovatich AJ, Barusevicius A, Miettinen M. CD117: a sensitive marker for gastrointestinal stromal tumors that is more specific than CD34. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 1998;11(8):728-34. Epub 1998/08/28.
19. Steigen SE, Eide TJ. Trends in incidence and survival of mesenchymal neoplasm of the digestive tract within a defined population of northern Norway. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica.* 2006;114(3):192-200. Epub 2006/04/29.
20. Stephan CC, Brock TA. Vascular endothelial growth factor, a multifunctional polypeptide. *Puerto Rico health sciences journal.* 1996;15(3):169-78. Epub 1996/09/01.
21. Torihashi S, Ward SM, Nishikawa S, Nishi K, Kobayashi S, Sanders KM. c-kit-dependent development of interstitial cells and electrical activity in the murine gastrointestinal tract. *Cell and tissue research.* 1995;280(1):97-111. Epub 1995/04/01.
22. van der Zwan SM, DeMatteo RP. Gastrointestinal stromal tumor: 5 years later. *Cancer.* 2005;104(9):1781-8. Epub 2005/09/02.
23. Weiss SW, Goldblum JR, Enzinger FM. *Enzinger and Weiss's soft tissue tumors.* 4th ed. St. Louis: Mosby; 2001. xiv, 1622 p. p.