

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde

Tese de Doutorado

**EXPRESSÃO DE SURVIVINA EM TUMORES DO
ESTROMA GASTROINTESTINAL**

SHEILA SCHUCH FERREIRA

Orientador: Prof. Dr. Bernardo Garicochea

Co-orientador: Prof. Dr. Vinícius Duval da Silva

Porto Alegre, julho de 2007.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

F383e Ferreira, Sheila Schuch
Expressão de survivina em tumores de estroma gastrointestinal /
Sheila Schuch Ferreira; orient. Bernardo Garicochea; co-orient. Vinicius
Duval da Silva. Porto Alegre: PUCRS, 2007.
70f.: il. tab. graf.

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

1. TUMORES DO ESTROMA GASTROINTESTINAL. 2. SURVIVINA. 3.
PROTEÍNAS INIBIDORAS DE APOPTOSE. 4. MARCADORES BIOLÓGICOS DE
TUMOR. 5. PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS. 6. AGENTES INDUTORES DA
ANGIOGÊNESE. 7. NEOPLASIAS GASTROINTESTINAIS. 8. IMUNOISTOQUÍMICA. 9.
PROGNÓSTICO. 10. ESTUDOS DE COORTES. I. Garicochea, Bernardo. II.
Silva, Vinicius Duval da. III. Título.

C.D.D. 616.99433
C.D.U. 616.33-006:577.27(043.2)
N.L.M. WI 149

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde

Tese de Doutorado

EXPRESSÃO DE SURVIVINA EM TUMORES DO ESTROMA GASTROINTESTINAL

SHEILA SCHUCH FERREIRA

Orientador: Prof. Dr. Bernardo Garicochea

Co-orientador: Prof. Dr. Vinícius Duval da Silva

Tese para postular o Título de Doutor em Clínica Médica. Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, concentração em Oncologia, Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre, julho de 2007.

“May I never see in the patient anything but a fellow creature in pain.

Grant me the strength, time and opportunity always to correct what I have acquired, always to extend its domain; for knowledge is immense and the spirit of man can extend indefinitely to enrich itself daily with new requirements.”

Maimonides, 1135-1204

AGRADECIMENTOS

Durante o período de execução deste trabalho pude contar com o auxílio de inúmeras pessoas que se tornaram referências como colaboradores e amigos verdadeiros e que, além da contribuição técnica e científica, confirmaram sua importância na minha vida.

Deste modo, gostaria de agradecer:

Ao Prof. Dr. Bernardo Garicochea, meu orientador, pelo incentivo para realização deste trabalho, sugestões e pela confiança e carinho demonstrados;

Ao Prof. Dr. Vinicius Duval da Silva, meu co-orientador, pela acolhida incondicional em um momento crítico deste trabalho, pela inestimável contribuição e disponibilidade;

À Dra. Alice de Medeiros Zelmanowicz, pela amizade e importante colaboração na análise estatística dos dados;

À Doutoranda Virgínia Nóbrega pela dedicação no auxílio na revisão de prontuários e coleta de dados;

Ao bioquímico Tiago Giuliani, pela inestimável ajuda e capacidade profissional na realização das análises imunoistoquímicas;

Às secretárias e demais funcionários do Laboratório de Anatomia Patológica;

Às minhas dedicadas secretárias Elaine Barbosa e Fernanda Martins que auxiliaram na busca de dados e prontuários;

Aos funcionários da Pós-Graduação em Medicina, Eloá e Maurício e em especial à Sônia pela simpatia e competência;

Aos meus colegas do Serviço de Oncologia do HSL-PUCRS: Dra. Fabiana Viola, Dra. Fernanda Costa, Dra. Maria Helena Sostruznik, Dr. Alan Azambuja, Dr. Carlos Barrios Dr. Sergio Lago pelo apoio, amizade e companheirismo durante as atividades do dia-a-dia e no manejo de situações muitas vezes sofridas e delicadas;

Ao Hospital São Lucas da PUCRS, que nos últimos 15 anos se tornou uma extensão da minha própria casa;

À minha mãe Maria Carmem Schuch Ferreira pelo exemplo de vitalidade, alegria e compreensão e ao meu irmão Fernando pelo carinho;

Ao meu namorado, Sergio Soares, meu melhor amigo, confidente e companheiro, por sua alegria , espontaneidade e por seu amor;

Ao CNPQ, pelo auxílio financeiro para execução deste trabalho;

Aos pacientes e suas famílias que diariamente nos estimulam a aprimorar a arte do cuidar e nos trazem ensinamentos constantes e exemplares.

RESUMO

Base Teórica: Os GIST são as neoplasias mesenquimais mais frequentes do trato gastrointestinal. Os fatores de prognóstico relevantes dos GIST são: o tamanho do tumor, topografia e índice mitótico. Survivina é uma proteína inibidora da apoptose envolvida na regulação do ciclo celular, normalmente expressa no núcleo de células pluripotenciais e geralmente inexistente em tecido normais. Survivina possui alta expressividade em neoplasias epiteliais. A expressão de survivina em GIST é desconhecida.

Métodos: Amostras teciduais de 43 GIST foram analisadas através de estudo imunoistoquímico com método TMA e utilizando anticorpo monoclonal para survivina com a técnica de avidina-biotina-peroxidase. O objetivo primário foi determinar a prevalência da expressão de survivina nos GIST e definir sua associação com achados patológicos e evolução clínica. A expressão de survivina foi considerada positiva quando mais de 10% das células tumorais observadas em cinco campos de grande aumento apresentavam imunoreatividade.

Resultados: Survivina foi expressa em 31 (72%) das 43 amostras. A predominância da expressão ocorreu no citoplasma enquanto que nenhuma reatividade nuclear foi encontrada. Não houve associação entre a expressão de survivina e achados clínico-patológicos. Houve uma tendência em favor da expressão de survivina e diminuição para tempo para progressão.

Conclusões: A prevalência de survivina em GIST é semelhante ao anteriormente demonstrado em neoplasias epiteliais e mesenquimais. Os resultados do presente estudo sugerem que a inibição da apoptose mediada por survivina pode se tornar um fator de prognóstico em GIST.

ABSTRACT

Background: Gastrointestinal stromal tumors are the most common mesenchymal tumors of the gastrointestinal tract. The well-described prognostic factors are tumor size, digestive tract localization and mitotic index. Survivin is an apoptosis inhibitor involved in cell cycle regulation normally expressed in the nucleus of embryogenic and pluripotent stem cells, but is usually absent in normal tissues. Survivin is aberrantly expressed in epithelial neoplasms. The expression profile of survivin in GIST is unknown.

Methods: Tissue samples of 43 gastrointestinal stromal tumors specimens were analyzed by immunohistochemistry using TMA method and monoclonal antibodies for survivin with the avidin-biotin-peroxidases technique. The purpose was to determine the prevalence of survivin expression and to define its association with clinical and pathologic features and the clinical outcome. Expression of survivin was considered positive when more than 10% of observed tumor cells in the microscopic field demonstrated immunostaining.

Results: Survivin was expressed in 31 (72%) of 43 samples. Immunostaining occurred in cytoplasm and no nuclear expression was seen. The correlation between survivin expression and clinical or pathologic features was not demonstrated. There is a trend in favor of survivin expression and time to progression in our data.

Conclusions: The prevalence of survivin in GIST is similar to others studies previously related. The results of present study suggest that the apoptosis inhibition mediated by survivin has the potential to become an independent prognostic factor in GIST.

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

AINE	Anti-inflamatório não esteróide
ASCO	Sociedade Americana de Oncologia Clínica
CIC	Células intersticiais de Cajal
CGA	Contagem por campo de grande aumento
COX-2	Ciclo-oxigenase – 2
CT	Tomografia Computadorizada
DNA	Ácido desoxirribonucléico
GIST	Tumores do estroma gastrointestinal
HSL	Hospital São Lucas
IHQ	Imunoistoquímica
KIT	Oncogene KIT
kDa	KiloDaltons
m-RNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PET	Tomografia com emissão de pósitrons
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PIA	Proteína inibidora da apoptose
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
RECIST	Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
SCF	Stem cell factor
SMA	Actina anti-músculo liso
S100	Proteína S-100
TGI	Trato gastrointestinal
TK	Tirosina quinase
VEGF	Fator de crescimento vaso –endotelial

LISTA TABELAS

Tabela 1.	Sistema de consenso de graduação de risco (56).....	10
Tabela 2.	Categorias de risco baseadas em tamanho, índice mitótico e localização anatômica (57)	10
Tabela 3 .	Expressão de survivina em várias neoplasias.....	26
Tabela 4.	Características clínicopatológicas da população estudada (n=43).....	38
Tabela 5.	Características clínico-patológicas dos tumores sincrônicos.....	39
Tabela 6.	Expressão de marcadores imunoistoquímicos	40
Tabela 7.	Achados imunoistoquímicos da população estudada.....	43
Tabela 8.	Expressão de survivina e características clínico-patológicas	44

LISTA FIGURAS E ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Sinalização de KIT e PDGF em GIST (50).....	7
Figura 2.	Localização e frequência das mutações em <i>KIT</i> e <i>PDGF</i> (extraído de www.gistsupport.org).....	7
Figura 3.	Vias de apoptose (extraído de www.imgenex.com).	22
Figura 4.	Blocos de parafina e TMA	33
Figura 5.	Lâminas de TMA.....	34
Figura 4.	Expressão imunoistoquímica de Survivina	41
Figura 5.	Expressão imunoistoquímica de Ki 67.....	42
Figura 6.	Expressão de Survivina e sobrevida	45
Figura 7.	Expressão de survivina e sobrevida em doença localizada	46
Figura 8.	Expressão de survivina e sobrevida livre de progressão	47
Figura 9.	Expressão de survivina e chance de recidiva	47
Figura 10.	Expressão de Ki 67 e sobrevida.....	48
Figura 11.	Expressão de Ki 67 e sobrevida livre de progressão.....	49
Figura 12.	Expressão de Ki 67 e chance de recidiva	49

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 Epidemiologia dos GIST.....	3
2.2 GIST: Aspectos Clínicos.....	4
2.2.1 Sintomatologia dos GIST.....	5
2.2.2 GIST e Síndromes Hereditárias.....	6
2.2.3 Patogênese.....	6
2.2.4 Fatores de prognóstico.....	9
2.2.5 Mutações de KIT e biologia dos GIST.....	11
2.3 Métodos Diagnósticos.....	12
2.4 Diagnóstico Patológico.....	13
2.5 Tratamento da Doença Localizada.....	15
2.6 Tratamento da Doença Avançada.....	17
2.7 Avaliação de Resposta ao Tratamento Farmacológico.....	20
2.8 Apoptose e Survivina.....	21
2.9 Características e Funções da Survivina.....	23
2.10 Expressão Tecidual de Survivina em Câncer.....	25
3 HIPÓTESE.....	29
4 OBJETIVOS.....	30
5 MÉTODOS.....	31
5.1 Delineamento, População e Amostra.....	31
5.2 Critérios de Inclusão.....	31
5.3 Critérios de Exclusão.....	32
5.4 Variáveis em estudo.....	32
5.5 Imunoistoquímica.....	33
5.6 Análise Estatística.....	35
6 RESULTADOS.....	36
6.1 Caracterização da Amostra.....	36
6.2 Análise Imunoistoquímica.....	39
6.3 Expressão de Survivina.....	40
6.4 Expressão de Ki 67.....	42

6.5 Expressão de survivina e achados clínico-patológicos	44
6.6 Expressão de survivina e sobrevida livre de doença em 3 anos	45
7. DISCUSSÃO.....	51
8.CONCLUSÕES.....	59
9 REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento e progressão neoplásica envolve desregulação seqüencial de múltiplos reguladores do ciclo celular promovendo proliferação celular desordenada e vantagem de sobrevivência de células tumorais agressivas associadas a múltiplas alterações genéticas cumulativas. Há evidências que a sobrevivência prolongada de células geneticamente instáveis e sua transformação no fenótipo maligno esteja associada à inibição progressiva da apoptose.(1)

A apoptose é uma forma morfológicamente distinta de morte celular, geneticamente regulada, e desempenha papel vital como mecanismo protetor contra o desenvolvimento de neoplasias através da remoção de células portadoras de dano de DNA(2). A inibição da apoptose confere vantagem de sobrevivência em células com alterações genéticas e pode promover a aquisição de mutações subseqüentes que estimulam a progressão tumoral e também contribuem para resistência à radioterapia e quimioterapia.(3,4)

Survivina é um membro da família das proteínas inibidoras da apoptose, abundantemente expressa durante a embriogênese e em tecidos tumorais e praticamente inexistente em tecidos adultos normais, exceto em tecidos altamente proliferativos como o parênquima testicular, timo e placenta(5). Os mecanismos reguladores da expressão de survivina em células malignas ainda não estão suficientemente esclarecidos, porém estudos em diversas linhagens tumorais têm demonstrado que a expressão desta proteína pode estar associada à piora da sobrevivência global. (6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25)

Os tumores de estroma gastrointestinal (GIST) são as neoplasias mesenquimais mais freqüentes do trato gastrointestinal e tipicamente caracterizados pela expressão imunoistoquímica de KIT e PDGF.

Tradicionalmente, múltiplos parâmetros histológicos tais como índice mitótico, tamanho tumoral, celularidade, presença de necrose e pleomorfismo têm sido utilizados para se prever o comportamento biológico dos GIST. (26,27,28,29,30,31,32)

Embora uma variedade de características clínico-patológicas possa afetar o prognóstico, se faz necessário identificar marcadores moleculares sensíveis e específicos que

possam monitorar expressão de genes associados à apoptose e proliferação celular e possivelmente capazes de se tornarem fatores prognósticos consistentes.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Epidemiologia dos GIST

Os tumores de estroma gastrointestinal (GIST) são neoplasias mesenquimais pouco frequentes; representam aproximadamente 0,1 % a 3% de todas as neoplasias do trato gastrointestinal (TGI) e possuem origem provável nas células de Cajal, localizadas no interstício, com características neuromotoras e responsáveis pela motilidade do TGI.(28, 32)

De acordo com estudos populacionais se estima que a incidência de GIST seja de 10-20 casos por milhão de habitantes.(33)

Nos Estados Unidos da América, houve um aumento na taxa de incidência, de 0,028 por 100.000 habitantes em 1992 para 0,688 para 100.000 habitantes no ano de 2002; representando uma incidência estimada anual de 4320 casos (34,35). Nilsson e cols. relataram a incidência de aproximadamente 14,5 casos por milhão na Suécia, enquanto que na Holanda a incidência anual dos GIST apresentou acréscimo de 20,8 por milhão de habitantes em 1995 para 25,7 por milhão de habitantes em 2003.(36,37)

Previamente os GIST eram confundidos com leiomiossarcomas intestinais pois ambos têm aparência microscópica semelhante; a utilização de um marcador imunistoquímico (CD 117) para a proteína KIT contribuiu sobremaneira para a diferenciação dos GIST de outras neoplasias fusiformes do TGI.(37)

Em adição às taxas crescentes de incidência houve um marcado aumento de sobrevida desde 2000, devido ao melhor entendimento da patobiologia dos GIST, do papel central das mutações do *KIT* na patogênese dos GIST à introdução do inibidor de tirosina quinase (TK), imatinib, na prática clínica.(36 ,37)

A exata incidência de GIST no Brasil, assim como em outros países, é difícil determinar uma vez que estes tumores só recentemente foram reconhecidos como entidade patológica distinta.(38).

Entretanto, devido a dificuldades de diagnóstico e de suspeição, se acredita que esta neoplasia seja frequentemente subdiagnosticada.

2.2 GIST: Aspectos Clínicos

Os GIST caracteristicamente ocorrem em indivíduos acima de 50 anos de idade; a média de idade varia de 55 a 65 anos.(39)

São raros antes da idade de 40 anos e extremamente raros em crianças; a maioria dos tumores identificados como GIST em crianças são na realidade tumores inflamatórios miofibroblásticos. (28,29)

Apresentam distribuição semelhante entre os gêneros, enquanto que alguns estudos apontam discreta predominância masculina.(40)

Podem ser diagnosticados em qualquer localização do TGI ,porém aproximadamente 60% dos tumores ocorrem no estômago, 30% no intestino delgado, 5% no cólon e reto e 5% no esôfago; raramente os GIST se desenvolvem no mesentério, omento e retroperitônio.(39)

O tamanho tumoral médio na apresentação é de 8 cm(40, 41,42,43).

GIST comumente se apresentam como lesões solitárias; a multiplicidade é rara em GIST esporádicos.

Tumores menores de 2 cm geralmente são assintomáticos e detectados incidentalmente em endoscopias digestivas altas, exames radiológicos ou durante exploração abdominal; considera-se que um terço dos GIST são descobertos ao acaso devido a cirurgias abdominais realizadas para outras patologias.(44)

Os GIST podem coexistir com diferentes tipos de câncer de maneira sincrônica ou metacrônica.A freqüência global de segundos tumores em diferentes séries varia de 4,5 a 33% (média 13%); os carcinomas de TGI constituem o maior percentual(47%).(45)

Por exemplo, em estudo coordenado por Kawanowa, 100 espécimes anatomopatológicas de estômago de pacientes portadores de câncer gástrico submetidos à gastrectomia total foram reanalisadas e demonstraram a presença de GIST em 35 % dos casos; os tumores apresentavam diâmetro médio de 1,5 mm e somente 8% possuíam mutação do *KIT*.(46)

2.2.1 Sintomatologia dos GIST

De maneira similar a outros sarcomas, os GIST tendem a deslocar ou comprimir órgãos adjacentes sem apresentar invasão direta destas estruturas, portanto, podem adquirir grandes volumes antes de se tornarem sintomáticos. Um recente estudo populacional demonstrou que aproximadamente 70% dos GIST são sintomáticos, 20% não o são e 10% são detectados em autópsia.(37)

Os GIST sintomáticos de esôfago tipicamente se apresentam com disfagia e ocasionalmente como massa mediastinal que no momento transoperatório pode ser identificada junto ao esôfago.(44)

A maior parte dos pacientes com GIST gástricos e de intestino delgado apresenta sangramento digestivo devido á erosão da luz do TGI e outros sintomas não específicos, tais como náuseas, vômitos, desconforto ou aumento da circunferência abdominal. Infreqüentemente podem romper para a cavidade peritoneal causando hemorragia intraperitoneal grave.(37,47)

Os GIST colorretais podem se manifestar por sangramento retal, dor, perfuração cólica ou obstrução intestinal.A maioria dos GIST colorretais são de alto risco, possuem probabilidade significativa de desenvolverem doença metastática e estão associados com mau prognóstico ; tais pacientes devem ser seguidos de maneira intensa por períodos de tempo prolongados e considerados para terapia adjuvante com inibidores da TK.(48)

O padrão de disseminação metastático dos GIST difere dos outros sarcomas de partes moles.Os GIST freqüentemente metastatizam para o fígado e cavidade abdominal e raramente para linfonodos loco-regionais.Disseminação extra-abdominal envolvendo parênquima pulmonar e ósseo é pouco freqüente, exceto em casos avançados.(28)

2.2.2 GIST e Síndromes Hereditárias

Sete por cento dos pacientes portadores de neurofibromatose tipo I desenvolvem GIST; usualmente se manifestam com múltiplos tumores, mais freqüentes em jejuno e com ausência de mutações em *KIT* ou *PDGF*.

O GIST familiar é uma doença genética infreqüente, do tipo autossômica dominante; a maioria das famílias afetadas apresenta mutação no *KIT* na linhagem germinativa. Várias outras mutações nos exons 8,11,13 e 17 de *KIT* e exon 12 de *PDGF* foram identificadas nos GIST familiares.(49,50)Tendem a ocorrer em vários membros da mesma família, os quais apresentam múltiplas neoplasias primárias, lesões multifocais e diagnóstico em idades mais precoces que os GIST esporádicos.(51)GIST familiares apresentam como característica a negatividade para expressão de CD 34.(47)Alguns achados adicionais incluem máculas pigmentadas na pele do períneo, axila, mãos e face e mastocitose cutânea(urticária pigmentosa).

A tríade de Carney é uma síndrome de etiologia indeterminada, ocorrendo predominantemente em mulheres jovens(abaixo dos 35 anos) , caracterizada pela presença de GIST gástricos multifocais, condroma pulmonar e paraganglioma extra-adrenal. Geralmente possui melhor prognóstico que GIST esporádicos e não apresenta mutações em *KIT* ou *PDGF*. (45,48)

2.2.3 Patogênese

O protooncogene *KIT* codifica a glicoproteína transmembrana KIT que funciona como receptora para o ligante SCF (stem cell factor) ; após esta interação, ocorre a ativação destes receptores, dimerização e autofosforilação do KIT que ativa a cascata de sinalização intracelular envolvida na tumorigênese, incluindo proliferação, adesão e diferenciação celular.(49)

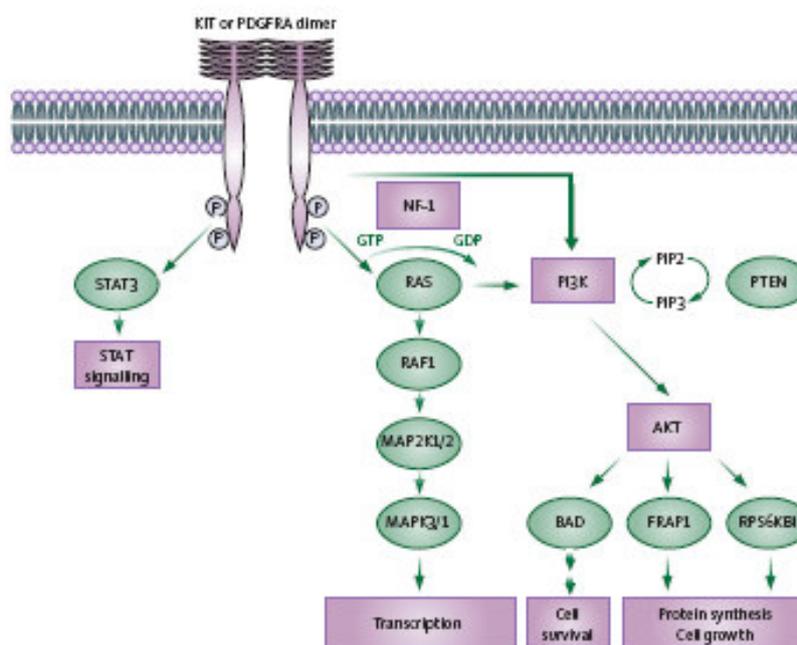


Figura 1. Sinalização de KIT e PDGF em GIST (50)

A expressão de KIT é observada nas células intersticiais de Cajal, e também em células tronco hematopoiéticas, mastócitos, melanócitos, células de Leydig, espermatogônias, células germinativas, células basais cutâneas e epiteliais da mama. (52)

A mutação com ganho de função do *KIT* ocorre em 91-99% dos casos, resultando na ativação da função tirosina quinase independentemente da ligação com SCF.

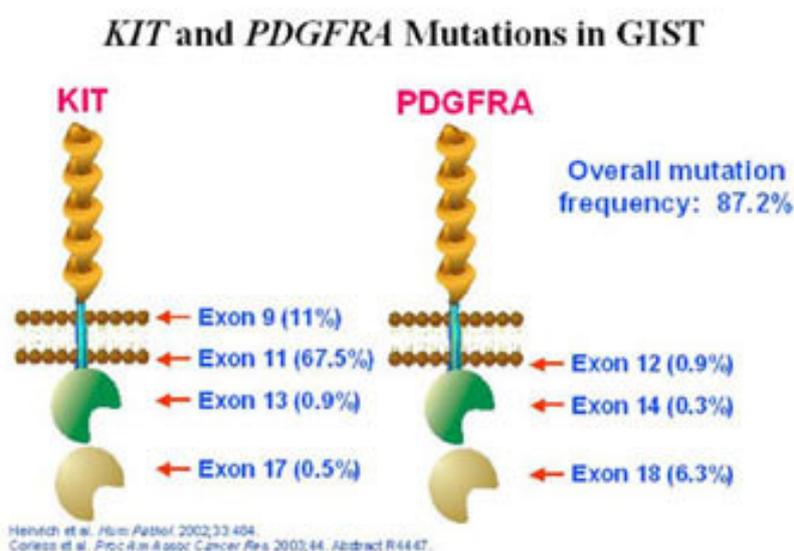


Figura 2. Localização e frequência das mutações em *KIT* e *PDGF* (extraído de www.gistsupport.org)

Os sítios mais frequentes de mutação são os exon 11(70%) , exon 9 (10%) e raramente os exons 13 e 17.O tipo de mutação é aparentemente relacionado ao prognóstico, com deleções tendo comportamento mais agressivo em comparação com inserções e mutações de ponto.(53)

A mutação do exon 9 no domínio extracelular é descrita em 5 a 18% dos casos ,ocorrendo principalmente nos códons 501-502 e representada por duplicação-inserção.Está associada com localização em intestino delgado e cólon direito e tem comportamento biológico agressivo.(48)

As deleções, inserções ou mutações de ponto no exon 11 ocorrem no domínio justamembrana.A frequência desta mutação varia de 20 a 92% dependendo do método de conservação do material (congelado ou fixado em parafina) e da técnica utilizada para sua identificação.

As mutações do exon 11 estão associadas à melhor taxa de sobrevida global, sobrevida livre de recorrência e resposta ao uso do imatinib.(54)

A maioria das mutações do exon 11 estão localizadas entre os códons 559 e 560, com deleções e inserções preferencialmente afetando códons 557-559 e mutações de ponto afetando códons 559 e 560.

A mutação do exon 13 é rara, afeta códon 642 e ocorre em 0,8- 4,1% dos casos e está relacionada à resistência ao tratamento com imatinib.

A mutação do exon 17 é ainda mais raro, apenas acometendo 0,6 % dos casos e afetando códons 820 e 822 e tem mecanismo de ativação incerto.

As mutações no gene *PDGF* são observadas em 7-12% dos casos, ocorrendo mais frequentemente no exon 18 e raramente em exon 12 e 14.Estão associadas com o tipo histológico epitelíode, localização gástrica e demonstram fraca ou nula imunoreatividade para KIT, mas são funcionalmente similares ao mutante KIT.

As mutações do exon 18 ocorrem nos códons 842-849 e algumas delas estão vinculadas à resistência considerável ao tratamento com imatinib; enquanto que as mutações no exon 12, que envolvem os códons 561-571 estão associadas a alta taxa de resposta ao imatinib.A mutação do exon 14 é rara e demonstra sensibilidade in vitro ao imatinib comparável à observada em mutantes KIT exon 13.

Ao redor de 10% dos GIST não demonstram mutação detectáveis no *KIT* ou no *PDGF*.(53, 54,55)

2.2.4 Fatores de prognóstico

Tradicionalmente, os três fatores de prognóstico mais relevantes em GIST são a topografia, tamanho tumoral e índice mitótico.

GIST com tamanhos maiores que 5 cm estão associados com prognóstico desfavorável.O sítio anatômico de origem está relacionado com o comportamento biológico; pacientes com GIST originários no reto ou intestino delgado tem pior prognóstico comparados com evoluções mais favoráveis de pacientes com GIST gástricos.Da mesma forma, GIST que exibem número de mitoses igual ou maior que 5 mitoses por campo de grande aumento estão associados com prognóstico desfavorável independentemente do sítio de origem.(55)

As duas classificações de graduação de risco mais frequentemente utilizadas são as de Fletcher (56) e de Miettinen (57); enquanto que a primeira leva em consideração o tamanho tumoral e índice mitótico, a segunda incorpora o sítio de localização como fator prognóstico independente.Os dois sistemas de classificação encontram-se detalhados nas tabelas abaixo:

Tabela 1. Sistema de consenso de graduação de risco (56)

	Tamanho tumoral (cm)	Contagem mitótica (CGA)
Muito baixo risco	< 2	$\leq 5/50$
Baixo risco	2-5	$\leq 5/50$
Risco intermediário	≤ 5	> 5 a ≤ 10
	> 5 ou ≤ 10	$\leq 5/50$
Alto risco	> 5	$> 5/50$
	> 10	qualquer taxa mitótica
	qualquer tamanho	$> 10/50$

Tabela 2. Categorias de risco baseadas em tamanho, índice mitótico e localização anatômica (57)

Grupo	Tamanho(cm)	Mitoses (50 CGA)	Categoria de Risco
1	≤ 2	≤ 5	EST : benigno ID : benigno
2	2-5	≤ 5	EST: potencial maligno muito baixo ID: potencial maligno baixo
3A	5-10	≤ 5	EST: potencial maligno muito baixo ID: potencial maligno
3B	> 10	≤ 5	EST: potencial baixo a moderado ID: potencial maligno
4	≤ 2	> 5	EST: incerto ID: potencial maligno
5	2-5	> 5	EST: baixo a moderado ID: potencial maligno
6 A	> 5	> 5	EST: potencial maligno
6B	> 10	> 5	ID: potencial maligno

Benigno : nenhuma morte relacionada ao tumor detectada

Potencial maligno muito baixo: < 3% de doença progressiva

Incerto: dados insuficientes

Potencial maligno baixo a moderado : 12 a 15% mortalidade relacionada ao tumor

Potencial maligno: 49 a 86% de mortalidade relacionada ao tumor.

Enquanto GIST de alto grau ou com disseminação intra e extra-abdominal estão associados com altas taxas de morte relacionadas ao tumor (83%), estas taxas também são descritas em 1,2 % nos pacientes com neoplasias de muito baixo risco, baixo risco e risco intermediário. De acordo com estes dados, atualmente todos os GIST devem ser considerados como tendo potencial maligno, com possível exceção de tumores muito pequenos (menores de 1 cm). Entretanto, mesmo em tumores desta dimensão já é possível detectar a mutação do *KIT*; deste modo o termo “GIST benigno” não deveria ser ainda utilizado. (39, 53)

A ressecção incompleta é também fator preditivo de mau prognóstico; enquanto que pacientes com margens microscópicas negativas a sobrevida em 5 anos varia de 34-63%, ressecções macroscópicas incompletas têm sobrevida global em 5 anos de somente 8%. (58)

Fatores de prognóstico adversos independentes adicionais incluem gênero masculino, histologia tumoral (epitelióide) e mutações em *KIT* excetuando as do exon 11.(59)

2.2.5 Mutações de *KIT* e biologia dos GIST

Mutações *KIT* específicas também se correlacionam com comportamento clínico.

Não há evidência, entretanto, que a progressão a partir de doença localizada para doença metastática se origine a partir de mutações adicionais ou cumulativas em *KIT*.

Em estudo efetuado por Singer e cols., a sobrevida livre de recorrência em 5 anos foi de 89% para aqueles com mutação "missense" de exon 11 versus 40% para aqueles com outras mutações em *KIT* e 0% para os que apresentavam mutação no exon 13 versus 51% para todos ou outros.(60)

Entre os tumores com deleções no exon 11, aqueles envolvendo códons 562-579 demonstravam maior taxa de metástases do que aqueles com deleções em códons 550-561.(58). Pacientes com deleções no exon 11 códons 557-558 possuem pior sobrevida livre de recorrência (23%)do que outros (74%).(59)

Mutações no exon 9 são mais freqüentes em GIST francamente malignos (17%) do que nos tumores de baixo risco(3%).(60)

Semelhantemente às neoplasias epiteliais do TGI, os GIST também apresentam expressão de enzimas envolvidas na proliferação celular ,como a Cox -2 ,que se encontra expressa no citoplasma de 80- 92 % dos GIST ; este achado poderia sugerir o uso potencial de AINE no tratamento. (61,62)

Aberrações nos reguladores do ciclo celular é um achado freqüente, podem representar um evento precoce e serem um fator contribuinte para a patogênese dos GIST.

GIST são mais frequentemente associados ao fenótipo E2 F1 (92,9%) , p 53 positivo(43%), e p16 e p21 negativos; a expressão de proteínas pró-apoptóticas foi observada em 92 e 100 % dos GIST.(63,64,65)

Steinert e cols. evidenciaram através de análise de 81 pacientes metastáticos e sem exposição prévia ao imatinib que houve pior sobrevida global em pacientes que expressavam níveis elevados de Bcl-2.(66)

Até o momento, se desconhece estudos envolvendo a expressão de proteínas relacionadas aos mecanismos anti-apoptóticos e sua correlação com a sobrevida de pacientes com GIST.

2.3 Métodos Diagnósticos

Os GIST costumam ser detectados incidentalmente como massa submucosa durante a realização de endoscopia digestiva alta.

O emprego da ecoendoscopia pode ser útil em determinar a extensão de um tumor de menor volume, entretanto, os achados radiológicos característicos dos GIST incluem lesões grandes, heterogêneas e geralmente maiores que 5 cm de diâmetro.

Em estudos convencionais com bário, as lesões da submucosa se apresentam como defeitos de enchimento, com ulceração central, eventualmente com extensão intraluminal e raramente com calcificações. Alguns tumores podem ser contíguos com a parede do intestino apenas através de um pedículo.

A ecografia demonstra massa altamente vascular com ecogenicidade mista e pode ser útil para realização de procedimentos de biópsia por agulha fina ou core e no transoperatório para avaliação de lesões hepáticas.(67)

Na tomografia computadorizada contrastada (CT) os GIST são massas heterogêneas bem definidas com halo periférico marcado e de espessura variável, e frequentemente apresentando atenuação central, resultado de necrose, hemorragia ou transformação cística.(68)

Extensão extra-gástrica pode ocorrer para o ligamento gastro-hepático, gastro-esplênico ou cavidade do pequeno omento. Este achado diferencia os GIST de outros tumores do estômago como linfoma ou adenocarcinoma, os quais não têm crescimento exofítico marcado e geralmente estão associados com linfadenomegalias, o que não é um achado usual encontrado nos GIST.(69)

A utilização da CT de abdômen pode ser apropriada tanto para se avaliar o tumor primário quanto para se determinar a presença de metástases e é considerado o método de imagem de escolha para planejamento cirúrgico.

A Ressonância Nuclear Magnética apresenta-se como método adjunto para se determinar o sítio de origem de tumores volumosos e acessar envolvimento de órgãos adjacentes e vasos sanguíneos. Os componentes sólidos dos tumores apresentam baixo sinal na seqüência em T1, alto sinal em T2 e intensificação da imagem após injeção de gadolínio.

Os GIST geralmente demonstram intensa captação no 18F-fluoro-deoxiglicose PET (PET) , assim como outras neoplasias intra-abdominais. A sensibilidade diagnóstica do PET e CT tem se demonstrado comparável em 90% e pode ser aumentada combinando-se as duas modalidades.(70)

2.4 Diagnóstico Patológico

“GIST” foi inicialmente um termo descritivo proposto em 1983 por Mazur e Clark para definir tumores não carcinomatosos intra-abdominais que não exibiam achados morfoestruturais de células de músculo liso ou características imunoistoquímicas de células neurais.(71)

Anteriormente ao ano de 2000 não havia critérios objetivos para classificação de GIST; eram designados como leiomiomas, leiomioblastomas, leiomiossarcomas, Schwannomas, ou tumores gastrointestinais neuro-autônômicos.(72,73)

Recentemente, Kindblom e outros autores propuseram que a maioria dos tumores de estroma se originariam a partir de células tronco mesenquimais que se diferenciariam no

fenótipo das células intersticiais de Cajal (CIC).As CIC, também conhecidas como células-marcapasso, são uma população de células que têm papel no controle da motilidade do TGI.Todavia, estas células não são encontradas exclusivamente no TGI, também foram descritas em outros órgãos como pâncreas, trato urinário, útero e tuba uterina, mama, coração, e parede de vasos sanguíneos.(74)

As CIC expressam o protooncogene *KIT* e sua maturação depende da interação do ligante SCF ao receptor KIT .(74,75)

Os GIST são freqüentemente diagnosticados somente após o exame patológico do espécime ressecado.

Os achados macroscópicos típicos dos GIST incluem tumor circunscrito e lobulado com superfície granular, e freqüentes áreas de hemorragia e necrose , alterações císticas e predominante localização e crescimento extraluminal.

A maioria dos tumores são localizados na submucosa, muscular própria ou ambos e apresentam 3 morfologias microscópicas distintas : fusiforme (70%), epitelióide (20%) ou combinação destes dois subtipos.(39,74)

Em função do risco de ruptura tumoral, com conseqüentes disseminação tumoral e hemorragia, o uso rotineiro de biópsia pré-operatória nos GIST é controverso.(36)

Estudos coordenados por Elliot e Wilimore-Payne, nos quais a coleta de tecido foi realizada através de biópsia com agulha fina, concluíram que este método fornece espécime quantitativa e qualitativamente adequado para fins diagnósticos utilizando técnicas de imunistoquímica ou avaliação molecular.(76,77)

Na análise imunistoquímica, em contraste com tumores verdadeiramente originários em musculatura lisa, os GIST são positivos para expressão do receptor de TK (antígeno CD 117 ou KIT) em 95% dos casos.

KIT é o marcador mais sensível e específico para o diagnóstico de GIST, embora também possa ser expresso em outras neoplasias como melanoma, sarcomas de células claras, angiossarcomas, sarcoma de Ewing, tumor mielóide extra-medular, tumores germinativos de testículo, especialmente seminomas e alguns carcinomas, notadamente carcinoma de pequenas células de pulmão.(78,79)

Aproximadamente 60-70% dos GIST apresentam positividade para CD34, 30-40% para actina anti-músculo liso(SMA), e 5% demonstram imunopositividade para proteína S-100.(6).(39,41)

A positividade para SMA pode ser focal ou global e é inversamente relacionada com a expressão de CD34, isto é, tumores SMA positivos são geralmente CD34 negativos e vice-versa.

Hassan e cols. demonstraram , após análise de 300 espécimes de GIST de esôfago e reto, alta positividade para CD34(acima de 90%), enquanto que os GIST de intestino delgado apresentam menor positividade(50%).(48)

Segundo Wang e cols. o marcador CD34 é considerado o melhor indicador do fenótipo maligno dos GIST.(73)

A expressão de Desmina, proteína típica de células musculares lisas, esqueléticas e cardíacas é raramente encontrada em GIST.(56)

Ocasionalmente podem apresentar expressão de citoqueratinas, o que pode dificultar o diagnóstico histoquímico.(55)

2.5 Tratamento da Doença Localizada

A ressecção cirúrgica completa é a terapia padrão dos GIST localizados e permanece como única alternativa de cura desta patologia.

A ressecção completa é atingida em aproximadamente 85 % dos pacientes com doença localizada, entretanto a taxa de sobrevida global para pacientes com GIST que foram submetidos à ressecção completa da doença primária com margens livres varia de 20-63% em 5 anos, com taxa de recorrência em torno de 50% .(39, 80)

Nas situações onde os GIST aderem a órgãos contíguos pode ser necessário a ressecção em bloco, embora nesta situação não haja benefício aparente em margens amplas.

Linfadenectomia geralmente não é indicada, a menos que haja linfonodos regionais aumentados, já que metástases linfonodais são raramente encontradas.(29,30)

Uma vez que a ressecção linfonodal não é necessária para o manejo cirúrgico do GIST, a laparoscopia poderia ser um método apropriado para tratamento destes tumores, principalmente em GIST gástricos.(79)

Cirurgia laparoscópica também pode ser considerada uma opção adequada para tumores com padrão de crescimento intragástrico.

A frequência de complicações pós-operatórias da laparoscopia é comparável à da técnica cirúrgica convencional e a taxa de conversão para cirurgia a céu aberto é de 15%(81).

É fundamental evitar ruptura acidental dos tumores durante o procedimento laparoscópico pois a ruptura antes ou durante a execução deste é um fator prognóstico estatisticamente significativo de má evolução.A ruptura tende a ocorrer em grandes tumores, assim a laparoscopia estaria contraindicada em tumores volumosos.(80)

Embora o National Comprehensive Cancer Network (NCCN) - Clinical Practice Guidelines for Optimal Management of Patients with GIST recomende que a técnica laparoscópica deva ser limitada a tumores menores que 2 cm ,a remoção segura e completa de GIST maiores, de até 8,5 cm foi relatada.(81,82)

Não há rotina estabelecida em termos de seguimento pós-operatório para pacientes que são submetidos à ressecção de GIST primário; uma vez que não há estudo comprobatório de que a detecção precoce da recorrência possa interferir de maneira positiva na sobrevida.(39)

Nilsson e cols. recentemente demonstraram, em estudo piloto incluindo 23 pacientes com GIST de alto risco submetidos á ressecção cirúrgica completa e tratados com imatinib por 12 meses, um aumento significativo da sobrevida livre de recorrência (4% no grupo tratado versus 67% ,comparando com grupo de controle histórico).(83)

O uso de terapia adjuvante com inibidores de TK após a ressecção completa do GIST primário está atualmente sendo avaliado por 4 estudos utilizando imatinib em doses usuais e em diferentes regimes de duração de tratamento.

2.6 Tratamento da Doença Avançada

Classicamente os GIST apresentam resistência ao uso de drogas quimioterápicas convencionais e ao emprego de radioterapia.

O desenvolvimento do inibidor de TK no ano de 2000 , mesilato de imatinib, revolucionou o tratamento dos GIST.

Imatinib inibe seletivamente TK específicas, incluindo KIT, ABL, BCR-ABL e PDGF e foi primeiramente utilizado em pacientes com Leucemia Mielóide Crônica ,neoplasia hematológica produzida pela fusão dos genes BCR e ABL resultante da transferência de material genético entre os cromossomos 9 e 22.(83)

O primeiro paciente portador de GIST metastático iniciou o tratamento com imatinib em 2000 após ter falhado a diversas terapias e atingiu resposta radiológica excepcional acompanhada por PET com virtual desaparecimento das lesões.(43)

Este achado estimulou a realização de diversos estudos clínicos que comprovaram a excelente taxa de resposta dos pacientes com GIST metastáticos ao imatinib.

No atual momento, se considera que o uso de imatinib em GIST recidivados apresente um benefício clínico(determinado pela taxa de resposta objetiva e permanência de doença estável) em mais de 85% dos pacientes.

Em pacientes com doença avançada, o imatinib produz taxa de resposta completa em 4-7% , parcial em 67% dos pacientes e permanência de doença estável em 18 a 30%, com sobrevida livre de progressão em 1 ano de 73%.(84,85,86,87)

Atualmente a sobrevida de 2 anos de pacientes com doença metastática é em torno de 70%.Em contraste, antes da introdução do imatinib, a sobrevida média dos pacientes após ressecção cirúrgica por GIST recorrente era de apenas 15- 20 meses.(88)

A dose usualmente recomendada de imatinib é de 400 mg diários.

A dose diária de 800 mg está associada a aumento de sobrevida livre de progressão, contudo acarreta maior toxicidade e encontra-se recomendada somente em pacientes que apresentem sinais de progressão, produzindo estabilidade da doença em 29,4% dos pacientes ,com sobrevida média de 11,5 semanas.(83)

O uso de imatinib geralmente está associado a boa tolerância à medicação, com perfil de toxicidade facilmente manejável e sem relato de mortalidade relacionada ao tratamento.

As toxicidades mais frequentemente relatadas são anemia (92%), edema periorbitário (69%), rash cutâneo (69%), fadiga (76%), náusea (57%), granulocitopenia (47%), e diarreia (47%).(84)

Apesar de apresentar excelentes resultados com o tratamento, o imatinib não leva à cura e em torno de 50% dos pacientes apresentam resistência à droga no período aproximado de 2 anos.(89,90).Adicionalmente, 10-15% dos GIST são primariamente resistentes ao uso de imatinib.

Os mecanismos da resistência ao imatinib são ainda pouco conhecidos embora o tipo de mutação do *KIT* possa ser preditivo da evolução ao tratamento.Pacientes com mutação do exon 11 têm maior probabilidade de resposta ao imatinib do que aqueles com mutação no exon 9 ; pacientes sem mutação em *KIT* raramente respondem ao imatinib.(52).

A resistência também pode estar associada à diminuição de níveis séricos da droga em função de maior depuração plasmática após maior tempo de exposição à droga e à aquisição de novas mutações em *KIT* na vigência do tratamento.(52,92,93)

A resistência primária ou secundária ao imatinib impulsionou o desenvolvimento de novas drogas com funções inibitórias de TK.

Sunitinib é um inibidor multialvo de TK com atividades antitumorais e antiangiogênicas.(94,95).Seus efeitos estão associados ao bloqueio de receptores de TK sinalizados por KIT, PDGF e das 3 isoformas de receptores de VEGF.(95)

Em estudo prospectivo e randomizado, desenvolvido em 312 pacientes com GIST avançado com falha ao imatinib , o sunitib demonstrou taxa de resposta completa de 2,9 %, resposta parcial de 24,6 % e 42 % de doença estável.O tempo médio de sobrevida livre de progressão foi de 27,3 semanas.

Efeitos adversos relacionados ao uso de sunitinib raramente levaram à descontinuação do tratamento e foram facilmente manejáveis com redução de dose, interrupção temporária da medicação ou tratamento médico de suporte.(92).

Análises preliminares dos pacientes com doença resistente ao imatinib demonstram que o sunitinib mostra maiores taxas de resposta antitumoral e benefício clínico em pacientes

com mutações primárias no exon 9 do *KIT* , comparados com aqueles com mutações primárias no exon 11 do *KIT*.(95,96)

Estudo multicêntrico em andamento, com resultados parciais apresentados no encontro anual da Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) de 2006 ,avalia a eficácia de nilotinib, droga planejada para uso em terceira linha de inibição de TK.Utilizando-se doses variando de 200 mg a 800 mg diárias foi atingida taxa de estabilização de doença em 71 a 100% dos pacientes.(96)

A cirurgia tradicionalmente desempenha papel paliativo no manejo de pacientes com GIST localmente avançado ou metastático.Em pacientes que apresentam doença indolente e volumosa, a cirurgia de citorredução pode oferecer alívio significativo da dor e dos sintomas compressivos.(97)

Em pacientes com GIST primário localmente avançado e que apresentam resposta ao uso de imatinib ,tornando-se ressecáveis, a cirurgia está associada a alta taxa de ressecção completa, e aumento de sobrevida livre de doença quando comparados a controles históricos.(98)

A ressecção cirúrgica após terapia com imatinib ou sunitinib pode ser realizada com intuito curativo em alguns pacientes com doença avançada que tenham apresentado resposta ao tratamento, enquanto que pacientes que apresentam franca progressão de doença não possuem nenhum benefício em ser submetidos a tentativas de ressecção.(87,95, 99,100)

Recentemente, Kobayashi e cols. avaliaram a eficácia de quimioembolização arterial utilizando cisplatina em 110 pacientes com GIST avançado não elegíveis para ressecção cirúrgica; foi demonstrado taxa de 14 % de resposta parcial e 74% de estabilização de doença ; a mediana de sobrevida livre de progressão foi de 8,2 meses , com 77 % dos pacientes vivos em 1 ano.Estes achados sugerem a utilização de quimioembolização como uma opção efetiva e segura para pacientes com GIST metastático envolvendo o fígado e com falha à terapia sistêmica convencional. (100)

2.7 Avaliação de Resposta ao Tratamento Farmacológico

Diferentemente de outros tumores sólidos, os critérios de resposta da classificação RECIST são considerados inadequados para avaliação de resposta nos GIST em virtude deste sistema ser baseado fundamentalmente na redução do volume tumoral (critério de resposta parcial requer diminuição de 30% no volume tumoral avaliado).

A redução de volume nos GIST não se correlaciona apropriadamente com resposta ao tratamento; as lesões podem permanecer estáveis após a terapia devido à substituição de tumor por tecido fibroso e eventualmente podem até apresentar aumento de volume devido a diminuição da densidade tumoral por edema ou hemorragia.

Segundo critérios de Choi, a resposta dos GIST ao tratamento medicamentoso ocorre quando há redução na densidade radiológica das lesões em mais de 15% , degeneração cística ou diminuição do volume tumoral em mais de 10% .(101)

Stroobants e cols. demonstraram que PET apenas 8 dias após o início do imatinib prediz corretamente a resposta ao tratamento e precede em 7 semanas os resultados semelhantes por CT. (70)

A resposta metabólica precoce verificada por PET foi associada a maior sobrevida livre de progressão.(101)

Tanto PET como CT são considerados métodos confiáveis para a avaliação de resposta ao imatinib (69,101).Após 30 dias de tratamento com imatinib a resposta é acuradamente prevista em 85% casos usando PET e em 95% usando a combinação dos 2 métodos , enquanto usando somente CT esta percentagem atinge somente 44%.(102,103) Deste modo, considera-se o uso de PET importante para avaliação de resposta precoce ao tratamento.(104)

Estudo realizado por Goh e cols. utilizando imatinib neoadjuvante em 23 pacientes sugere que a resposta ao PET não se correlaciona adequadamente com resposta patológica; esta foi acuradamente prevista somente em 26% dos casos.(105)

Embora extremamente útil na constatação de resposta precoce ao tratamento com imatinib, este exame não substitui uso rotineiro de CT contrastada, que é mais acessível no

nosso meio e pode adequadamente avaliar resposta em aproximadamente 8 semanas; ressalta-se ainda que 25 % dos pacientes apresentam resposta radiológica mais lenta ao imatinib e o fato de não haver modificação do quadro radiológico não sugere mudança na abordagem terapêutica.(106)

A mensuração de níveis séricos de KIT através da técnica de ELISA não se correlacionou com a resposta ao tratamento; houve decréscimo da concentração de KIT porém se acredita que esta diminuição esteja associada predominantemente a diminuição do “turnover” do KIT sérico e não ao reflexo da diminuição de volume tumoral.(52)

2.8 Apoptose e Survivina

O desenvolvimento e progressão das neoplasias envolve proliferação celular desordenada causada por alterações genéticas que se acumulam com o passar do tempo. Há evidências que a sobrevivida prolongada de células geneticamente alteradas esteja associada à inibição progressiva da apoptose.(1)

A apoptose designa um padrão de morte celular morfológicamente distinta da necrose.(107,108) Na necrose observa-se destruição da membrana celular através de aumento na pressão osmótica a partir do ambiente extra-celular(107). A apoptose é um processo geneticamente regulado em que estímulos extranucleares induzem à condensação de cromatina, degradação do DNA , “blebbing” da membrana, o que leva em última análise à fragmentação irreversível da célula.(4,108). Representa um mecanismo protetor vital contra o desenvolvimento câncer, através da remoção de células com dano severo do DNA.(2) consistindo em uma das funções celulares mais importantes para a manutenção da homeostase de tecidos normais. (108,109)

Os principais efetores bioquímicos da apoptose são as proteases cisteína -aspartil-serina, - as caspases - que são sintetizadas como zimógenos inativos ,porém uma vez ativadas, sistematicamente e em um processo hierárquico, degradam o DNA e proteínas vitais constitucionais, resultando na perda irreversível da viabilidade celular.(8).As caspases são classificadas como iniciadoras(caspases 8 e 9) e executoras (caspases 3,6 e 7

).(3,4,5,6).Embora as características estruturais sejam compartilhadas entre as caspases iniciadoras e executoras, sua ativação ou inibição são diferentemente reguladas.

Dependendo da origem do estímulo que provoca a ativação do processo de apoptose, a mesma é desencadeada por duas vias distintas: intrínseca ou extrínseca , conforme ilustrado abaixo:

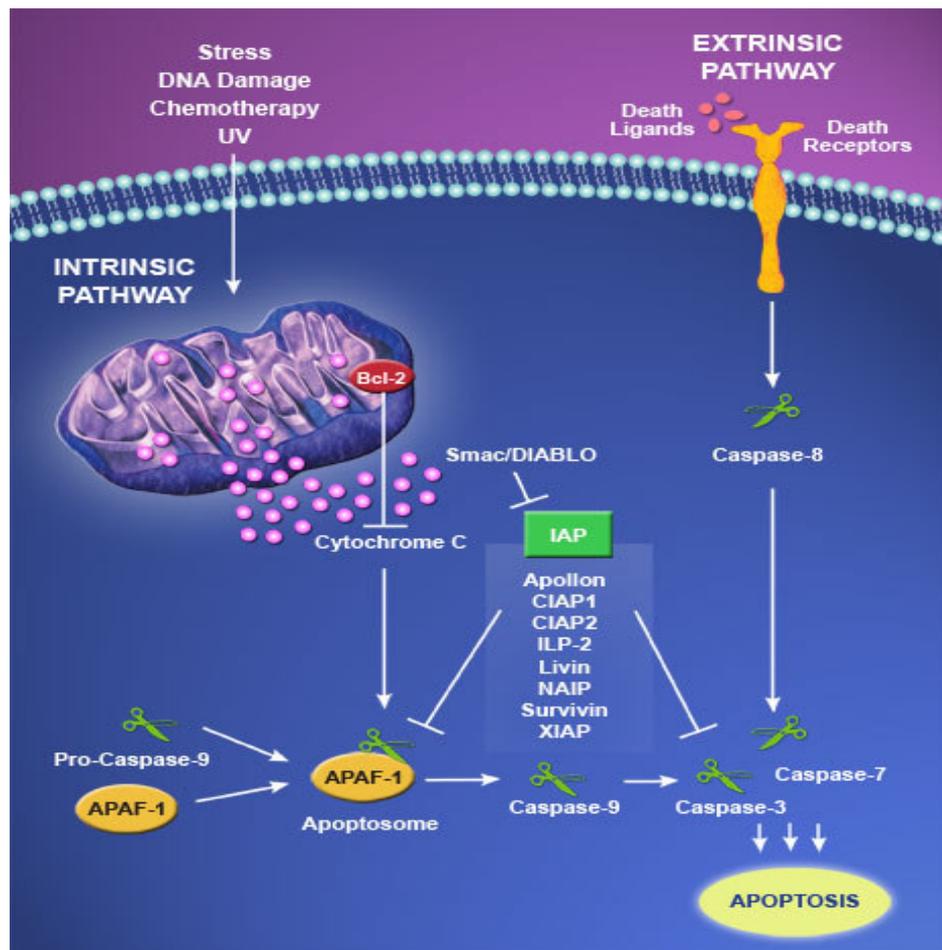


Figura 3. Vias de apoptose (extraído de [www. imgenex.com](http://www.imgenex.com)).

A via intrínseca é mediada pela mitocôndria e, em resposta ao estímulo apoptótico (p.ex. ativação de oncogene ou dano ao DNA), várias proteínas são liberadas a partir do espaço intermembrana da mitocôndria para o citoplasma.(3)Algumas destas proteínas incluem citocromo *c* ,SMAC (segundo ativador de caspase derivado de mitocôndria), DIABLO(inibidor direto da apoptose), Endo G(endonuclease G)e OMI /HTRA2 (proteína A2 requerente de alta temperatura)(4,5).Entre estas proteínas pró-apoptóticas destaca-se o

citocromo c, liberado devido ao aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial externa. Uma vez liberado, o citocromo c liga-se à proteína APAF-1, ativando-a e induzindo uma alteração conformacional que permite que esta se ligue ao ATP e forme um complexo protéico chamado corpo apoptótico, ou apoptossomo, que medeia a ativação da caspase 9, que por sua vez ativa a caspase efetora 3, desencadeando o processo apoptótico.(111)

A via extrínseca é iniciada mediante a interação de um ligante extracelular, como por exemplo TNF ou FasL, com receptor da superfície celular, como TNF-R1 ou Fas. A conexão destes ligantes aos receptores promove a ativação das caspases através da formação de um complexo sinalizador de indução da morte (DISC). A formação deste complexo leva à ativação da caspase iniciadora 8 que subsequentemente ativa a caspase executora 3. (110) Adicionalmente, após a ativação de Fas e TNF-R1 é estabelecida uma preponderância de proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2; com consequente aumento de permeabilidade da membrana mitocondrial e liberação de ativadores das caspases como citocromo c e SMAC.(111,112)

Outras proteínas regulatórias, pertencentes à família das proteínas inibidoras de apoptose (PIA), foram implicadas neste processo. As PIA incluem ML-IAP, XIAP, cIAP1, cIAP2, NIAP, livina, apollon e survivina e possuem a capacidade de bloquear uma etapa comum da cascata após a liberação do citocromo c mitocondrial pela inibição ou promoção da degradação das caspases efetoras 3 e 7 e interferindo com a atividade e processamento da caspase 9.(114,112)

2.9 Características e Funções da Survivina

O gene, denominado *Survivina*, implicado no controle da progressão do ciclo celular, foi identificado a partir de banco de genoma humano por Altieri em 1997.(113) Em contraste com *Bcl-2*, *Survivina* não parece estar envolvido na regulação fisiológica da apoptose de tecidos epiteliais mas é proeminentemente expresso em várias malignidades.

O gene *Survivina* humano consiste em 4 exons e 3 introns, está localizado na posição telomérica do cromossomo 17 banda 25 e sua transcrição está ligada à progressão mitótica e regulação do “checkpoint” do fuso mitótico.(4,113)

A translação do mRNA *survivina* origina uma proteína citoplasmática de 142 aminoácidos, com peso molecular de 16,5 kDa e usualmente expressa no desenvolvimento embriônico mas indetectável em tecidos adultos normais, mesmo em queratinócitos da pele , região de altos índices mitóticos.(4,13) Também é fortemente responsável pela modulação da angiogênese através de vários mecanismos incluindo ativação de VEGF , migração e invasão celular através da ativação de Rac-1. (114)

Foram descritas 5 isoformas de *survivina* em humanos:

- *survivina* “ wild type” : forma mais comum e que apresenta preferencialmente localização citoplasmática; (114 ,115)
- *survivina -2B*: gerada pela inserção de um exon alternativo (exon 2B) que apresenta perda da capacidade antiapoptótica , também com localização citoplasmática;
- *survivina-deltaEx3* : originária da remoção do exon 3 resultando em mudança de fase de leitura preferencialmente localizada no núcleo; (116)
- *survivina -3B* : produto da introdução de um novo exon (exon 3B) resultando em mudança de fase de leitura com término prematuro da proteína ;
- *survivina 2alfa* : contém seqüências codificadoras a partir do exon 1 e 2 e um aminoácido adicional antes do término. Esta última forma, recentemente descrita, é altamente expressa em tumores e parece atenuar a atividade anti-apoptótica de *survivina* e sensibilizar células à quimioterapia.(115)

A expressão de *survivina* está desregulada nas neoplasias por vários mecanismos moleculares incluindo ganho de função do gene (p. ex. em neuroblastoma) , metilação de exon 1 *Survivina*(produzindo silenciamento no epitélio ovariano normal) , aumento da atividade proliferativa exclusiva em células tumorais , alteração no fator transcricional NF-kB anti-apoptótico durante a proliferação celular, aumento da atividade da via PI3K/Akt, e, perda da função do p53.(4 ,118)

Endoh e cols. , através de RT-PCR, demonstraram que *survivina* hiper-regula a atividade da telomerase aumentando a transcrição gênica da transcriptase reversa da telomerase humana. (117)

O papel da *survivina* na biologia do câncer excede sua simples função na inibição da apoptose;a superexpressão de *survivina* em câncer que está associada à perda de diferenciação

tecidual, pode permitir que células com defeito nos fusos ou centrômeros desalinhados continuem no ciclo de divisão celular. (119,120)

2.10 Expressão Tecidual de Survivina em Câncer

Em geral, survivina apresenta uma distribuição tecidual diferente das outras PIA e representa a principal PIA expressa em neoplasias. Está presente no timo, placenta, células tronco CD34 positivas, endométrio proliferativo e células do epitélio cólico basal.(16).

Enquanto a expressão de survivina não ocorre em linhagens teciduais não proliferativas de qualquer órgão, foi seletivamente expressa em 34-100% de tecidos neoplásicos(incluindo cânceres de mama, pulmão, câncer colorretal, gástrico, fígado, bexiga, rim, neuroblastoma, gliomas, sarcomas de partes moles, e neoplasias hematológicas); altos níveis de expressão foram considerados preditivos de progressão tumoral em termos de sobrevida livre de doença e em sobrevida global (24). Foi seletivamente limitada ao núcleo e citoplasma das células, e nenhuma imunoreatividade foi observada em linfócitos e outras células do estroma. Os estudos mais recentes que avaliaram a expressão de survivina em tumores epiteliais estão resumidos na tabela abaixo:

Tabela 3. Expressão de survivina em várias neoplasias

Autor	N	Neoplasia	Método	Expressão (Ref.)
Sarela, 2000	144	Cólon	RT PCR	63,5% (1)
Sarela , 2002	52	Pâncreas	IHQ	88% (12)
Yu, 2002	50	Gástrico	RTPCR	68% (121)
Ikehara, 2002	79	Pulmão	IHQ	41% (23)
Hofmann, 2002	24	Pulmão	RTPCR	100% (24)
Takai, 2002	31	Endométrio	IHQ	43,5% (122)
Ito, 2003	129	Tireóide	IHQ	84% (119)
Lin, 2003	188	Cólon	IHQ	63,2% (8)
Chen, 2004	52	Cólon	PCR	67,3% (123)
Meng, 2004	79	Gástrico	RTPCR	64% (9)
Knutsen, 2004	98	Reto	IHQ	51% (16)
Qiao , 2004	42	Pâncreas	IHQ	81,95% (13)
Li, 2004	80	Gástrico	IHQ	76% (10)
Kami, 2004	52	Pâncreas	IHQ	68% (14)
Oshita, 2004	72	Pulmão	IHQ	49% (18)
Lu, 2004	48	Pulmão	IHQ	83% (19)
Vischioni, 2004	53	Pulmão	IHQ	40% (20)
Ku, 2004	88	Bexiga	IHQ	58% (124)
Weikert, 2005	35	Testículo	PCR	100% (120)
Monzó, 2005	83	Pulmão	RTPCR	85,5% (21)
Ryan, 2006	420	Mama	ELISA	90% (125)
Byun, 2007	85	Rim	IHQ	79% (126)

RTPCR: reação em cadeia da polimerase em tempo real; PCR: reação em cadeia da polimerase; IHQ:imunoistoquímica; ELISA: enzyme linked immunosorbent serology assay.

O nível de expressão de survivina parece estar relacionado à faixa etária; foi demonstrado que em idosos portadores de câncer colorretal (acima de 70 anos) as taxas de expressão de survivina foram maiores do que indivíduos igualmente portadores de câncer colorretal abaixo desta faixa etária.(127)

A taxa de expressão de survivina costuma observar um gradiente crescente conforme a evolução da neoplasia : em amostras de câncer colorretal foi descrita em 0% em adenomas, 31,7% em displasias de baixo grau, 56,7% em displasias de alto grau e 63,2% em carcinomas.(17, 18).

Estudos coordenados por Ito e Weickert correlacionaram a expressão de survivina com grau de diferenciação tumoral e concluíram que níveis elevados de survivina estão relacionados com maior indiferenciação dos tumores.(119,120)

Apesar de haver resultados contraditórios em considerar a expressão de survivina como fator prognóstico, diversos estudos identificaram correlação com pior sobrevida livre de doença, sobrevida global e recorrência local com a expressão de survivina em linhagens tumorais distintas como câncer de esôfago, estômago (9,10,11 ,119) pâncreas(12,13,14), reto (16) , pulmão (18,19,20,21,22,23),bexiga(124) e endométrio(122).

A expressão de survivina em tumores mesenquimais foi pouco estudada.

Caldas e cols. descreveram a expressão de survivina utilizando análise imunohistoquímica em 63 pacientes portadores de rabiomiossarcoma com positividade de 80%.(128)

Estudo coordenado por Taubert em 2001, através de PCR em tempo real, identificou m-RNA de survivina em 94 pacientes com sarcomas de partes moles; utilizando análise de regressão de Cox, encontrou relação inversa entre o nível de mRNA de survivina e sobrevida global($p=0,009$, $RR =2,7$).A expressão de transcritos de survivina foi detectada em 64% dos pacientes e, neste estudo foi considerado um fator preditor independente de sobrevida.(129)

Em 2003, Kappler avaliou a expressão de survivina através de ELISA e Western blot em amostras de sarcomas de partes moles.Altos níveis de survivina foram detectados em extratos de tumores e lisados de células tumorais.Além de haver uma correlação significativa entre os dois métodos, este estudo revelou altos níveis de survivina nos espécimes tumorais e sugeriu valor preditivo negativo independente na taxa de sobrevida em pacientes com sarcomas de partes moles.(130)

Diferentemente destes estudos anteriores, a expressão de survivina nuclear demonstrada por imunohistoquímica em amostras tumorais de 40 pacientes portadores de osteossarcoma foi associada à sobrevida prolongada, enquanto que a expressão citoplasmática não evidenciou correlação com a evolução clínica destes pacientes.(131)

Embora a expressão de survivina tenha sido detectada em várias linhagens tumorais, até o momento, inexistem dados na literatura em relação à expressão de survivina em sarcomas intestinais.

Assim, o objetivo primário deste estudo é a verificação da expressão de survivina em amostras de tecido tumoral de pacientes portadores de GIST submetidos a tratamento cirúrgico e identificar sua relação com achados clínico-patológicos e sobrevida livre de doença em 3 anos.

3 HIPÓTESE

A hipótese deste estudo é que a expressão de survivina esteja relacionada com achados clínicos e patológicos de pacientes com GIST e com a diminuição da taxa de sobrevida livre de doença em 3 anos.

4 OBJETIVOS

1. Determinar a expressão imunohistoquímica de survivina em amostras de tecidos obtidas de pacientes portadores de GIST submetidos á cirurgia com intuito curativo.

2. Correlacionar a expressão de survivina com achados clínicos e patológicos de pacientes com GIST.

3. Avaliar a associação entre expressão de survivina e sobrevida livre de doença em 3 anos de pacientes com GIST.

5 MÉTODOS

5.1 Delineamento, População e Amostra

Foi desenvolvido estudo de observação, descritivo e analítico. Inicialmente, foi realizado estudo transversal para determinar a prevalência da expressão imunoistoquímica de survivina nas amostras tumorais. Em um segundo momento, procedeu-se estudo do tipo coorte histórico com componentes contemporâneos para determinar a ocorrência dos desfechos clínicos de interesse nos pacientes.

Foram revisados e analisados dados clínicos e anatomopatológicos de pacientes submetidos a cirurgias efetuadas no período entre janeiro de 1998 e julho de 2006, a partir de revisão de prontuário. Os dados epidemiológicos foram analisados mediante seguimento dos pacientes no ambulatório de Oncologia do HSL-PUC, através de revisão de prontuário ou mediante coleta de dados diretamente do paciente ou familiar.

A variável principal do estudo (expressão de survivina) foi analisada através da expressão imunoistoquímica em blocos de parafina armazenados no Laboratório de Anatomia Patológica do HSL- PUCRS.

5.2 Critérios de Inclusão

Foram incluídos pacientes maiores de 18 anos de idade com diagnóstico histopatológico e imunoistoquímico de GIST (KIT ou PDGF positivos) submetidos á ressecção cirúrgica com intuito curativo atendidos no período de janeiro de 1998 a julho de 2006 nos serviços de Cirurgia Geral e Cirurgia do Aparelho Digestivo do HSL – PUCRS ou pacientes encaminhados após a ressecção cirúrgica ao Serviço de Oncologia do HSL – PUCRS.

5.3 Critérios de Exclusão

Foram excluídos todos os pacientes que apresentavam uma ou mais das condições abaixo listadas:

- Pacientes submetidos previamente a tratamento radioterápico e/ou quimioterápico;
- Pacientes com registros médicos insuficientes em relação aos dados epidemiológicos;
- Espécimes de anatomia patológica inadequadas para análise patológica e imunoistoquímica.

5.4 Variáveis em estudo

As variáveis analisadas em relação à expressão de survivina foram:

- Idade ;
- Gênero ;
- Localização do tumor ;
- Tamanho tumoral ;
- Índice mitótico ;
- Tempo para progressão de doença, definido como o tempo decorrido entre o diagnóstico e o aparecimento de recorrência da doença ;
- Sobrevida livre de doença em 3 anos.

5.5 Imunoistoquímica

Após a ressecção tumoral, a totalidade da peça cirúrgica foi enviada ao Serviço de Anatomia Patológica a fim de ser avaliada com métodos convencionais utilizando coloração de hematoxilina e eosina e subseqüentemente a análise imunoistoquímica com os reagentes comercialmente disponíveis para KIT, CD34, Vimentina, Desmina, Proteína S-100, Actina, Enolase neuroespecífica, Panqueratinas, Sinaptofisina, Cromogranina, PDGF e EGFR.

A técnica de imunoistoquímica foi realizada em tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina utilizando o método avidina-biotina peroxidase. Foram realizados cortes histológicos com 3µm de espessura em micrótomo rotativo Leica RT2150 e para montagem dos espécimes em lâmina foi utilizada a técnica de arranjo em matriz de amostras teciduais (TMA). Esta técnica permite a elaboração de um bloco de parafina contendo amostras tumorais obtidas de dezenas de blocos de parafina originais, desta forma simplificando o trabalho e diminuindo o custo da determinação da expressão do marcador.(132)

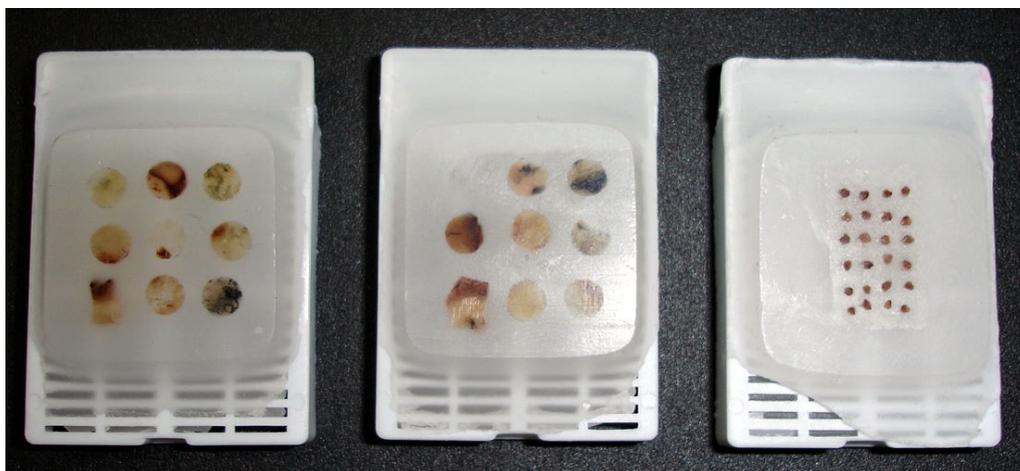


Figura 4. Blocos de parafina e TMA



Figura 5. Lâminas de TMA

As lâminas foram desparafinizadas em estufa histológica (De Leo) por 20 minutos com temperatura de 69°C, 2 incubações em xilol por 5 minutos cada, 5 incubações com álcool etílico 99° por 2 minutos cada, lavagem em água corrente até remoção completa do álcool e depois mantidas em tampão PBS.

A recuperação antigênica foi realizada utilizando tampão Tris/Edta pH 9.0 para Survivina e tampão citrato pH 6.0 para Ki 67 por 20 minutos em microondas, a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com solução de peróxido de hidrogênio a 5% em álcool metílico com 2 incubações de 15 minutos cada e o bloqueio de ligações inespecíficas foi realizado com leite em pó desnatado 10% em tampão PBS.

Os anticorpos foram diluídos em 1:100 para anti-survivina (clone 12C4 do laboratório Dako) e 1:250 para anti-Ki 67 (clone MM1 do laboratório Novocastra) usando como diluente tampão PBS. As incubações com os anticorpos primários foi realizada em incubadora BOD a 5°C durante a noite.

Para detecção da reação antígeno-anticorpo foram utilizados anticorpo secundário biotilado e complexo avidina-HRP.

A marcação foi realizada utilizando como cromógeno a diamina benzidina (DAB, DAKO). Por fim as lâminas foram contra-coradas utilizando hematoxilina de Harris, desidratadas em uma série de álcool etílico 99°, clarificadas em xilol e montadas com bálsamo do Canadá.

A imunexpressão de survivina foi avaliada em, no mínimo, 5 campos de grande aumento e foi considerada positiva quando a reatividade citoplasmática e/ou de membrana

com o anticorpo ocorria em 10% ou mais das células tumorais examinadas. Adicionalmente foi utilizado escore de intensidade das células coradas, variando de 0 a +++; sendo que 0= reatividade nula, + = reatividade fraca, ++ = reatividade moderada, e +++ reatividade forte. O controle positivo utilizado foi tecido placentário e controle negativo tecido epitelial circunjacente não neoplásico.

A análise do Ki 67 foi realizada segundo sistema de observação em 5 campos de grande aumento e se levou em consideração a proporção de células tumorais coradas verificadas em cinco campos de grande aumento. O escore de proporção variou de zero a três (0 = sem mitoses ou não avaliável, 1= 0-5 mitoses, 2 = mais do que 5 e menos do que 10 mitoses e 3 = acima de 10 mitoses por campo).

A leitura e interpretação de todas as colorações realizadas para análise do índice mitótico através do marcador de proliferação celular Ki 67 e de survivina foi realizada em observação simultânea e sob supervisão direta do patologista co-orientador.

5.6 Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi descrita segundo as suas distribuições em frequências e proporções para as variáveis categóricas e em medidas de tendência central e dispersão para as variáveis contínuas. Inicialmente foi determinada a prevalência da expressão de survivina na população estudada. A correlação entre a expressão de survivina e os achados clínico-patológicos foram estatisticamente analisados usando teste do qui-quadrado (χ^2).

A análise de sobrevida livre de recorrência foi calculada utilizando método de Kaplan –Meier.

Em todos os casos os testes foram bicaudais e os valores de p de $< 0,05$ foram considerados significativos.

Todas as análises estatísticas foram realizadas pelos programas Epiinfo e SPSS versão 12.0 para Windows.

6 RESULTADOS

6.1 Caracterização da Amostra

No período de janeiro de 1998 a julho de 2006, 45 pacientes com diagnóstico de GIST foram submetidos à ressecção cirúrgica com intuito curativo pelas equipes de Cirurgia ou encaminhados ao Serviço de Oncologia do HSL –PUCRS.

Na primeira revisão 2 pacientes (4%) foram excluídos ; devido à impossibilidade de análise do material anátomo-patológico ou ausência de dados do seguimento clínico.

Dos 43 pacientes incluídos, 7 (16 %) apresentavam doença avançada ao diagnóstico trans-operatório (doença parcialmente ressecada ou com evidência de metástases hepáticas ou peritoniais).

Quinze (34,8%) pacientes eram homens e 28 (65%) mulheres.

A idade ao diagnóstico variou de 22 a 83 anos (mediana de 62 anos) , sendo que 24 (55,8%) eram maiores de 60 anos.

Oitenta e cinco por cento dos pacientes eram sintomáticos; o sintoma mais comumente apresentado foi dor abdominal.

A localização predominante dos GIST ocorreu no estômago (51%), seguida de tumores em intestino delgado (34,9 %), 4,7% em cólon, e 7 % em mesentério.

O tamanho mediano dos tumores foi de 7,4 cm, variando de 0,4 a 30 cm. Somente em um paciente não foi possível mensurar o tamanho da lesão, devido ao paciente ter se negado a tratamento cirúrgico.

Dos 43 tumores, 18 % foram maiores que 2 cm e menores que 5 cm , 32 % foram maiores que 5 cm e menores que 10 cm ,e 40 % foram maiores que 10 cm. Os tumores maiores que 10 cm foram encontrados com frequências semelhantes no estômago(16%) e intestino delgado (13%). Todos os tumores menores que 2 cm (7%) foram achados incidentalmente durante o transoperatório.

A forma de apresentação macroscópica mais encontrada foi a nodular representando 88 % do total.

Os subtipos histológicos observados foram: 14 tumores fusiformes (32,5%) 18 epitelióides(41,8%) e 11(25,5%) apresentando ambos os subtipos anteriores(mistos).

Quanto ao índice mitótico 55% das neoplasias foram avaliadas no laudo anátomo-patológico inicial : 8 foram de alto grau e 13 de baixo grau.

Em 11 pacientes, submetidos à gastrectomia, foi realizada linfadenectomia no trans-operatório; a média de linfonodos retirados foi de 13 por paciente. Não houve envolvimento destes por metástases de GIST, entretanto, dois pacientes portadores de câncer gástrico sincrônicos apresentavam comprometimento linfonodal por células do tipo adenocarcinoma.

As margens cirúrgicas microscópicas estavam comprometidas em 5 espécimes, indeterminadas em 2 e não foram avaliáveis em 2 espécimes; no restante das amostras as margens foram livres.

As principais características clínicas e patológicas dos pacientes estudados estão demonstradas na Tabela 4:

Tabela 4. Características clínico-patológicas da população estudada (n=43)

Caso	Idade	Gênero	Topografia	Tamanho(cm)	Margens	Prof.Inv.	Macro	Status	Subtipo
1	83	M	DELG	11,5	livres	submuc	nodular	Primário	F
2	57	F	EST	2	comprom	submuc	nodular	Primário	F
3	73	F	DELG	16	comprom	submuc	nodular	Avançado	F
4	72	F	EST	10,7	livres	serosa	nodular	Primário	F
5	69	F	EST	0,7	livres	musc e sub	nodular	Primário	M
6	75	M	CECO	9	livres	serosa	nodular	Avançado	E
7	60	F	EST	10,6	livres	serosa	polipoide	Primário	F
8	69	M	EST	20	livres	serosa	nodular	Primário	F
9	69	F	DELG	6,2	livres	serosa	nodular	Primário	F
10	44	F	EST	30	comprom	serosa	nodular	Avançado	E
11	26	M	EST	3,6	livres	serosa	polipoide	Multicêntrico	F
12	62	M	EST	3,5	livres	NA	nodular	Primário	E
13	69	F	DELG	5	livres	serosa	nodular	Primário	E
14	56	F	EST	2,5	livres	serosa	nodular	Primário	E
15	67	F	EST	4,1	livres	serosa	nodular	Primário	M
16	67	F	DELG	23,7	livres	fígado	nodular	Primário	E
17	52	F	DELG	7,2	indeterm	serosa	nodular	Primário	E
18	79	F	EST	10,8	livres	serosa	nodular	Primário	M
19	75	F	EST	5	livres	submuc	nodular	Primário	E
20	80	F	CECO	7,5	livres	serosa	nodular	Primário	E
21	61	M	EST	24	comprom	serosa	nodular	Avançado	F
22	43	F	RETRO	17	livres	serosa	nodular	Primário	F
23	46	F	DELG	16,4	livres	serosa	nodular	Primário	E
24	62	M	EST	1,1	livres	serosa	nodular	Primário	E
25	48	M	DELG	3	livres	serosa	ulcerada	Primário	E
26	53	M	EST	2,5	livres	serosa	ulcerada	Primário	F
27	31	F	EST	6,5	livres	musc e sub	nodular	Primário	E
28	81	F	DELG	5,5	comprom	serosa	nodular	Avançado	E
29	47	M	RETRO	28	livres	serosa	nodular	Primário	M
30	63	F	DELG	5,2	livres	serosa	nodular	Primário	M
31	42	F	ABD	17,8	comprom	serosa	nodular	Primário	M
32	78	F	EST	8,3	livres	serosa	nodular	Primário	M
33	36	F	DELG	5	livres	submuc	nodular	Primário	F
34	44	F	EST	6,3	livres	serosa	nodular	Primário	E
35	56	F	DELG	9,2	livres	indeterm	exofítica	Primário	E
36	62	M	EST	4,2	livres	serosa	nodular	Primário	M
37	63	F	EST	5	livres	indeterm	nodular	Primário	F
38	42	M	DELG	13	livres	serosa	nodular	Avançado	M
39	83	M	EST	13,9	livres	serosa	nodular	Primário	M
40	51	M	EST	0,4	NA	NA	NA	Primário	F
41	79	F	DELG	7,6	Livres	serosa	nodular	Primário	E
42	55	M	EST	1,9	Livres	serosa	nodular	Avançado	E
43	22	F	DELG	10,6	Livres	serosa	nodular	Primário	M

M= masculino ; F= feminino ; EST= estômago ; DELG= intestino delgado ; CECO= ceco;
RETRO=retroperitônio ;Prof. Inv.= profundidade de invasão; submuc= submucosa; musc= muscular ; F= fusiforme;
E = epitelióide ; M= misto.

Sete pacientes apresentavam tumores sincrônicos com o diagnóstico de GIST(16%).Cinco tumores foram descobertos incidentalmente durante laparotomia realizada para tratamento de outras neoplasias gastrointestinais.O diagnóstico de GIST em dois pacientes foi realizado no momento do estadiamento sistêmico de câncer de mama e linfoma não Hodgkin.O tamanho médio dos GIST encontrados foi de 3,5 cm e apresentaram distribuição semelhante entre estômago e intestino delgado.

As características clínicas e patológicas dos pacientes que apresentaram neoplasias sincrônicas estão na tabela abaixo:

Tabela 5. Características clínico-patológicas dos tumores sincrônicos

Idade	Gênero	GIST		Tumores sincrônicos		
		Localização	Tamanho (cm)	Tipo	Localização	Tamanho (cm)
1. 36	F	Intestino delgado	5,0	Adenocarcinoma (T3N0M0)	Cólon	5,5
2. 52	M	Gástrico	1,1	Adeno carcinoma (T3N1M0)	Gástrico	10,2
3. 65	F	Gástrico	0,7	Adenocarcinoma (T3N1M0)	Gástrico	4,8
4. 65	F	Gástrico	1,0	Ca epidermóide (T3 N1M0)	Esôfago	5,0
5. 69	F	Intestino delgado	5,0	Adenocarcinoma (T3N0M0)	Cólon	5,8
6. 79	F	Intestino delgado	7,6	Carcinoma ductal invasor (T3N1M0)	Mama	6,2
7. 62	M	Gástrico	4,2	Linfoma Não Hodgkin tipo manto (IV)	-	-

6.2 Análise Imunoistoquímica

A reatividade para KIT ocorreu em 93 % tumores e para CD34 em 55 %. Cinquenta e um por cento evidenciaram expressão para Vimentina, 23 % para Desmina, 37 % para Proteína S-100, 48 % para Actina e 14 % para Enolase neuroespecífica.

Somente 11 % apresentaram imunoreatividade para Panqueratinas, 11 % para Sinaptofisina, 25% para Cromogranina, 20% para EGFR e 9 % foram PDGF

imunoreagentes. Dos 4 pacientes que apresentaram expressão para PDGF 3 eram KIT negativos.

O resumo dos achados imunoistoquímicos está descrito na tabela abaixo:

Tabela 6. Expressão de marcadores imunoistoquímicos

	Expressão de marcadores imunoistoquímicos					
	POS		NEG		NÃO AVALIADOS	
	Total	Percentual	Total	Percentual	Total	Percentual
KIT (43)	40	93%	3	7%		
SMA (26)	21	48%	5	11%	39	17%
DESM (34)	10	23%	24	55%	9	20%
S100 (35)	16	37%	19	44%	8	18,60%
NSE(9)	3	6,5%	6	13%	34	79%
CD34 (34)	24	55%	10	23%	9	20%
CK (22)	5	11%	17	40%	21	48,80%
VIM(23)	22	51,20%	1	2,30%	20	46,50%
PDGF(4)	4	9,30%	0		39	90,70%
SYN(14)	5	11%	9	20,90%	29	67,40%
CROMO(14)	11	25,60%	3	7%	29	67,40%
EGFR(12)	9	20%	3	7%	31	72%

POS: positivo ; NEG: negativo; SMA: actina ; DESM : desmina; S-100: proteína S-100; NSE: enolase neuro-específica; CK: citoqueratinas; VIM:vimentina ; PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas; SYN: sinaptofisina; CROMO: cromogranina; EGFR: fator de crescimento epitelial

6.3 Expressão de Survivina

Foi identificada expressão para a survivina em 72% dos tumores, nos quais a maioria das células tumorais observadas apresentavam imunoreatividade. A expressão foi detectada predominantemente no citoplasma (41,9%) e membrana celular (35,5%) e em concomitância nestas duas localizações em 22,6% das células tumorais, não sendo evidenciada nenhuma positividade nuclear.

Em adição, entre as espécimes positivas, 20,9% apresentavam baixa reatividade ao anticorpo, 23,3% apresentavam reatividade moderada e 27,9% demonstravam forte imunoreatividade ao anticorpo.

Ocorreu imunexpressão em 64,7% dos homens e 86,7% das mulheres.

Nos pacientes com idade acima de 60 anos foi observada expressão em 83,3% e em 57,9% nos pacientes com 60 anos ou menos.

Não houve diferença na proporção de expressão quanto ao sítio primário do tumor ou relacionada ao subtipo histológico.

Houve imunoreatividade em 84,6% nos tumores menores que 7,5 cm e 55% nos tumores acima de 7,5 cm.

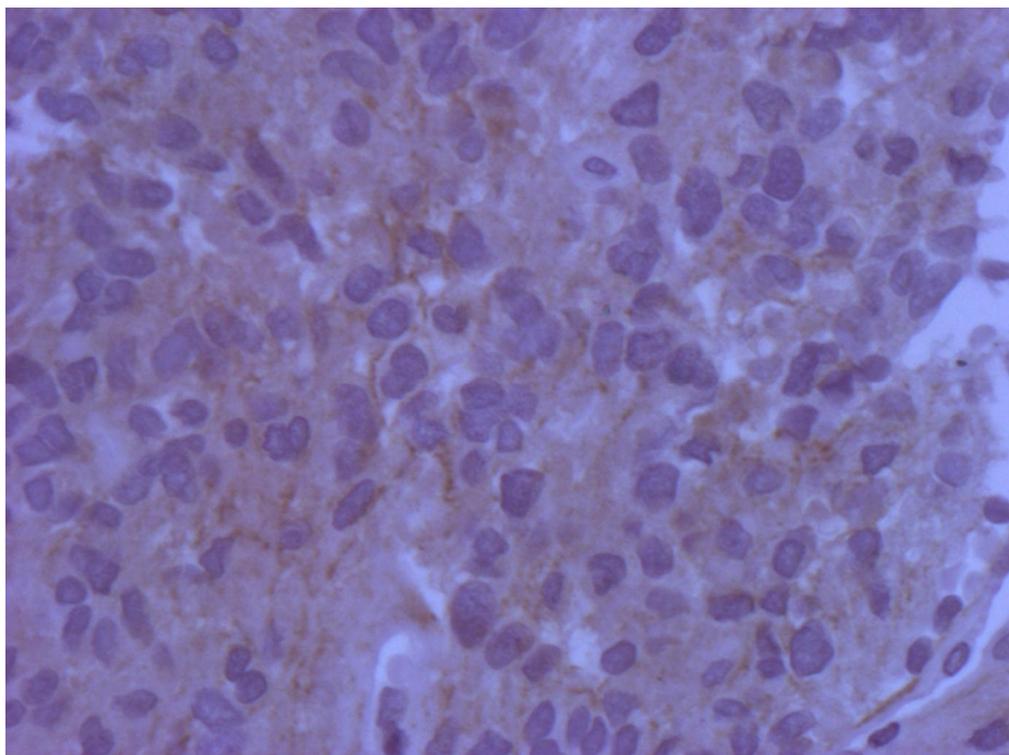


Figura 4. Expressão imunoistoquímica de Survivina

6.4 Expressão de Ki 67

O índice mitótico, avaliado através da expressão de Ki 67, foi classificado como alto em 60 % , intermediário em 16 % e baixo em 21 % das amostras, somente em 2 amostras não foi possível analisar a proliferação celular por este método.

Dentre os pacientes com altos índices proliferativos, 52% demonstraram acima de 20 mitoses por campo de grande aumento.

Houve equivalência na expressão de survivina em todas as categorias de índice mitótico (70% de positividade) com exceção da classificação de baixa proliferação, onde 100% dos pacientes foram survivina negativos.

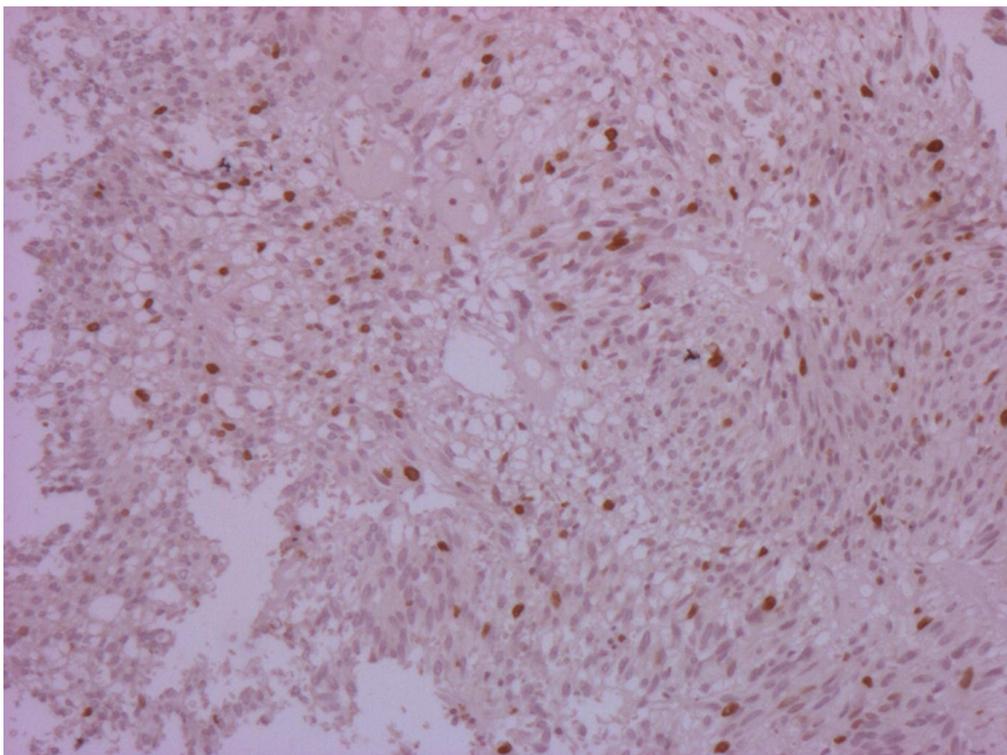


Figura 5. Expressão imunoistoquímica de Ki 67

6.5 Expressão de survivina e achados clínicos-patológicos

A expressão de survivina não foi relacionada significativamente com gênero, topografia da lesão, subtipo histológico, localização celular ou índice mitótico.

Houve indicação de associação entre a expressão de survivina e idade, porém em virtude do pequeno tamanho de amostra esta associação não atingiu significância estatística. Em relação ao tamanho tumoral a associação atingiu nível de significância.

Os resultados das associações estão expostos a seguir:

Tabela 8. Expressão de survivina e características clínico-patológicas

Variável	Categoria	Total (%)	Survivina		p
			NEG	POS	
<i>Idade</i>	< 60	19(44,2%)	42,1%	57,9%	0,06
	>60	24 (55,8%)	16,7%	83,3%	
<i>Gênero</i>	M	15 (34,9%)	13,3%	86,7%	0,11
	F	28 (65,1%)	35,7%	64,3%	
<i>Localização</i>	Gástrico	22 (51%)	27,3%	72,7%	0,86
	Delgado	15(34,9%)	33,3%	66,7%	
	Retroperitônio	3 (7%)	33,3%	66,7%	
	Cólon	2 (4,7%)	0	100%	
<i>Tamanho</i>	< 2	5(11,9%)	40%	60%	0,02
	2,1 -5	10 (23,8%)	10%	90%	
	5,1 -10	11 (26%)	9,1 %	90%	
	> 10	16 (38%)	50%	50%	
<i>Índice mitótico</i>	0-5	9 (20%)	33,3%	66,7%	0,38
	6-10	7 (16%)	29,6%	71,4%	
	> 11	26 (60%)	23,1%	76,9%	

Nos sete pacientes que apresentavam doença avançada ao diagnóstico a expressão de survivina não foi significativamente diferente dos pacientes com doença localizada. A maior parte dos pacientes (70%) com doença avançada apresentava forte imunoreatividade ao anticorpo e alto índice proliferativo (maior que 20 mitoses por campo).

No grupo de pacientes com GIST sincrônicos a outras neoplasias a expressão de survivina foi observada em 72% dos espécimes, a maioria também apresentando alta reatividade porém predominância de com índices mitóticos intermediários.

Não houve correlação significativa entre a taxa de proliferação celular e os achados clínicos e patológicos estudados. (p=0,22).

6.6 Expressão de survivina e sobrevida livre de doença em 3 anos

O tempo de acompanhamento ambulatorial dos 43 pacientes estudados variou de 5 a 111 meses.

A sobrevida global do total de pacientes estudados (incluindo pacientes com doença metastática e segundos tumores primários) foi de 27 meses, não tendo sido demonstrada diferença significativa entre os pacientes que apresentavam ou não a expressão de survivina, conforme a figura abaixo:

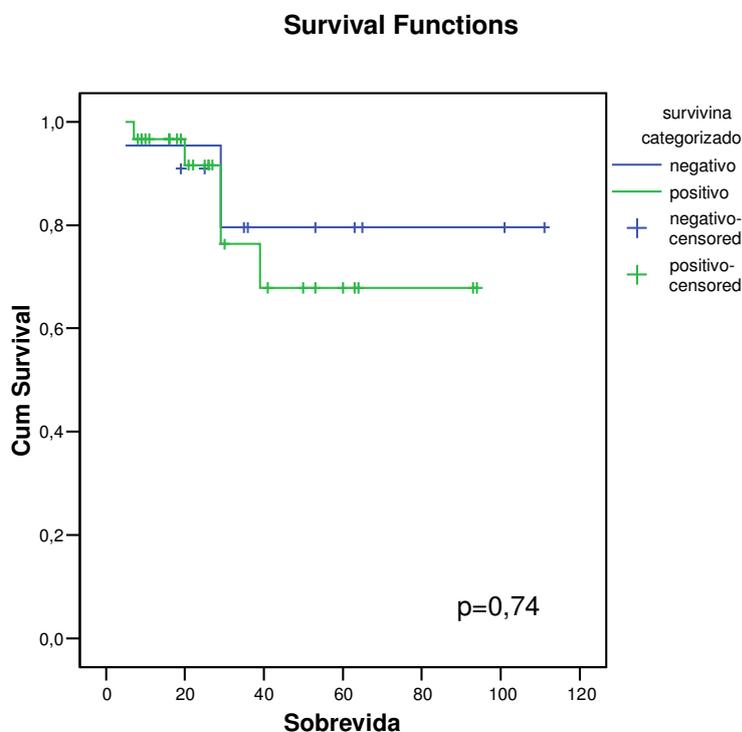


Figura 6. Expressão de Survivina e sobrevida

Excluindo-se da análise possíveis fatores de confusão (presença de segundo tumores primários , doença avançada ao diagnóstico e pacientes falecidos por outra causa) a sobrevida mediana foi de 29 meses. Neste subgrupo, não foi demonstrada diferença estatisticamente significativa em relação à expressão de survivina, conforme ilustra a figura abaixo:

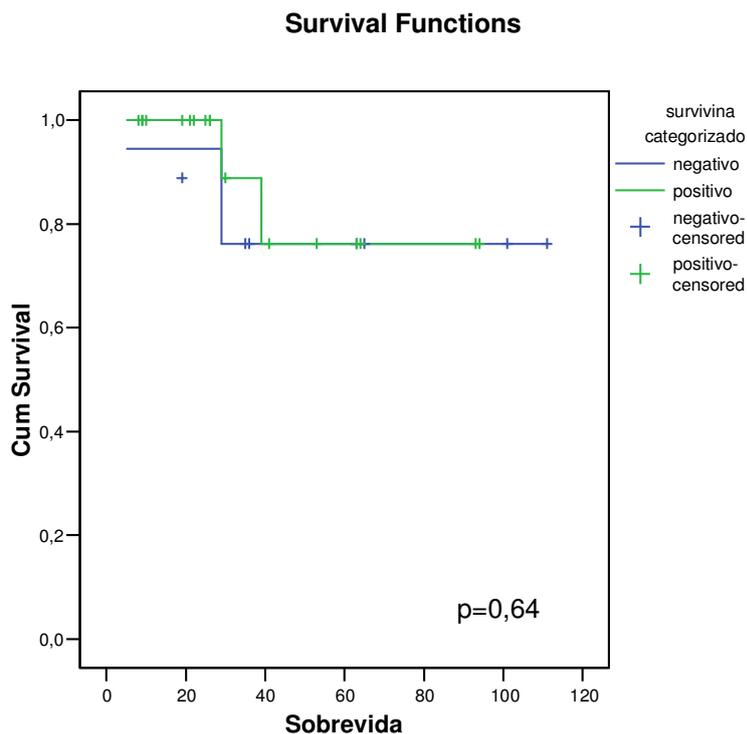


Figura 7. Expressão de survivina e sobrevida em doença localizada

Quando foi realizada análise de subgrupos, os pacientes portadores de doença metastática tiveram sobrevida mediana de 16 meses, significativamente menor em relação aos com doença localizada.

Os pacientes com segundo tumores primários apresentaram sobrevida mediana de 27 meses. Dentre este grupo de pacientes com tumores sincrônicos, quatro não apresentavam sinais de progressão da doença epitelial ou mesenquimal, um apresentava recidiva do GIST e dois haviam falecido devido à progressão da neoplasia não GIST (linfoma não Hodgkin e carcinoma epidermóide de esôfago).

O tempo mediano para recorrência para os pacientes com doença localizada foi de 11 meses, variando de 3 a 77 meses.

Os pacientes com imunoeexpressão de survivina apresentaram sobrevida mediana livre de progressão em 3 anos de 25 meses comparada a 36 meses nos pacientes com ausência da expressão do marcador. Este dado representou um acréscimo de 30% na sobrevida livre de doença, porém não atingiu significância estatística ($p=0,08$).

As curvas de tempo para progressão e chance de recorrência em relação á expressão de survivina estão demonstradas a seguir :

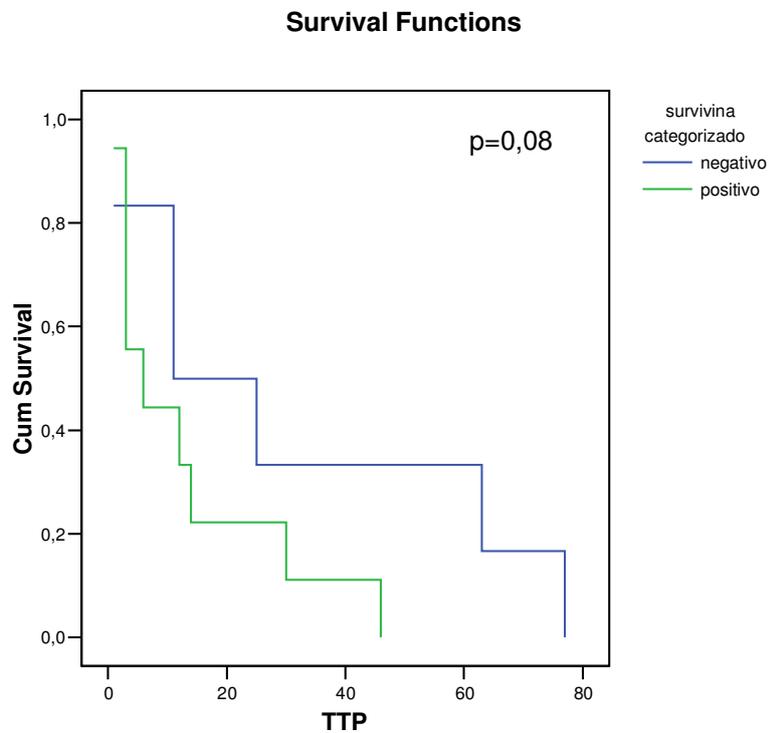


Figura 8. Expressão de survivina e sobrevida livre de progressão

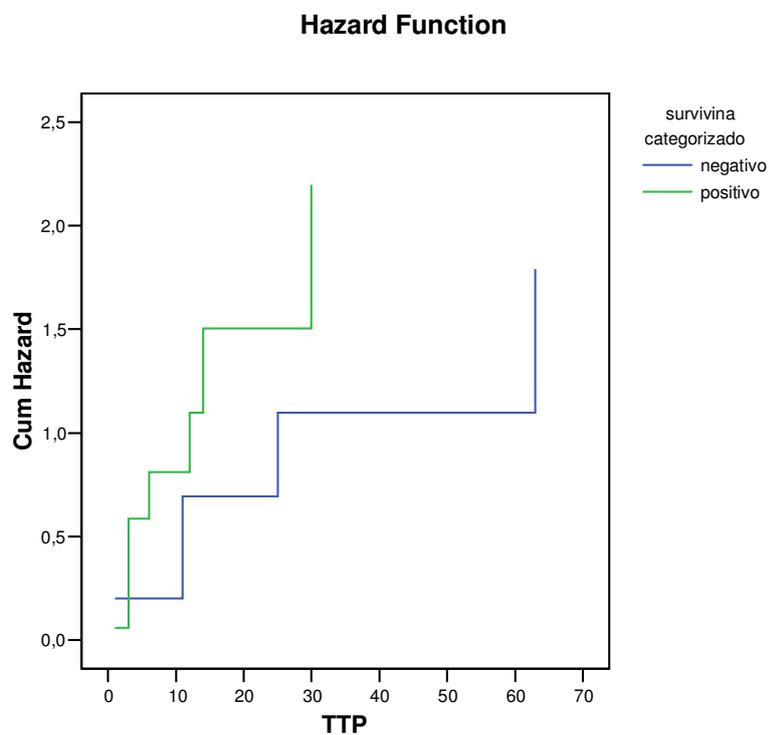


Figura 9. Expressão de survivina e chance de recidiva

Em relação ao índice mitótico, categorizado em grupos de alta, intermediária e baixa proliferação celular, não foi encontrada diferença significativa na sobrevida mediana livre de progressão em 3 anos; o grupo com alta taxa apresentou sobrevida mediana livre de progressão em 3 anos de 27 meses comparada a 30 meses nos pacientes com baixa e intermediária taxa de proliferação.

Houve uma tendência maior chance de recorrência nos pacientes com altas taxas de proliferação quando comparados aos de proliferação baixa e intermediária, entretanto a diferença entre estes dois grupos não atingiu significância estatística ($p=0,21$).

Nos pacientes do grupo com alta taxa de proliferação celular o tempo mediano para progressão foi de 3 meses, diferentemente do grupo de baixa taxa de proliferação que foi de 14 meses.

As curvas de sobrevida, tempo para progressão e chance de recorrência estão demonstradas abaixo :

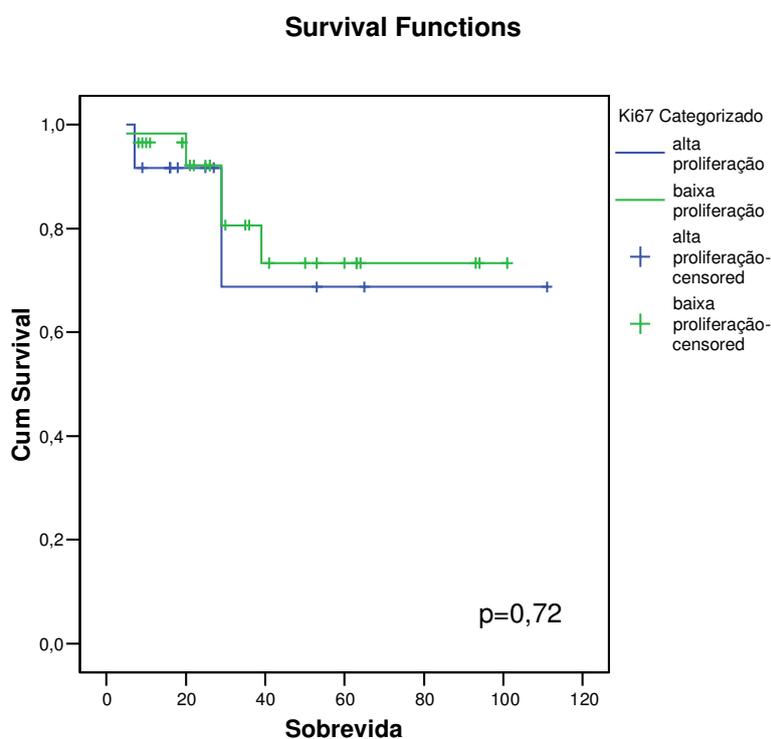


Figura 10. Expressão de KI67 e sobrevida

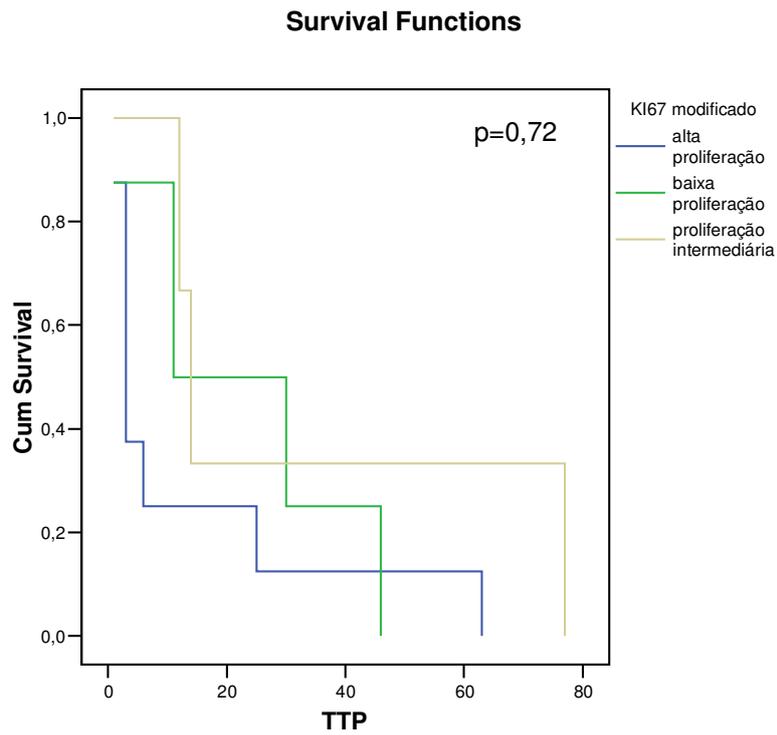


Figura 11. Expressão de Ki67 e sobrevida livre de progressão

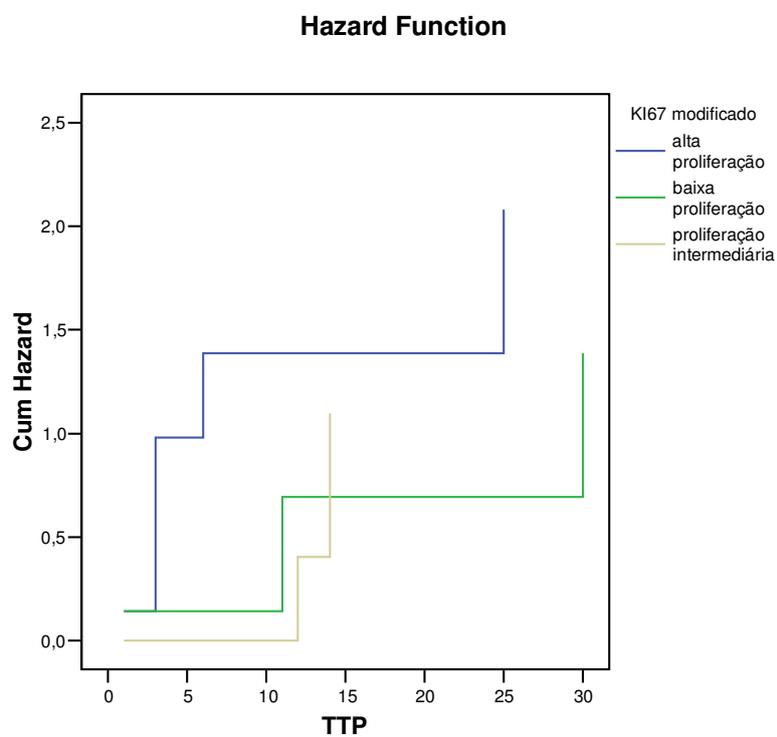


Figura 12. Expressão de Ki 67 e chance de recidiva

Ao final do estudo, em junho de 2007, havia 20 pacientes sem evidência de progressão de doença, 3 haviam falecido pela neoplasia, 5 haviam falecido por causa não neoplásica, e 15 estavam vivos com doença.

Dos 15 pacientes que apresentaram recidiva, 5 foram negativos para expressão de survivina e 10 foram positivos. O tempo para recorrência entre os pacientes que não demonstravam a expressão foi de 25 meses, enquanto que para os que apresentavam a expressão de survivina foi de 11 meses.

Todos os pacientes que apresentaram recidiva ou com apresentação metastática ao diagnóstico foram submetidos a tratamento com imatinib na dose de 400 mg diários, tendo apresentado boa tolerância ao tratamento e perfil de toxicidade aceitável. Nenhum paciente apresentou toxicidade que requeresse suspensão do imatinib.

A resposta ao tratamento medicamentoso foi avaliada através de revisão ambulatorial mensal com anamnese, exame físico e utilizando-se tomografia computadorizada contrastada de abdômen a cada 4 meses de tratamento.

No momento da análise, em junho de 2007, dos pacientes que estavam em uso de imatinib (incluindo os com doença avançada ao diagnóstico e os com recidiva da doença) 12 ainda estavam vivos, 3 apresentavam resposta radiológica completa, 3 resposta parcial, 4 com doença estável e 2 apresentavam progressão de doença. Dos pacientes que já se apresentaram doença avançada ao diagnóstico, somente um havia falecido devido a progressão da neoplasia, os demais apresentavam sobrevida mediana de 26 meses.

7. DISCUSSÃO

Os GIST, embora raros, constituem um importante grupo de tumores gastrointestinais. Por muitos anos foram inadequadamente classificados como leiomiomas, leiomioblastomas e leiomiossarcomas, baseando-se somente em achados histopatológicos.

A análise imunoistoquímica em conjunto com a microscopia eletrônica no início dos anos 70 subseqüentemente evidenciou achados mio gênicos ou neurais que identificaram os GIST como uma entidade patológica distinta.(71).

Entretanto, os GIST não apresentam uniformidade no seu comportamento biológico; este depende fundamentalmente de parâmetros clínico-patológicos clássicos (topografia anatômica, tamanho tumoral e atividade mitótica) e características moleculares (tipo de mutação do receptor de TK, alterações cromossômicas, expressão de proteínas do ciclo celular, ativação e controle de vias de sinalização intracelulares, amplificação ou perda de genes) (53)

Além disto, foi encontrada relação entre algumas características patológicas e alterações moleculares(por ex.: GIST de intestino delgado são associados com morfologia epitelíode e mutação no exon 9 do *KIT*).Este achado reforça a necessidade da combinação de critérios patológicos a achados moleculares visando otimizar o entendimento de sua história natural e identificação de fatores prognósticos.

Anormalidades na expressão gênica são a base de muitos processos fisiológicos e patológicos, tais como diferenciação celular, transformação maligna e controle da morte celular programada(21).A apoptose exerce um papel importante na gênese tumoral de neoplasias epiteliais, contudo, até o momento foi pouco estudada nos sarcomas intestinais.

Survivina pertence à família das proteínas inibidoras da apoptose e está envolvida neste processo através da inibição da atividade das caspases e indução da mitose.É proeminentemente expressa durante a embriogênese e em linhagens de células com altas taxas de proliferação, indetectável na maioria dos tecidos diferenciados e abundantemente re-expressa em várias malignidades.

Na maioria das neoplasias investigadas para a expressão de survivina (incluindo câncer de mama, pulmão, gástrico, bexiga, pâncreas, sarcomas de partes moles) a alta

expressão desta proteína foi preditiva de progressão tumoral, em termos de sobrevida livre de doença e sobrevida global, identificando informações prognósticas relevantes (3).

No presente estudo a prevalência da expressão de survivina foi analisada pela primeira vez em GIST, mediante técnica de imunistoquímica, e foi correlacionada com evolução clínica. Adicionalmente foi feita descrição do perfil clínico e epidemiológico dos pacientes portadores de GIST diagnosticados ou referenciados a hospital terciário.

A mediana de idade dos pacientes no presente estudo, 62 anos, foi similar ao relatado na literatura (55-65 anos). Os GIST são raros em crianças e adultos jovens com apenas 60 casos relatados na literatura. Neste estudo, não se observou GIST antes dos 18 anos de idade, nenhum dos pacientes tinha história familiar de GIST ou de outra neoplasia e nenhum apresentava tríade de Carney's.

Ocorreu predominância do gênero feminino (65%), discordante com outros centros, pois a literatura relata equilíbrio entre os gêneros, às vezes com predominância masculina.

Os GIST podem se originar em qualquer topografia do TGI ; do esôfago ao reto. Na presente análise, GIST foram mais usualmente encontrados no estômago, seguido de intestino delgado e com frequência semelhante no intestino grosso e retroperitônio; estes achados foram similares ao relatados na literatura.

Os GIST geralmente são diagnosticados como tumores circunscritos, encapsulados, de aparência nodular, podendo atingir grandes volumes. A multiplicidade é um achado pouco usual. Nesta análise, o tamanho tumoral mediano foi de 7,4cm, alcançando até 30 cm e não foi observado nenhum tumor multicêntrico.

A média de ocorrência de tumores sincrônicos com GIST é descrita em torno de 13% na literatura.(45) No presente estudo a prevalência encontrada de segundos tumores primários foi 16%. Os tumores mais frequentemente identificados, em concordância com estudos precedentes, foram adenocarcinomas do TGI; dois pacientes apresentaram linfoma não Hodgkin e câncer de mama.

A maior parte dos pacientes com tumores sincrônicos era assintomática em relação ao GIST, os quais foram descobertos incidentalmente durante procedimentos cirúrgicos destinados ao tratamento de outras neoplasias. A sobrevida mediana deste grupo não foi diferente do restante da amostra, sendo que dois pacientes evoluíram ao óbito em função das outras neoplasias diagnosticadas em estágio avançado e reconhecidamente com pior

prognóstico (carcinoma epidermóide de esôfago em estágio clínico III e linfoma não Hodgkin em estágio clínico IV).

A grande maioria dos GIST é associada com mutações do *KIT*; vários estudos identificaram a presença destas mutações em outras neoplasias, incluindo tumores germinativos, carcinoma de pequenas células de pulmão, melanoma, câncer de mama, cólon e ovário. Entretanto na maioria destes tumores o papel do *KIT* mutado não foi completamente esclarecido, embora tenha sido relatado que atividade TK induziria proliferação celular e transformação maligna em carcinoma de pequenas células de pulmão, câncer de mama e ovário.(133)

Dois pacientes apresentaram tumores de cólon concomitantes com GIST; e embora as principais vias envolvidas na carcinogênese do câncer colorretal não tenham sido identificadas em associação com o desenvolvimento dos GIST, vários estudos demonstraram a expressão de *KIT* em tumores de cólon. Por exemplo, Sanmarco e cols. relataram expressão de *KIT* em acima de 30% em espécimes de câncer colorretal .(133)

Ainda que a ocorrência sincrônica de GIST e outra neoplasia abdominal possa ser apenas um fenômeno coincidente, o desenvolvimento destes tumores pode envolver agentes carcinogênicos comuns. Estudo coordenado por Cohen demonstrou que a exposição simultânea de nitrosoguanidina e ácido acetilsalicílico causa o desenvolvimento sincrônico de câncer gástrico e leiomiossarcoma.(134)

Os subtipos histológicos fusiforme, epitelióide e misto foram encontrados em proporções semelhantes, em discordância da literatura, onde 70% dos GIST apresentam características fusiformes. A maior identificação de tumores epitelióides e mistos poderia ser explicada por um viés proveniente do pequeno número de casos recrutados neste estudo. Todavia, é necessário que este dado seja verificado mais detalhadamente na seqüência de casos que se apresentarem futuramente no nosso registro de GIST. A predominância inesperada de um determinado tipo histológico poderia sinalizar a presença de um “cluster” hereditário ou de uma maior prevalência de variante genética rara (p. ex. maior freqüência de alelos ou polimorfismos nesta população). É possível também que a exposição a agente carcinogênico incomum possa predispor a um tipo específico de variante histológica de GIST. Qualquer uma destas hipóteses, se confirmadas, seria de extrema utilidade na investigação da etiologia e dos eventos iniciais na carcinogênese de GIST.

As características imunoistoquímicas de Ki 67 e survivina foram analisadas utilizando-se técnica de micro-arranjo tecidual.

O arranjo em matriz de amostras teciduais ou TMA(tissue microarray) é uma técnica descrita em 1998 e consiste na elaboração de um bloco de parafina contendo fragmentos de amostras teciduais obtidas de dezenas ou centenas de blocos de parafina convencionais, seguindo uma ordem pré-determinada. No nosso estudo, optamos pela técnica de TMA, sempre que possível, baseando-se na praticidade de se avaliar um grande número de amostras simultaneamente, na redução de custos e na diminuição da variabilidade inter-espécimes e inter-observador.(132)

As demais análises de imunoexpressão foram realizadas utilizando-se metodologias convencionais de imunoistoquímica. Em função do nosso estudo se tratar de uma avaliação retrospectiva, a análise com marcadores convencionais já havia sido realizada com intuito diagnóstico; os marcadores adicionais (p. ex. EGFR) foram acrescentados em um painel imunoistoquímico de investigação de um grupo de estudos de GIST do HSL-PUCRS. Preferencialmente, a análise de todos marcadores deveria ter sido feita seguindo a mesma sistemática de análise imunoistoquímica, de maneira prospectiva, e por observadores independentes na tentativa de se minimizar possíveis fatores de confusão.

Os achados imunoistoquímicos referentes à expressão de CD34, SMA, e CK foram semelhantes aos habitualmente descritos em GIST, entretanto houve expressão aumentada de Desmina e S-100. Estas características podem ser explicadas, em parte, pela metodologia da técnica de imunoistoquímica utilizada(p.ex. diferenças na fixação do material ou reagentes) ou pela interpretação das lâminas.

Em relação à expressão de CD 34 é importante salientar que, ao se realizar análise deste subgrupo, foi constatada concomitância da expressão de survivina em relação a este marcador, ou seja, todos os pacientes survivina-positivos também apresentavam imunoreatividade para CD 34. Uma das possíveis razões para este achado está baseado no fato que o efeito anti-apoptótico da survivina pode não estar apenas confinado às células tumorais, mas pode igualmente estar manifesto em células endoteliais, potencialmente induzindo neoformação vascular.(125) No intuito de se estabelecer uma relação mais consistente entre estas variáveis, estudos futuros avaliando o papel da angiogênese e expressão de survivina serão desenvolvidos nesta amostra.

Altos índices mitóticos avaliados pela expressão de Ki 67 (acima de 10 mitoses por CGA) foram os mais habitualmente observados nesta amostra ; identificando maior agressividade biológica tumoral e alta probabilidade de recidiva. Este achado pode refletir a presença tumores volumosos; no entanto, como os dados foram coletados em hospital terciário pode haver um vício de seleção de amostra, com análise de casos mais complexos.

No atual estudo, a prevalência da expressão de survivina foi observada em 72 % dos espécimes tumorais. A alta frequência desta expressão é semelhante à encontrada em estudos anteriores em tumores epiteliais e mesenquimais.(1,8,13,14,18,19,20,21,23,24,120,121,122,123,124,125,126).

A frequência extremamente elevada de expressão de survivina não é surpreendente, visto que, em outros tumores humanos, survivina está habitualmente expressa. É intrigante, todavia, que um em cada quatro pacientes com GIST não expressa survivina. Estes pacientes não apresentaram tumores com diferenças clínicas ou biológicas em relação aos que expressavam survivina. As razões para que certos GIST possam prescindir da hiperexpressão de survivina pode ter várias explicações, tais como, a ativação de subtipos de survivina (por transcrição anômala, por mutações, etc.) que não são detectados pelos anticorpos utilizados, por ativação de intermediários a montante da via da survivina, ou ainda pela utilização de vias completamente distintas de sobrevivência celular, independentes de survivina.

Houve predominância da expressão no citoplasma e membrana celular, e nenhuma imunoreatividade nuclear foi observada , em concordância com análises imunoistoquímicas precedentes. Não houve expressão em células do epitélio normal adjacente.

Survivina é normalmente expressa no núcleo, em células embriônicas ou pluripotentes normais. A expressão em topografia anômala, como vista no nosso estudo, poderia ser explicada por alterações na estrutura da proteína, seja por mutação, seja por alteração pós-tradução, que extravasaria o compartimento nuclear, indo-se alojar em outros sítios, aos moldes do que ocorre com a proteína p53. Outra possibilidade seria a de que inibidores naturais de survivina localizados no citoplasma estivessem desativados. De fato, alterações em sistemas de ubiquinização são comuns em câncer e podem explicar a presença aberrante de diversas proteínas.

Uma observação muito controversa, é a de que a localização subcelular de survivina é dependente da linhagem tecidual podendo ter correlação com o prognóstico; enquanto a localização citoplasmática, responsável pela inativação direta das enzimas efetoras da

apoptose estaria associada com piora do prognóstico em algumas neoplasias, (p. ex. em tumores gástricos, mama ,pulmão,cólon) a expressão da survivina no núcleo, com prováveis diferentes funções proteicas, pareceria afetar positivamente o prognóstico nestas mesmas neoplasias.(3) Na medida em que nenhum caso do nosso estudo produziu reação positiva nuclear, acreditamos que, pelo menos em GIST, a localização subcelular é tecido-dependente e parece ser importante para a biologia do tumor, visto ser um fenômeno observado na vasta maioria dos casos.

Houve uma tendência em favor de a expressão ser mais observada em pacientes idosos (acima de 60 anos). Estes achados provavelmente não atingiram nível de significância devido ao pequeno número da amostra, entretanto são semelhantes aos relatados por Endo e cols. em que a expressividade survivina foi consistentemente aumentada em pacientes portadores de câncer colorretal acima de 70 anos.(127)Este resultado poderia estar relacionado ao fato de que indivíduos mais idosos pudessem apresentar maior chance de mutações que regulam a expressão de survivina resultando em inibição da apoptose através da desregulação da homeostase, reconhecidamente afetada na idade avançada. Outra hipótese seria a de que a expressão mais elevada em idosos poderia acenar para um padrão mais indolente de doença, sendo que doenças muito agressivas que afetassem indivíduos mais jovens teriam desfechos mais rápidos.

Algumas observações sobre variáveis clínicas da nossa população foram muito interessantes.A expressão de survivina em tumores metastáticos não foi diferente à encontrada em tumores localizados, bem como não houve diferença na expressão em pacientes portadores de GIST e outras neoplasias sincrônicas.Além disso, a imunoexpressão de survivina foi correlacionada significativamente com tamanho tumoral, e foi mais evidente em tumores menores que 7,5 cm.No entanto, é extremamente relevante a observação que a expressão de survivina também ocorre em tumores iniciais (menores que 2 cm).Tomados em conjuntos estes dados poderiam indicar que a inibição da apoptose mediado pela survivina , assim com a expressão de KIT , deve ser um achado precoce na tumorigênese dos GIST e não uma anormalidade adicional à desdiferenciação e progressão do tumor.Esta observação é muito relevante pois sugere que a survivina pode constituir-se em alvo terapêutico importante no tratamento de GIST.

Entre os pacientes KIT negativos e PDGF positivos a expressão de survivina foi menor proporcionalmente em relação à amostra KIT positiva.Embora a proporção destes

pacientes seja muito pequena no nosso estudo, este achado de menor imunopositividade para survivina e conseqüente menor inibição da via apoptótica poderia estar relacionado com comportamento menos agressivo dos tumores com expressão de PDGF.(50)

No nosso estudo não houve relação entre a expressão de survivina e sobrevida global da totalidade da população estudada, entretanto, pacientes com imunopositividade apresentavam sobrevida mediana de 25 meses em contraste com os 36 meses entre os que não apresentavam a expressão (ganho de sobrevida de 30%).Em análise do subgrupo dos pacientes com doença inicial ao diagnóstico e expressão de survivina houve menor tempo para recorrência, de 11 meses; enquanto que pacientes survivina-negativos apresentaram tempo maior para recorrência, de 25 meses.Esta diferença entre os grupos não atingiu nível de significância ($p=0,08$).

A identificação da expressão de survivina como fator de prognóstico, contribuindo para aumento da agressividade do tumor e maior potencial para disseminação sistêmica já havia sido relatada anteriormente na literatura (1,8,13,14).

Existe uma forte tendência que indica que a expressão de survivina possa ser relacionada com a sobrevida.É interessante ressaltar que como apenas 28% dos pacientes não expressaram survivina, a casuística deveria ser consideravelmente maior para que a diferença estatística pudesse ser atingida.No entanto, se consideraria fortemente a possibilidade de avaliar a expressão por método quantitativo na tentativa de se observar se níveis variáveis de expressão poderiam ser correlacionados a diferentes expectativas de sobrevida.

Um dos achados mais significantes da survivina é sua distribuição diferencial em células malignas comparada com tecidos normais; uma vez que survivina não é identificada em tecidos sadios, encontra-se hiper-expressa nas neoplasias e envolvida em processos determinantes da progressão tumoral tem sido investigada como alvo potencial para a terapia anti-neoplásica; p. ex., um dos mecanismos de ação da quimioterapia convencional é a indução de apoptose através da participação das caspases, sendo assim, atuações terapêuticas neste alvo poderia aumentar a sensibilidade à quimioterapia.(10)

Foi recentemente demonstrado que a supressão de survivina utilizando oligonucleotídeos anti-senso induz apoptoses in vivo e in vitro, representando uma alternativa no manejo de tumores que expressam esta característica.(10,20)

Em conclusão, este estudo identificou a presença citoplasmática de survivina em grande maioria dos casos de GIST analisados. A prevalência da expressão de survivina observadas nestes tecidos foi semelhante à descrita em estudos prévios em neoplasias de outras linhagens.

Survivina foi igualmente expressa em tumores iniciais e em tumores em estágio avançado, sugerindo que este achado represente um evento precoce na tumorigênese dos GIST.

A expressão de survivina não foi associada às demais características clínico-patológicas (idade, gênero, localização tumoral, subtipo histológico e índice mitótico)

Embora os níveis estatísticos de significância não tenham sido atingidos, parece haver uma tendência em favor da expressão de survivina relacionada à diminuição da sobrevida livre de progressão nestes pacientes, identificando esta proteína como um potencial marcador de prognóstico, sendo necessários estudos adicionais, com desenho prospectivo e acompanhamento de desfecho, além de análises de sobrevida a longo prazo .

8.CONCLUSÕES

- 1) Setenta e dois por cento dos espécimes de GIST expressaram survivina enquanto esta expressão não foi observada em células normais;
- 2) Não houve associação entre a expressão de survivina e as características clínico-patológicas na amostra estudada;
- 3) Houve tendência de associação entre a expressão de survivina e sobrevida livre de doença.

9 REFERÊNCIAS

1. Sarela A, Macadam R, Farmery S, Markham A, Guillou P. Expression of the antiapoptosis gene, Survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma. *Gut* 2000;46:645-50
2. Gianani R, Jarboe E, Orlicky D, Frost M, Bobak J, Lehner R. Expression of Survivin in normal, hyperplastic, and neoplastic colonic mucosa. *Human Pathology* 2001; 32(1):119-25
3. Zaffaroni N, Daidone M. Survivin expression and resistance to anticancer treatments: perspectives for new therapeutic interventions. *Drug Resistance Updates* 2001;5 : 65-72
4. Marsoni S, Damia G. Molecular targeting: new therapeutic strategies to improve tumour apoptosis. *Annals of Oncology* 2004 ; 15 : 229-31
5. Kim R, Tanabe K, Uchida Y, Emi M, Inoue H, Toge T. Current status of the molecular mechanisms of anticancer drug-induced apoptosis. *Cancer Chemotherapeutic Pharmacology* 2002 ; 50 : 343-52
6. Li F. Role of survivin and its splice variants in tumorigenesis. *British Journal of Cancer* 2005 ; 92: 212-16.
7. Hilska M, Collan Y, Laine V, Kössi J, Hirsimäki P, Laato M. The significance of tumor markers for proliferation and apoptosis in predicting survival in colorectal cancer. *Disease Colon Rectum* 2005 ; 48: 2197-2208
8. Lin L, Zheng C, Jin Y, Ma Y, Jiang W, Ma T. Expression of surviving protein in human colorectal carcinogenesis. *World Journal Gastroenterology* 2003;9: 974-977.
9. Meng H, Lu C, Sun Y, Dai D, Lee S, Tanigawa N. Expression level of wild-type survivin in gastric cancer is an independent predictor of survival. *World Journal of Gastroenterology* 2004;10(22): 3245-50.
10. Li Y, Wang C, Meng K, Chen L, Zhou X. Influence of survivin and caspase-3 on cell apoptosis and prognosis in gastric carcinoma. *World Journal of Gastroenterology* 2004;10(13): 1984-88.
11. Meng H, Lu C, Mabuchi H, Taniawa N. Prognostic significance and different properties of survivin splicing variants in gastric cancer. *Cancer Letters* 2006 ; 216:147-55.
12. Sarela A, Verbeke C, Ramsdale J, Davies C, Markham A, Guillou P. Expression of survivin, a novel inhibitor of apoptosis and cell cycle regulatory protein, in pancreatic adenocarcinoma. *British Journal of Cancer* 2002; 86:886-92.
13. Qiao J, Zhang Y, Yin Y, Tan Z. Expression of Survivin in pancreatic cancer and its correlation to expression of Bcl-2. *World Journal of Gastroenterology* 2004;10(18): 2759-61.

14. Kami K, Doi R, Koizumi M, Toyoda E, Tomohiko M, Daisuke I. Survivin expression is a prognostic marker in pancreatic cancer patients. *Surgery* 2004 ;136(2) :443-8.
15. Rodel F, Hoffmann J, Distel L, Herrmann M, Noisternig T, Papadopoulos T. Survivin as a radioresistance factor , and prognostic and therapeutic target for radiotherapy in rectal cancer. *Cancer Research* 2005 ;65(11) : 4881-7.
16. Knutsen A, Gunnar A, Sun X. Survivin expression is a independent prognostic factor in rectal cancer patients with and without preoperative radiotherapy. *International Journal Oncology Biology Physics* 2004 ; 60 (1) : 149-55
17. Rödel F, Hoffmann J, Grabenbauer G, Papadopoulos T ,WeiB C, Günther K. High surviving expression is associated with reduced apoptosis in rectal cancer and may predict disease- free survival after preoperative radiochemotherapy and surgical resection. *Strahlenther Onkologie* 2002;178:426-35
18. Oshita F, Ito H, Ikehara M, Ohgane N, Hamanaka N, Nakayama H. Prognostic impact of survivin, cyclinD1, integrin B1, and VEGF in patients with small adenocarcinoma of stage I lung cancer. *American Journal of Clinical Oncology* 2004;27:425-2.
19. Lu B, Gonzalez A, Massion P, Shyr Y, Shaktour B, Carbone D. Nuclear survivin as a biomarker for non-small-cell lung cancer. *British Journal of Cancer* 2004 ;91: 537-40.
20. Vischioni B, Valk P, Span S, Krut A, Rodriguez J, Giaccone G. Nuclear localization of survivin is a positive prognostic factor for survival in advanced non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology* 2004;15: 1654-60.
21. Monzó M, Rosell R, Felip E, Astudillo J, Sánchez J, Maestre J. A novel antiapoptotic gene: re-expression of survivin messenger RNA as a prognostic marker in non-small-cell lung cancers. *Journal of Clinical Oncology* 1999 ;17 (7):2100-04.
22. Yagihashi A, Asanuma K, Kobayashi D, Tsuji N, Shijubo Y, Abe S. Detection of autoantibodies to livin and survivin in sera from lung cancer patients. *Lung Cancer* 2005 ; 48 :217- 221.
23. Ikehara M, Oshita F, Kameda Y, Ito H, Ohgane N, Suzuki R. Expression of survivin correlated with vessel invasion is a marker of poor prognosis in small adenocarcinoma of the lung. *Oncology Reports* 2002; 9 : 835-38.
24. Hofmann H, Simm A, Hammer A, Silber R, Bartling B. Expression of inhibitors of apoptosis (IAP) proteins in non-small-cell human lung cancer. *Journal of Cancer Research Clinical Oncology* 2002 ; 128 :554-60.
25. Park H, Lee E, Lee S. Expression of survivin , a novel inhibitor of apoptosis , in superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* 2004 ; 22:265-74.
26. Aparicio T , Boigea V, Sabourinb J, Crennc P , Ducreuxa M, Le Cesnea A. Prognostic factors after surgery of primary resectable gastrointestinal stromal tumours. *European Journal of Surgical Oncology* 2004; 30:1098–1103.

27. Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors – definition, clinical, histological, immunohistochemical, and molecular genetic features and differential diagnosis. *Virchows Archiv* 2001 ;438:1-12.
28. Uptodate. Disponível em: < <http://www.uptodate.com>>. Acesso em 20 de maio de 2007.
29. Demetri G. Gastrointestinal Stromal Tumors. In: DeVita, Hellman, Rosenberg. *Cancer Principles and Practice*. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. Cap 29 section 7, p. 1050-1059.
30. Hinz S, Pauser U, Egberts J, Schafmayer C, Tepel J, Fändrich S. Audit of a series of 40 gastrointestinal stromal tumour cases. *European Journal of Surgical Oncology* 2006 ;32 :1125-29.
31. Sugar I, Forgacs B, Istvan, Bogнар G, Sapy Z, Ondrejka P. Gastrointestinal stromal tumors (GIST). *Hepatogastroenterology* 2005 ; 52 (62) : 409- 13.
32. Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors- definition, clinical, histological, immunohistochemical , and molecular genetic features and differential diagnosis. *Virchows Archiv* 2001;438:1-12.
33. Blanke C, Eisenberg B, Heinrich, M. Epidemiology of GIST. *American Journal of Gastroenterology* 2005 ;100 : 166.
34. Tran T, Davila J, El-Serag H. The epidemiology of malignant gastrointestinal stromal tumors : an analysis of 1458 cases from 1992 to 2000. *American Journal of Gastroenterology* 2005 ; 100 : 162-8.
35. Perez E, Livingstone A, Franceschi D, Rocha-Lima C, Lee D, Hodgson N. Current incidence and outcomes of gastrointestinal mesenchymal tumors including gastrointestinal stromal tumors. *Journal of the American College of Surgeons* 2006 ; 202 (4) : 623-9.
36. Nilsson B, Bumming P, Mets – Kindblom J. Gastrointestinal stromal tumors: the incidence , prevalence, clinical course , and prognostication in the preimatinib mesylate era- a populational-based study in western Sweden. *Cancer* 2005; 103: 821-29.
37. Goettsch W, Bos S, Postma N, Casaparie M, Herings R, Hogendoorn P. Incidence of gastrointestinal stromal tumours is underestimated results of a nation-wide study. *European Journal of Cancer* 2005;41:2868-72.
38. INCA. Disponível em < [http:// www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br)>. Acesso em 22/04/07.
39. Zwan S, DeMatteo R. Gastrointestinal stromal tumor: 5 years later. *Cancer* 2005 ;104,9 : 1781-8
40. Miettinen M, Makhlof H, Sobin L, Lasota J. 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. *American Journal of Surgical Pathology* 2006 ; 30 : 477-89

41. Diment J, Tamborini E, Casali P, Gronchi A, Carney A, Colecchia M. Carney triad: case report and molecular analysis of gastric tumor. *Human Pathology* 2005; 36, 112–116
42. DeMatteo R, Lewis J, Leug D, Mudan S, Woodruff J, Brennan M. Two hundred gastrointestinal stromal tumors: recurrence patterns and prognostic factors for survival. *Annals of Surgery* 2000 ; 231: 51-58.
43. Miettinen M, Sobin L, Lasota J. Gastrointestinal Stromal Tumors of the Stomach A Clinicopathologic, Immunohistochemical, and Molecular Genetic Study of 1765 Cases With Long-term Follow-up. *American Journal of Surgical Pathology* 2005 ; 29(1) :52-68
44. Wronski M, Ziarkiewicz-Wroblewska B, Gornicka B, Cebulski W, Slodkowski M, Wasiutynski A. Synchronous occurrence of gastrointestinal stromal tumors and other primary gastrointestinal neoplasms. *World Journal of Gastroenterology* 2006 ; 12(33): 5360-5362
45. Orosz Z, Tornoczky T, Sapi Z. Gastrointestinal stromal tumors: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 136 cases. *Pathology Oncology Research*. 2005;11(1):11-21.
46. Kawanowa K, Sakuma Y, Sakurai S, Hishima T, Iwasaki Y, Saito K. High incidence of microscopic gastrointestinal stromal tumors in the stomach. *Human Pathology* 2006 ;37: 1527-1535
47. Alvarado-Cabrero I, Vázquez G, Santiesteban F, Hernández-Hernández D, Pompa A. Clinicopathologic study of 275 cases of gastrointestinal stromal tumors: the experience at 3 large medical centers in Mexico. *Annals of Diagnostic Pathology* 2007 ;11: 39– 45.
48. Hassan I, Nancy Y, Dozois E, Shayyan R, Smyrk T, Okuno S. Clinical, Pathologic, and Immunohistochemical Characteristics of Gastrointestinal Stromal Tumors of the Colon and Rectum: Implications for Surgical Management and Adjuvant Therapies. *Disease of the Colon and Rectum* 2006; 49: 609–615
49. Kang D, Park C, Choi J, Jin S, Kim H, Joo J. Multiple Gastrointestinal Stromal Tumors: Clinicopathologic and Genetic Analysis of 12 Patients. *American Journal of Surgical Pathology* 2007 ;2 (31): 156-58
50. Rubin B, Heinrich M, Corless C. Gastrointestinal stromal tumor. *Lancet* 2007 ; 369: 1731-41.
51. Li F, Fletcher J, Heinrich M, Garber J, Stephen S, Curiel-Lewandrowski C. Familial Gastrointestinal Stromal Tumor Syndrome: Phenotypic and Molecular Features in a Kindred. *Journal of Clinical Oncology* 2005 ;12 (23) : 2735-43
52. Bono P, Krause A, von Mehren M, Heinrich M, Blanke C, Dimitrijevic S. Serum KIT and KIT ligand levels in patients with gastrointestinal stromal tumors treated with imatinib. *Blood* 2004 ; 103(8): 2929-35.

53. Tornillo L, Terracciano L. An update on molecular genetics of gastrointestinal stromal Tumours. *Journal of Clinical Pathology* 2006;59:557–63.
54. Blanke, C. Proceedings of ASCO GI 2006 ; Abstract número 7
55. Logrono R, Bahnot P, Chaya C, Cao L, Waxman I, Bhutani M. Imaging, Morphologic , and Immunohistochemical Correlation in Gastrointestinal Stromal Tumors. *Cancer Cytopathology* 2006 ; 108 (4) 257-66
56. Fletcher C, Berman J, Corless C. Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: a consensus approach. *Human Pathology* 2002; 33: 459-65.
57. Miettinen M, Makhlof H, Sobin L, Lasota J, MD. 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. *American Journal of Surgical Pathology* 2006 ; 30(4) :477 –89
58. Rossi G, Sartori G, Valli R, Bertolini F, Bigiani N, Schirosi L, The value of c-kit mutational analysis in a cytokeratin positive gastrointestinal stromal tumour. *Journal of Clinical Pathology*. 2005 ;58(9):991-3.
59. Crosby JA, Catton CN, Davis A, et al. Malignant gastrointestinal stromal tumors of the small intestine: a review of 50 cases from a prospective database. *Annals of Surgical Oncology* 2001; 8:50–59.
60. Singer S, Rubin BP, Lux ML, et al. Prognostic value of KIT mutation type, mitotic activity, and histologic subtype in gastrointestinal stromal tumors. *Journal of Clinical Oncology* 2002; 20:3898–3905.
61. Martin J, Poveda A, Llombart-Bosch A, et al. Deletions affecting codons 557–558 of the c-KIT gene indicate a poor prognosis in patients with completely resected gastrointestinal stromal tumors: a study by the Spanish Group for Sarcoma Research (GEIS). *Journal of Clinical Oncology* 2005; 23:6190–98.
62. Corless CL, Fletcher JA, Heinrich MC. Biology of gastrointestinal stromal tumors. *Journal of Clinical Oncology* 2004; 22:3813–3825.
63. Shenaan K, Sabah M, Cummins R , O’Grady A, Murray F, Leader M. Cyclooxygenase-2 Expression in Stromal Tumors of the Gastrointestinal Tract. *Human Pathology* 2003 ; 349 (12) : 1242-46
64. Stewart A, Heslin M,, Arch J, Jhala N, Ragland B, Gomez F. Cyclooxygenase-2 Expression and Clinical Outcome in Gastrointestinal Stromal Tumors. *Journal of Gastrointestinal Surgery* 2006 ;10 (2) :315-19
65. Sabah M, Cummins R , Leader M, Kay E . Altered expression of cell cycle regulatory proteins in gastrointestinal stromal tumors: markers with potential prognostic implications *Human Pathology* 2006; 37: 648– 655
66. Steinert D, Oyarzo M, Wang X, Choi H, Thall P , Medeiros L. Expression of bcl-2 in gastrointestinal stromal tumors. *Cancer* 2006 ; 106 (7): 1617-23.

67. Rosenbaum S, Stergar H , Antoch G, Veit P,Bockisch A, Ku H. Staging and follow-up of gastrointestinal tumors with PET/CT. *Abdom Imaging* 2006; 31:25–35
68. Goerres G , Stupp R, Barghouth G, Hany T, Pestalozzi B, Dizendorf E. The value of PET, CT and in-line PET/CT in patients with gastrointestinal stromal tumours: long-term outcome of treatment with imatinib mesylate. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 2005 ;32:153–162
69. O’Sullivan P, Harris A, Ho S, Munk P.The imaging features of gastrointestinal stromal tumours.*European Journal of Radiology* 2006; 60: 431–438
70. Stroobants S, Goeminne J, Seegers M.18FDG-positron emission tomography for the early prediction of response in advanced soft tissue sarcoma treated with imatinib mesylate (Glivec). *European Journal of Cancer* 2003 ;39:2012–20
71. Mazur MT, Clark HB. Gastric stromal tumors: reappraisal of histogenesis. *Am Journal of Surgical Pathology* 1983; 7:507–519.
72. Chandrajit P. Rauta,c, Jeffrey A. Morganb,c and Stanley W. Ashleya, Current issues in gastrointestinal stromal tumors: incidence,molecular biology, and contemporary treatment of localized and advanced disease. *Current Opinion in Gastroenterology* 2007; 23:149-58
73. Wang L, Vargas H, French S.Cellular origin of gastrointestinal stromal tumors.*Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 124 ; 10: 1471-75.
74. Min K,Leabu M. Interstitial Cells of Cajal (ICC) and Gastrointestinal Stromal Tumor (GIST): facts, speculations, and myths.*Journal of Cell and Moleclar Medicine* 2006 ; 10(4): 995-1013
75. Ogasawaraa N, Tsukamotoa T,Inadaa K, Mizoshitaa T, Bana N, Yamaoc K.Frequent c-Kit gene mutations not only in gastrointestinal stromal tumors but also in interstitial cells of Cajal in surrounding normal mucosa.*Cancer Letters* 2005 ;230 : 199–210
76. Elliot D, Fanning C, Craway N.The utility of fine-needle aspiration in the diagnosis of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer (Cancer Cytopathology)* 2006 ;108(1) :49-55
77. Wilimore-Payne C, Layfiled L, Holden J.c-KIT mutation analysis for diagnosis of gastrointestinal stromal tumors in fine needle aspirations specimens.*Cancer (Cancer Cytopathology)*2005 ; 105 (3): 165-70
78. Yamaguchi U , Hasegawa T , Masuda T, Sekine S, Kawai A , Chuman H.Differential diagnosis of gastrointestinal stromal tumor and other spindle cell tumors in the gastrointestinal tract based on immunohistochemical analysis.*Virchows Archiv* 2004; 445:142–150
79. Nakai Y, Nonomura N, Oka D, Shiba M, Arai Y, Nakayama M.KIT (c-kit oncogene product) pathway is constitutively activated in human testicular germ cell tumors. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005 ;337(1):289-96.

80. Iwahashi M, Takifuji K, Ojima T, Nakamura M, Nakamori M, Nakatani Y. Surgical Management of Small Gastrointestinal Stromal Tumors of the Stomach *World Journal of Surgical* 2006; 30: 28–35
81. Bédard E, Mamazza J, Schlachta C, Poulin E. Laparoscopic resection of gastrointestinal stromal tumors-Not all tumors are created equal. *Surgical Endoscopy* 2006 ; 20: 500–503
82. Novitsky Y, Kercher K, Sing R, Heniford B. Long-term Outcomes of Laparoscopic Resection of Gastric Gastrointestinal Stromal Tumors. *Annals of Surgery* 2006 ; 243 (6): 738-47
83. Nilsson B , Sjölund K, Kindblom L, Meis-Kindblom J, Bümming P, Nilsson O. Adjuvant imatinib treatment improves recurrence-free survival in patients with high-risk gastrointestinal stromal tumors. *British Journal of Cancer* 2007 ; 96 (12) : 1656-58.
84. Zalberg J, Verweij J, Casali P, Le Cesne A , Reichardt P, Blay J. Outcome of patients with advanced gastro-intestinal stromal tumours crossing over to a daily imatinib dose of 800 mg after progression on 400 mg. *European Journal of Cancer* 2005 ; 41 : 1751–1757
85. Verweij J, Oosterom A, Blay J, Judson I, Rodenhuis R, van der Graaff W. Imatinib mesylate (STI-571 Glivec1, Gleevec™) is an active agent for gastrointestinal stromal tumours, but does not yield responses in other soft-tissue sarcomas that are unselected for a molecular target: Results from an EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group phase II study *European Journal of Cancer* 2003 ; 39 : 2006–2011
86. Raut C, Posner M, Desai J, Morgan J, George S, Zahrieh D. Surgical Management of Advanced Gastrointestinal Stromal Tumors After Treatment With Targeted Systemic Therapy Using Kinase Inhibitors. *Journal of Clinical Oncology* 2006 ; 24 (15):2325-31
87. Demetri G, von Mehren M, Blanke C, Van den Abbeele A, Eisenberg B, Roberts P. Efficacy and Safety of Imatinib Mesylate in Advanced Gastrointestinal Stromal Tumors. *New England Journal of Medicine* 2002; 347: 472 -480
88. Verweij J , Casali P, Zalberg J. Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumors with high-dose imatinib: randomised trial. *Lancet* 2004 ; 364: 1127-1134.
89. Gold JS, van der Zwan SM, Gonen M, Maki RG, Singer S, Brennan M. Outcome of metastatic GIST in the era before tyrosine kinase inhibitors *Annals of Surgical Oncology*. 2007 ; 14(1):134-42.
90. Verweij J , Casali P, Zalberg J. Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumors with high-dose imatinib: randomised trial. *Lancet* 2004 ; 364: 1127-1134.
91. Demetri G , Oosterom A, Garrett C, Blackstein M, Shah M , Verweij J. Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: a randomised controlled trial. *Lancet* 2006; 368: 1329–38
92. Judson IR, Ma P, Peng B, et al. Imatinib pharmacokinetics in patients with gastrointestinal stromal tumour a retrospective population pharmacokinetic study over

- time: EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. *Cancer Chemotherapy Pharmacology* 2004 ; 55 (4) : 379-86
93. Wardelmann E, Thomas N, Merkelbach-Bruse S, Pauls K, Speidel N, Büttner R. Acquired resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumours caused by multiple KIT mutations. *Lancet Oncol* 2005; 6: 249–51
 94. Seandel M, Shia J, Linkov I, Maki RG, Antonescu CR, Dupont J. The activity of sunitinib against gastrointestinal stromal tumor seems to be distinct from its antiangiogenic effects. *Clinical Cancer Research*. 2006 ;12(20):6203-4
 95. Heinrich M, Maki R, Corless C. Sunitinib response in imatinib-resistant GIST correlates with KIT and PDGFRA mutation status. *Journal of Clinical Oncology* 2006 ; 24 (9) :502.
 96. Reichardt P, Casali P, Blay J, Von Mehren M, Schoffski P, Hosseinzadeh S, A phase I study of AMN 107 alone and in combination with imatinib in patients with imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors. *ASCO Annual Meeting Proceedings 2006 Abstract 9545*
 97. Andtbacka R ,Chaan S, Scaife C, Cormier J, Hunt K, Pisters P. Surgical Resection of Gastrointestinal Stromal Tumors After Treatment with Imatinib. *Annals of Surgical Oncology* 2007 ;14(1):14-24
 98. Scaife C, Hunt K, Patel S, Benjamin R, Burgess M, Chen L. Is there a role for surgery in patients with “unresectable” cKIT_gastrointestinal stromal tumors treated with imatinib mesylate? *The American Journal of Surgery* 2003 ; 186: 665–669
 99. Haller F, Detken S, Hans-Jürgen S, Happel N, Gunawan B, Kuhlitz J. Surgical Management After Neoadjuvant Imatinib Therapy in Gastrointestinal Stromal Tumours (GISTs) with Respect to Imatinib Resistance Caused by Secondary KIT Mutations. *Annals of Surgical Oncology* 2007 ;14(2):526–532
 100. Kobayashi K, Gupta S, Trent J, Vauthney J, Krishnamurthy S, Ensor J .Hepatic Artery Chemoembolization for 110 gastrointestinal stromal tumors. *Cancer* 2006 ; 107 (12) : 2833-41.
 101. Choi H, Charnsangavej C, Faria SC, Macapinlac HA, Burgess MA, Patel SR, Chen LL, Podoloff DA, Benjamin RS. Correlation of computed tomography and positron emission tomography in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor treated at a single institution with imatinib mesylate: proposal of new computed tomography response criteria. *Journal of Clinical Oncology*; 25 (13) : 1753-9.
 102. Antoch G, Kanja J, Bauer S. Comparison of PET, CT, and dual-modality PET/CT imaging for monitoring of imatinib (STI571) therapy in patients with gastrointestinal stromal tumors. *Journal of Nuclear Medicine* 2004; 45:357–365
 103. Rosenbaum S, Stergar H, Antoch G , Veit P, Bockisch A, Köhl H. Staging and follow-up of gastrointestinal tumors with PET/CT. *Abdom Imaging* 2006; 31:25–35

104. Goerres G, Stupp R, Barghouth G, Hany T, Pestalozzi B, Dizendorf E. The value of PET, CT and in-line PET/CT in patients with gastrointestinal stromal tumours: long-term outcome of treatment with imatinib mesylate. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* (2005) 32:153–16
105. Goh B, Chow P, Chuah K, Yap W, Wong W. Pathologic, radiologic and PET scan response of gastrointestinal stromal tumors after neoadjuvant treatment with imatinib mesylate. *European Journal of Surgical Oncology* 2006 ;32 : 961-63
106. Blanke W. Proceedings of American Society of Clinical Oncology. *Journal of Clinical Oncology* 2006;24 (18s) :Abstract 9528
107. Kerr J, Wyllie A, Currie A. Apoptosis: a basic phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 1972 ; 26: 239.
108. Green D, Reed J. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281: 1317.
109. Huerta S, Goulet E, Livingston E. Colon cancer and apoptosis. *The American Journal of Surgery* 2006 ;191: 517-526
110. Mita M, Tolcher A. Novel Apoptosis inducing agents in cancer therapy. *Current Problems in Cancer* 2005 ; 29:8-32
111. Riedl S, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2004 ;5 :897-907
112. Ambrosini G, Adida C, Altieri D. A novel anti-apoptosis gene, Survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nature Medicine* 1997 ; 3: 917-21.
113. Suga K, Yamamoto T, Yamada Y, Myitake S, Nakagawa T, Tanigawa N. Correlation between transcriptional expression of survivin isoforms and clinicopathological findings in human colorectal carcinomas. *Oncology Reports* 2005 ; 13: 891-97.
114. Caldas H, Fangusaro JR, Boué DR, Holloway MP, Altura RA. Dissecting the role of endothelial survivin DeltaEx3 in angiogenesis. *Blood*. 2007;109(4):1479-89.
115. Adida C, Crotty P, McGrath J, Berrebi D, Diebold J, Altieri D. Developmentally regulate expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation. *American Journal of Pathology* 1998 ; 152 : 43-49
116. Lu B, Gonzalez A, Massion P, Shaktour B, Carbone D, Hallahan D. Nuclear survivin is a biomarker for non-small-cell lung cancer. *British Journal of Cancer* 2004; 91 : 537-40.
117. Caldas H, Honsey L, Altura R. Survivin 2alpha: a novel Survivin splice variant expressed in human malignancies. *Molecular Cancer* 2005 ;4(1):11
118. Endoh T, Tsuji N, Asanuma K, Yagihashi A, Watanabe N. Survivin enhances telomerase activity via up-regulation of specificity protein 1 and c-Myc-mediated human telomerase reverse transcriptase gene transcription. *Experimental Cell Research* 2005 ;301: 300-11.

119. Ito Y, Yoshida H, Uruno T, Nakano K, Miya A, Kobayashi K. Survivin expression is significantly linked to the dedifferentiation of thyroid carcinoma. *Oncology Reports* 2003; 10: 1137-40.
120. Weickert S, Schrader M, Krause H, Schulze W, Muller M, Miller K. The inhibitor of apoptosis survivin is expressed in human testicular germ cell tumors and normal testes. *Cancer Letters* 2005; 223: 331-37.
121. Yu J, Ebert M, Go M, Wang H, Chung S, Malfertheiner P. Increased expression of survivin in gastric cancer patients and in first degree relatives. *British Journal of Cancer* 2002; 87: 91-97.
122. Takai N, Miyazaki T, Nishida M, Nasu K, Miyakawa. Survivin expression correlates with clinical stage, histological grade, invasive behaviour and survival rate in endometrial carcinoma. *Cancer Letters* 2002; 184: 1050116.
123. Chen W, Liu Q, Fu J, Kang S. Expression of survivin and its significance in colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 2004; 10(19): 2286-89.
124. Ku J, Kwak C, Lee H, Park H, Lee S, Lee E. Expression of survivin, a novel inhibitor of apoptosis, in superficial cell carcinoma of the bladder. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* 2004; 22: 265-74.
125. Ryan B, Konecny G, Kahlert S, Wang H, Meng G, Pegram M. Survivin expression in breast cancer predicts clinical outcome and is associated with Her-2, VEGF, Urokinase plasminogen activator and PAI-1. *Annals of Oncology* 2006; 17: 597-604
126. Byun S, Yeo W, Lee S, Lee E. Expression of survivin in renal cell carcinomas: association with pathologic features and clinical outcome. *Urology* 2007; 69(1): 34-7
127. Endo T, Abe S, Seidler H, Nagaoka S, Takemura T, Utsuyama M. Expression of IAP family proteins in colon cancer from patients with different age groups. *Cancer Immunology and Immunotherapy* 2004; 53: 770-76.
128. Caldas H, Holloway MP, Hall BM, Qualman SJ, Altura RA. Survivin-directed RNA interference cocktail is a potent suppressor of tumour growth in vivo. *Journal of Medical Genetics*. 2006; 43(2): 119-28.
129. Taubert H, Kappler M, Bache M, Bartel F, Kohler T, Lautenschlager C. Elevated expression of survivin-splice variants predicts a poor outcome for soft-tissue sarcoma patients. *Oncogene*. 2005; 24(33): 5258-61
130. Kappler M, Kohler T, Kampf C, Diestelkötter P, Wurl P, Schmitz M. Increased survivin transcript levels: an independent negative predictor of survival in soft tissue sarcoma patients. *International Journal of Cancer* 2001; 95(6): 360-3
131. Trieb K, Lehner R, Stulnig T, Sulzbacher I, Shroyer K. Survivin expression in human osteosarcoma is a marker for survival. *European Journal of Surgical Oncology* 2003; 29: 379-382

132. Andrade V, Cunha I, Silva E, Ayala F, Sato Y, Ferreira S.O arranjo em matriz de amostras teciduais (tissue microarray) : larga escala e baixo custo ao alcance do patologista. *Jornal Brasileiro de Patologia Médica e Laboratorial* 2007; 1: 55-60
133. Sammarco I, Capurso G, Coppola L, Bonifazi AP, Cassetta S, Delle Fave G, Carrara A, Grassi GB, Rossi P, Sette C, Geremia R (2004) Expression of the proto-oncogene c-KIT in normal and tumor tissues from colorectal carcinoma patients. *International Journal of Colorectal Disease* 2004 ;19:545–553
134. Cohen A, Geller SA, Horowitz I, Toth LS, Werther JL. Experimental models for gastric leiomyosarcoma. The effects of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in combination with stress, aspirin, or sodium taurocholate. *Cancer* 1984; 53:1088-1092