Lisandro Ferreira Lopes

**Caracterização clinicopatológica,
imunoistoquímica e genética molecular do
tumor estromal gastrintestinal no Brasil**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Patologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos E. Bacchi

SÃO PAULO

2007

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meu pai Fernando,
à minha mãe Cleyde (*in memoriam*), a
meus irmãos Fernando e Alexandre e à
minha querida esposa Sheila,
sustentáculos da minha existência.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Carlos E. Bacchi, incentivador incansável e exemplo de profissional, por seu suporte constante no desenvolvimento deste trabalho e pela oportunidade de fazer parte do time da *Consultoria em Patologia*.

À Dra. Maura M. Bacchi, pelo convívio profissional e pela oportunidade de fazer parte do time da *Consultoria em Patologia*.

À Dra. Élide B. Ojopi, por sua inestimável ajuda na interpretação dos resultados do estudo de mutação.

Aos colegas do *Genepath*, pelo apoio técnico no estudo genético molecular deste trabalho.

Aos técnicos dos laboratórios de histologia e imunoistoquímica da *Consultoria em Patologia*, por sua contribuição constante na realização de todas as etapas deste trabalho.

Aos secretários da *Consultoria em Patologia*, por sua ajuda valiosa na recuperação de dados dos casos incluídos neste estudo.

Aos colegas patologistas da *Consultoria em Patologia*, pelo convívio profissional diário.

Aos pacientes, que através de sua doença, contribuíram para o melhor conhecimento da mesma através deste estudo.

A todos aqueles que, de uma maneira ou de outra, participaram em qualquer fase da elaboração deste trabalho.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	13
3 MÉTODOS.....	14
3.1 Seleção dos casos	14
3.2 Levantamento de informações clínicas.....	14
3.3 Avaliação morfológica.....	15
3.4 Classificação dos GIST em grupos de risco.....	16
3.5 Construção de blocos de “array” de tecido (TMA)	17
3.6 Imunoistoquímica.....	19
3.7 Análise de mutação dos genes <i>KIT</i> e <i>PDGFRA</i>	23
3.8 Hibridização “in situ” por fluorescência (FISH)	25
4 RESULTADOS.....	29
4.1 Caracterização clínica.....	29
4.2 Caracterização histopatológica.....	32
4.3 Caracterização imunoistoquímica.....	38
4.4 Análise de mutação dos genes <i>KIT</i> e <i>PDGFRA</i>	44
4.5 Caracterização dos casos de GIST CD117-negativos.....	46
4.6 Pesquisa de amplificação dos genes <i>EGFR</i> e <i>HER2</i> por FISH.....	47
5 DISCUSSÃO.....	49
6 CONCLUSÕES.....	60
7 REFERÊNCIAS.....	63

Apêndice

RESUMO

Lopes LF. *Caracterização clinicopatológica, imunoistoquímica e genética molecular do tumor estromal gastrointestinal no Brasil* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 78p.

O presente estudo tem por objetivo avaliar as características clinicopatológicas, imunoistoquímicas e moleculares de 513 casos brasileiros de tumor estromal gastrointestinal, incluindo o estudo da expressão imunoistoquímica de CD117, CD34, proteína DOG1, actina de músculo liso, desmina, proteína S-100, antígeno Ki-67, proteína p53, molécula de adesão CD44v3, receptor para fator de crescimento epidérmico, proteína HER2 e receptor para fator de crescimento derivado de plaqueta alfa, além da análise molecular de mutações envolvendo os genes *KIT* e *receptor para fator de crescimento derivado de plaqueta alfa* e da pesquisa de amplificação dos genes *receptor para fator de crescimento epidérmico* e *HER2* por hibridização “in situ” fluorescente. As características clínicas e morfológicas dos casos estudados não foram diferentes das referidas pela literatura. Houve expressão de CD117 (KIT) em 95,7% dos casos. A proteína DOG1 foi expressa em 85,9% dos tumores, sendo capaz de diagnosticar 20% dos casos com ausência de expressão de CD117 (KIT). O índice de proliferação celular determinado pelo antígeno Ki-67 foi superior nos casos classificados como de alto risco para comportamento biológico agressivo segundo critérios do “National Institutes of Health”. A expressão

da proteína p53 esteve restrita aos casos classificados como de alto risco. Não se observou expressão imunoistoquímica da molécula de adesão CD44v3. A proteína receptora para fator de crescimento epidérmico foi expressa em 84,4% dos casos, porém não se observou superexpressão da proteína HER2. A expressão imunoistoquímica da proteína receptora para fator de crescimento derivado de plaqueta alfa foi observada em 94,4% dos casos estudados, não apresentando relação com o tipo de mutação encontrado. As mutações do gene *KIT* foram as mais frequentemente observadas, principalmente do éxon 11. Mutações do gene *receptor para fator de crescimento derivado de plaqueta alfa* foram observadas em 8,1% dos casos, sendo que 54,5% dos casos com ausência de expressão imunoistoquímica de CD117 (KIT) apresentavam mutações nesse gene. A hibridização “in situ” fluorescente não demonstrou amplificação dos genes *receptor para fator de crescimento epidérmico* e *HER2* nos tumores estromais gastrintestinais.

Descritores: 1. Tumores do estroma gastrointestinal 2. Trato gastrointestinal/patologia 3. Imunoistoquímica 4. Mutação 5. Brasil

SUMMARY

Clinicopathologic, immunohistochemical and molecular genetic characterization of gastrointestinal stromal tumor in Brazil [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2007. 78p.

The present study presents the clinicopathologic, immunohistochemical and molecular genetic features of 513 Brazilian cases of gastrointestinal stromal tumor, including the immunohistochemical expression of CD117, CD34, DOG1 protein, smooth muscle actin, desmin, S-100 protein, Ki-67 antigen, p53 protein, CD44v3 adhesion molecule, epidermal growth factor receptor, HER2 protein and platelet derived growth factor receptor alpha, the mutation analysis of *KIT* and *platelet-derived growth factor receptor alpha* genes, and the investigation of amplification of *HER2* and *epidermal growth factor receptor* genes by fluorescence "in situ" hybridization. The clinicopathologic features of Brazilian gastrointestinal stromal tumors do not differ from those published from other countries. CD117 (KIT) was expressed by immunohistochemistry in 95.7% of cases. DOG1 protein was expressed in 85.9% of tumors, being able to establish the diagnosis of GIST in 20% of those cases that were negative for CD117 (KIT). Ki-67 proliferation index was higher in those cases classified as high-risk of aggressive behavior by the National Institutes of Health consensus approach. The immunohistochemical expression of p53 protein was restricted to cases classified as high-risk of aggressive behavior. The adhesion molecule CD44v3 was not expressed in any of the cases. The epidermal growth factor

receptor protein was overexpressed in 84.4% of cases, and HER2 protein was not expressed in all cases. The platelet-derived growth factor receptor alpha protein was detected by immunohistochemistry in 94.4% of tumors, and there was no relationship between its expression and the mutation status. *KIT* mutations were the most frequent, mainly of exon 11. *Platelet-derived growth factor receptor alpha* mutations were found in 8.1% of the cases, and 54.5% of those cases that were negative for CD117 (KIT) had mutations in *platelet-derived growth factor receptor alpha* gene. Fluorescence “in situ” hybridization revealed no amplification of *epidermal growth factor receptor* and *HER2* genes in gastrointestinal stromal tumors.

Descriptors: 1. Gastrointestinal stromal tumors 2. Gastrointestinal tract/pathology 3. Immunohistochemistry 4. Mutation 5. Brazil

1 INTRODUÇÃO

O tumor estromal gastrointestinal, mais comumente conhecido na literatura pela sigla GIST (da língua inglesa “gastrointestinal stromal tumor”), é a neoplasia mesenquimal mais comum do trato gastrointestinal (TGI), apresentando características morfológicas, imunoistoquímicas e genéticas peculiares, as quais a diferenciam de outras neoplasias mesenquimais do TGI. No passado, a maioria dos GIST era diagnosticada como leiomiomas, leiomioblastomas, leiomiossarcomas, neurofibromas, schwannomas e tumores de nervo autonômico gastrointestinal ou plexossarcomas. Contudo, com o advento da microscopia eletrônica, imunoistoquímica e da descoberta da frequente ocorrência de mutações envolvendo os genes *KIT* ou *receptor para fator de crescimento derivado de plaqueta alfa* (na língua inglesa “*platelet-derived growth factor receptor alpha*” ou *PDGFRA*) no GIST, essa neoplasia passou a ser considerada uma entidade particular, embora pudesse apresentar evidências de diferenciação muscular ou neural parcial (Rubin, 2006).

Nos Estados Unidos da América (EUA), estima-se o diagnóstico de 4500 a 6000 novos casos de GIST ao ano (Fletcher et al., 2002). Não se observa diferença de prevalência entre os sexos e geralmente a neoplasia acomete indivíduos acima de 50 anos (idade mediana de 58 anos), embora casos pediátricos estejam registrados na literatura. A localização anatômica mais frequente é o estômago (50-60% dos casos), seguido pelo intestino delgado (25-35% dos casos), intestino grosso (cerca

de 10% dos casos) e esôfago (cerca de 5% dos casos), sendo infrequente no apêndice cecal, vesícula biliar e pâncreas. Em aproximadamente 10% dos casos, a neoplasia não ocorre no TGI e é chamada de GIST extragastrintestinal, sendo suas localizações anatômicas mais frequentes o mesentério, omento, retroperitônio e pelve. O sinal/sintoma mais frequentemente associado ao GIST é o sangramento gastrointestinal agudo (melena ou hematêmese); outros sinais e sintomas são anemia (devido ao sangramento crônico insidioso) e saciedade precoce. Abdome agudo decorrente da ruptura do tumor ou de obstrução pode ocorrer. O GIST também pode ser descoberto incidentalmente durante cirurgias ou em estudos radiológicos e procedimentos endoscópicos, particularmente aqueles tumores de dimensões pequenas. Metástases podem ocorrer, mas geralmente estão restritas à cavidade abdominal ou acometem fígado; raramente são envolvidos ossos, pele, pulmões e linfonodos. Em geral, a ressecção completa da neoplasia é o tratamento preconizado. Os pacientes com neoplasias irresssecáveis ou que apresentam doença metastática são tratados com inibidores da tirosino-quinase dos receptores KIT e PDGFRA, como o mesilato de imatinibe (molécula STI571, Gleevec®/Glivec®, Novartis, Basel, Suíça), que é usado também no tratamento da leucemia mielóide crônica. Essa droga está disponível comercialmente para uso oral, na dose de 400-800 mg/dia (Rubin, 2006; Miettinen e Lasota, 2006; Savage e Antman, 2002).

Como previamente comentado, o GIST se caracteriza pela ocorrência frequente (>80% dos casos) de mutações envolvendo os genes

KIT e *PDGFRA*. Esses genes codificam receptores (proteínas de localização transmembrânica) homônimos (*KIT* e *PDGFRA*) com atividade tirosino-quinase (Figura 1), os quais estão envolvidos no desenvolvimento e manutenção de diversas células, incluindo eritrócitos, mastócitos, melanócitos, células germinativas e das chamadas células intersticiais de Cajal.

Figura 1. Estrutura molecular dos receptores *KIT* e *PDGFRA*. Esses receptores têm localização transmembrânica, apresentando um domínio extracelular (de ligação com o ligante), domínio transmembrânico, domínio justamembrânico e domínios da tirosina quinase (TK1 e TK2)

As células intersticiais de Cajal são consideradas as células marca-passo do TGI devido ao seu papel regulador do peristaltismo gastrointestinal (Sanders, 1996). Considerando que tanto as células intersticiais de Cajal como as células neoplásicas do GIST podem expressar

os antígenos CD117 (KIT) e CD34 à imunohistoquímica, acredita-se que o GIST represente uma neoplasia derivada das células intersticiais de Cajal (Figura 2) que apresenta mutações ativadoras (com ganho de função) do gene *KIT* (Hirota et al., 1998; Kindblom et al., 1998).

Figura 2. A: Células intersticiais de Cajal localizadas na parede intestinal (hematoxilina-eosina, X400). B: Células intersticiais de Cajal com expressão imunohistoquímica de CD117/KIT (coloração imunohistoquímica, contracoloração com hematoxilina de Mayer, X400)

As mutações do gene *KIT* são somáticas e estão presentes apenas na neoplasia, embora mutações constitucionais similares em GIST familiar estejam presentes em todas as células do organismo. Essas mutações causam alterações funcionais das proteínas KIT, ocorrendo dimerização ligante-independente e ativação constitucional dos receptores, o que permite a fosforilação das tirosina quinases e ativação de uma cascata de sinalização molecular intracelular (Figuras 3 e 4). O resultado final é o aumento da proliferação celular e redução da apoptose, levando ao desenvolvimento da neoplasia (Duensing et al., 2004; Rubin, 2006; Miettinen e Lasota, 2006).

Figura 3. Representação esquemática do processo de ativação dos receptores KIT. A: Célula sem mutação do gene *KIT*, na qual a ativação dos processos intracelulares de sinalização que regulam a função celular é dependente da ligação com o SCF (“stem cell factor” ou fator de célula-tronco). B: Célula neoplásica (com mutação do gene *KIT*) em que a ativação dos processos intracelulares de sinalização independe da ligação com o ligante, levando à proliferação celular descontrolada

Figura 4. Representação esquemática dos ligantes (SCF, “stem cell factor” ou fator de célula-tronco), receptores KIT e moléculas envolvidas no processo de sinalização intracelular e suas principais funções

Mutações envolvendo o gene *KIT* podem ser detectadas em 80-85% dos casos de GIST (Corless et al., 2002). Nos casos de GIST com ausência de mutações do *KIT*, mutações envolvendo o gene *PDGFRA* podem ser encontradas em 5-10% dos casos (Heinrich et al., 2003; Medeiros et al., 2004). As mutações envolvendo o gene *KIT* podem ocorrer nos éxons 11 (60-70%), 9 (10%), 13 (1%) ou 17 (1%). As mutações envolvendo o gene *PDGFRA* podem ocorrer nos éxons 18 (6%), 12 (1%) ou 14 (<1%). Cerca de 10% dos casos de GIST não apresentam mutações dos genes *KIT* ou *PDGFRA* (tipo selvagem). A Figura 5 apresenta as frequências das mutações dos genes *KIT* e *PDGFRA* para os seus respectivos éxons.

Figura 5. Representação esquemática da estrutura molecular dos receptores KIT e PDGFRA e as frequências das mutações para cada éxon dos respectivos genes

Respostas excelentes ao mesilato de imatinibe são esperadas para os GIST com mutações no éxon 11 do gene *KIT*. Respostas parciais ao mesilato de imatinibe ocorrem nas mutações envolvendo os éxons 9, 13 e 17 do gene *KIT* e éxons 12 e 18 do gene *PDGFRA*, exceto a mutação D842V do éxon 18 do gene *PDGFRA*, que não é responsiva ao tratamento (Rubin, 2006). A Figura 6 ilustra o processo de funcionamento da molécula STI571 ou mesilato de imatinibe (Savage e Antman, 2002).

Figura 6. Representação esquemática da ação do mesilato de imatinibe (STI). A droga é um análogo do ATP que se liga à porção intracelular do receptor KIT e inibe o processo de sinalização molecular

Podendo apresentar dimensões reduzidas (<10 mm) ou bastante grandes (>350 mm), o GIST se caracteriza macroscopicamente por ser uma neoplasia que acomete a parede das estruturas do tubo digestivo,

podendo estender-se até a mucosa, causando seu abaulamento ou mesmo ulcerando-a (Figura 7).

Figura 7. Fotografias da macroscopia do GIST. A: Massa nodular acometendo a parede gástrica, com a mucosa preservada. B: Massa polipóide causando protrusão da mucosa intestinal

Microscopicamente, o GIST se caracteriza pela proliferação de células fusiformes ou epitelióides, podendo ocorrer a presença simultânea de ambas na mesma neoplasia (GIST misto). O GIST de células fusiformes se caracteriza pelo padrão de crescimento fascicular, enquanto o GIST epitelióide comumente apresenta padrão de crescimento sólido ou em ninhos (o que lembra um paraganglioma). O estroma pode ser hialinizado ou mixóide. Citologicamente, o GIST tem aspecto bastante homogêneo (pleomorfismo é infrequente), com núcleos alongados ou ovalados apresentando cromatina fina e nucléolos pouco evidentes, sendo o citoplasma abundante e róseo claro. Outras características histológicas que podem ser observadas são vacúolos paranucleares, disposição nuclear em paliçada (lembrando os corpos de Verocay do schwannoma) e as chamadas

fibras “skeinoid”, agregados eosinofílicos alongados ou ovalados extracelulares de fibras colágenas, que são predominantemente observadas nos GIST do intestino delgado. Necrose, hemorragia e ulceração da mucosa podem ser encontradas. O índice mitótico é bastante variável e, juntamente com o tamanho da neoplasia, constituem os mais fidedignos parâmetros para se estimar o risco de comportamento biológico agressivo da neoplasia (Rubin, 2006; Fletcher et al., 2002).

Cerca de 95% dos casos de GIST expressam CD117 ou KIT à imunoistoquímica. A expressão de CD34, actina de músculo liso, proteína S-100 e desmina é observada em 60-70%, 30-40%, 5% e 1-2% dos casos, respectivamente (Fletcher et al., 2002). A expressão de KIT é geralmente difusa e de forte intensidade, sendo observada no citoplasma das células neoplásicas, podendo ocorrer pontualmente em localização paranuclear (conhecido como padrão golgi ou “dot-like”). Recentemente, estudos de expressão gênica identificaram que a proteína de função desconhecida DOG1 (sigla derivada da língua inglesa de “discovered on GIST-1”) é expressa nos GIST independentemente da mutação encontrada (West et al., 2004).

Os principais diagnósticos diferenciais do GIST são leiomioma, leiomiossarcoma, schwanoma, pólipos fibróides inflamatórios e fibromatose tipo desmóide. A imunoistoquímica é muito útil no diagnóstico diferencial, pois todas essas lesões não expressam CD117 (KIT); os leiomiomas e leiomiossarcomas, que são neoplasias musculares lisas, expressam desmina e actina de músculo liso; os schwanomas, por sua vez,

expressam a proteína S-100 difusamente; o pólipo fibróide inflamatório também pode expressar CD34, mas apresenta características morfológicas distintas do GIST. A fibromatose tipo desmóide comumente expressa β -catenina em localização nuclear. Deve-se atentar para o fato de que a expressão de CD117 (KIT) não é restrita ao GIST, podendo ser observada em melanomas, tumores de células germinativas, mastocitomas e angiossarcomas. Contudo, essas neoplasias apresentam morfologia peculiar e imunorreatividade para outros anticorpos, que não é observada no GIST (Rubin, 2006; Miettinen e Lasota, 2006).

Conforme comentado anteriormente, os fatores prognósticos mais importantes relacionados à evolução do GIST são o tamanho do tumor e o índice mitótico, independentemente do sítio de origem (Rubin, 2006; Fletcher et al., 2002). É importante salientar que todo GIST pode apresentar potencial para comportamento biológico agressivo. Outros fatores prognósticos que têm sido estudados em GIST pela imunoistoquímica, embora com resultados variáveis quanto ao impacto prognóstico, são o índice de proliferação celular pelo antígeno Ki-67 (Hasegawa et al., 2002; Seidal e Edvardsson, 1999; Carrilo et al., 1997; Hu et al., 2006; Panizo-Santos et al., 2000; Rudolph et al., 1998), a expressão da proteína p53, uma proteína supressora tumoral que regula o ciclo celular e a apoptose (Liebermann et al., 2007; Sabah et al., 2006; Feakins, 2005; Hu et al., 2006; Nakamura et al., 2005; Yalcinkaya et al., 2007) e de moléculas de adesão da família CD44, moléculas da superfície celular que estão associadas à

carcinogênese e com possível valor prognóstico em várias neoplasias (Sy et al., 1997; Montgomery et al., 2004), entre outros.

Alguns outros receptores para fatores de crescimento têm sido amplamente estudados devido ao seu importante papel na biologia do câncer, tornando-se alvos moleculares terapêuticos promissores, destacando-se a superexpressão dos receptores para fator de crescimento epidérmico HER-1 ou EGFR (da língua inglesa “epidermal growth factor receptor”) e HER-2 (da língua inglesa “human epidermal growth factor receptor-2”). Esses receptores, que apresentam atividade tirosino-quinase, são responsáveis pela ativação de vias intracelulares de transdução de sinais, os quais controlam os processos de proliferação, diferenciação, motilidade e adesão celulares. O papel do EGFR no carcinoma não pequenas células do pulmão tem sido bastante investigado na literatura, o que se deve também à disponibilidade de terapia com inibidores da atividade tirosino-quinase desse alvo molecular (Lynch et al., 2004; Takano et al., 2005; Hirsch et al., 2003). O mesmo também ocorre entre o HER-2 e carcinoma de mama, estando a superexpressão da proteína associada a fenótipo agressivo e prognóstico ruim em cerca de 20% dos casos, os quais se beneficiam de tratamento com trastuzumabe, um anticorpo anti-HER2 (Slamon et al., 1987; Maguire e Greene, 1989; Tandon et al., 1989; Gusterson et al., 1992; Dougall et al., 1994; Menard et al., 2004; Johnson e Esteva, 2007; Meric-Bernstam e Hung, 2006). Contudo, o papel desses receptores para fator de crescimento epidérmico no GIST tem sido pouco investigado, com poucos trabalhos na literatura (Cai et al., 1999; Lanzafame

et al., 2006; Yoo et al., 2004; Tornillo et al., 2005) apresentando resultados por vezes conflitantes.

Apesar da literatura ser bastante rica em publicações a respeito dos mais variados aspectos do GIST, incluindo o estudo de suas características clínicas, morfológicas, imunoistoquímicas e genéticas/moleculares (Miettinen et al., 2000; Miettinen et al., 2005; Miettinen et al., 2003; Miettinen et al., 2006; Miettinen et al., 2001; Miettinen et al., 1999; Makar et al., 2002; Zepeda-Gomes et al., 2004; Khoo e Gunn, 2005; Liu et al., 2006; Kim et al., 2005; Urbanczyk et al., 2005; Ueyama et al., 1992; Koay et al., 2005; Li et al., 2005; Orosz et al., 2005; Alvarado-Cabrero et al., 2007; Wang et al., 2001), há restrição quanto à disponibilidade de dados sobre a neoplasia em pacientes brasileiros, o que reforça a necessidade de estudos para a pesquisa das características do GIST no Brasil. Além disso, devido à disponibilidade de tratamento alvo-específico com inibidores de EGFR e HER-2, o papel desses alvos terapêuticos no GIST merece ser melhor investigado.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é estudar as características clínicas, morfológicas, imunoistoquímicas e genéticas/moleculares de grande número de casos brasileiros de GIST e compará-las com os dados apresentados na literatura referente a outros países, incluindo a avaliação de:

1. Características clínicas: sexo e idade dos pacientes, sinais e sintomas associados, localização anatômica e tamanho da neoplasia, além da evolução da doença (“follow-up”);
2. Características morfológicas da neoplasia: tipo celular, tipo histológico e pesquisa da presença de fibras “skeinoid”, necrose, calcificação e ulceração da mucosa;
3. Características imunoistoquímicas da neoplasia: avaliação da expressão imunoistoquímica de CD117 (KIT), CD34, proteína DOG1, PDGFRA, actina de músculo liso, desmina, proteína S-100, incluindo a avaliação da expressão de marcadores prognósticos como o antígeno Ki-67, proteína p53 e molécula de adesão CD44v3;
4. Características genéticas/moleculares: investigação de mutações dos genes *KIT* e *PDGFRA*;
5. Avaliação do papel das proteínas relacionadas aos fatores de crescimento EGFR e HER2 e de seus respectivos genes no GIST.

3 MÉTODOS

3.1 Seleção dos casos

O grupo de estudo inclui 513 casos consecutivos de GIST diagnosticados entre 1997 e 2006 na *Consultoria em Patologia* através de avaliação histopatológica e imunoistoquímica. A *Consultoria em Patologia* é um laboratório de referência em Anatomia Patológica localizado na cidade de Botucatu/SP. Foram incluídos tanto GIST localizados no TGI quanto GIST extragastrintestinais.

O presente estudo teve seu Protocolo de Pesquisa (442/05) aprovado pela Comissão de Ética para análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) em 13 de julho de 2005 (vide Apêndice).

3.2 Levantamento de informações clínicas

Informações como sexo e idade do paciente no momento do diagnóstico, sinais e sintomas associados, localização anatômica da neoplasia e tamanho (em centímetros, sendo considerada a maior dimensão) foram obtidas dos relatórios anatomopatológicos e através de contato telefônico com os médicos assistentes, incluindo oncologistas clínicos e cirurgiões do aparelho digestivo, que também forneceram os dados a respeito do seguimento (“follow-up”) dos pacientes. Esses dados incluíam a ocorrência de recorrência, metástases e/ou morte pela neoplasia.

3.3 Avaliação morfológica

Revisaram-se, em todos os 513 casos incluídos neste trabalho, lâminas histológicas de 3 µm de espessura obtidos com micrótomo histológico e corados pela hematoxilina-eosina, utilizando-se os blocos de parafina recebidos para avaliação diagnóstica e imunoistoquímica pela *Consultoria em Patologia*, os quais continham fragmentos da neoplasia fixada em formalina. Essa revisão morfológica permitiu o registro do tipo celular (células fusiformes, células epitelióides ou misto de células fusiformes e epitelióides) e a pesquisa de características histológicas como a presença de fibras “skeinoid”, necrose, calcificação e ulceração da mucosa. As neoplasias também foram classificadas segundo padrões histológicos (modificado de Miettinen e Lasota, 2006) nos subtipos esclerosante, paliçada/vacuolado, hiper celular/sarcomatoso-símile, organóide e pleomórfico. O subtipo esclerosante é considerado uma neoplasia pouco celular na qual as células estão dispersas em estroma rico em colágeno. O subtipo paliçada/vacuolado se caracteriza pelo arranjo nuclear das células neoplásicas em paliçada que lembra os achados morfológicos observados em um schwannoma, podendo apresentar ou não evidente vacuolização paranuclear. O subtipo hiper celular/sarcomatoso-símile, por sua vez, é constituído por densa população celular que remete aos achados histopatológicos de um sarcoma. O subtipo organóide apresenta arquitetura em ninhos que lembra um paraganglioma. O subtipo pleomórfico, finalmente,

revela a presença de células neoplásicas bizarras, geralmente multinucleadas.

A contagem de mitoses foi também realizada, considerando-se 50 campos de grande aumento consecutivos (área individual do campo: $0,2 \text{ mm}^2$). O número de mitoses foi registrado para cada caso até o máximo de 51 mitoses contadas.

3.4 Classificação dos GIST em grupos de risco

Com a finalidade de se estimar o risco de comportamento biológico agressivo dos GIST, os casos foram classificados segundo critérios propostos pelo “National Institutes of Health” (NIH), EUA, que consideram o tamanho da neoplasia e a contagem de mitoses/índice mitótico (Fletcher et al., 2002). De acordo com esses critérios, o GIST pode ser classificado como de muito baixo risco, baixo risco, risco intermediário e alto risco para comportamento biológico agressivo. Esses critérios demonstram, portanto, que o GIST deve ser considerado como uma neoplasia de potencial comportamento biológico maligno. As definições para essas categorias de risco são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Critérios propostos pelo NIH para classificação dos GIST em grupos de risco para comportamento biológico agressivo

RISCO	TAMANHO (cm)	CONTAGEM DE MITOSES (/50 CGA)
Muito baixo	<2	<5
Baixo	2-5	≤5
Intermediário	<5	6-10
	5-10	≤5
Alto	>5	>5
	>10	qualquer
	qualquer	>10

CGA: campos de grande aumento

3.5 Construção de blocos de “array” de tecido (“tissue microarray” - TMA)

Foram construídos blocos de parafina do tipo “array” de tecido (TMA) utilizando-se um “arrayer” de tecido biológico produzido pela Beecher Instruments, Sun Prairie, EUA (Figura 8). Essa técnica permite a inclusão de grande número de casos em um mesmo bloco de parafina, que ficam representados por cilindros de tecidos, cujo diâmetro pode variar de 0,6 a 2,0 mm, espaçados entre si a uma distância de 1,0 mm, tanto na horizontal quanto na vertical. No presente trabalho, cada caso estava representado por 3 cilindros de tecido consecutivos obtidos a partir dos blocos de parafina “doadores” (blocos originais contendo a neoplasia), com diâmetro de 0,6 mm. A retirada dos cilindros do bloco de parafina “doador” e sua inclusão no bloco de parafina “receptor” (bloco de TMA) é realizada com a ajuda de agulhas especiais. Os cilindros ou amostras de todos os 513

casos incluídos no estudo foram distribuídos num total de 7 blocos “receptores”, obedecendo-se ao mapa de TMA, que registra a disposição e identificação dos casos (Figura 9). Além dos casos em estudo, cada bloco de TMA também apresentava tecidos-controle positivos adequados para a avaliação de todos os anticorpos empregados no estudo imunoistoquímico. Dois cilindros de cada tecido-controle positivo estavam dispostos consecutivamente na linha 8 dos mapas e blocos de TMA.

Figura 8. Fotografia do “array” de tecido utilizado na construção dos blocos de TMA

Mapa para Tissue microarray (TMA)

Responsável: Técnico: Data: 21/set/2007 (sex)

Descrição:

Densidade: ☐ amostras repetidas | vezes (total de 0 cilindros) | Diâmetro dos cilindros: ☐ 0,6mm ☐ 1,0mm ☐ 1,5mm ☐ 2,0mm | Espaçamentos: x = 1,00mm; y = 1,00mm

Linha (x) ▶ ▼ Coluna (y)	A (1,00)	B (2,00)	C (3,00)	D (4,00)	E (5,00)	F (6,00)	G (7,00)	H (8,00)	I (9,00)	J (10,00)	K (11,00)	L (12,00)	M (13,00)	N (14,00)	O (15,00)	P (16,00)	Q (17,00)	R (18,00)	S (19,00)	T (20,00)
01 (1,00)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
02 (2,00)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
03 (3,00)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
04 (4,00)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
05 (5,00)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
06 (6,00)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
07 (7,00)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
08 (8,00)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
09 (9,00)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
10 (10,00)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
11 (11,00)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
12 (12,00)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
13 (13,00)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
14 (14,00)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
15 (15,00)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
16 (16,00)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
17 (17,00)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
18 (18,00)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
19 (19,00)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
20 (20,00)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐

Figura 9. Mapa de TMA. Esse mapa orienta a inclusão dos casos no bloco de TMA e, posteriormente, a identificação dos casos para a interpretação dos resultados obtidos, por exemplo, com a imunoistoquímica

3.6 Imunoistoquímica

Cortes histológicos seriados com espessura 3 μm foram obtidos com micrótomo histológico de cada um dos blocos de TMA e utilizados para o estudo imunoistoquímico. Foi avaliada a expressão imunoistoquímica de CD117 (KIT), CD34, proteína DOG1, PDGFRA, actina de músculo liso, desmina, proteína S-100, antígeno de proliferação celular Ki-67, proteína p53 e da molécula de adesão CD44v3, além das proteínas relacionadas aos receptores para fatores de crescimento EGFR e HER-2.

Os cortes histológicos foram dispostos em lâminas de vidro previamente tratadas com o adesivo poli-D-lisina (Sigma, St. Louis, EUA,

Cód. P7886) e mantidos a 60°C em estufa por 4 horas. A seguir, foi realizada a desparafinação com banhos sucessivos de xilol, passagem em álcool etílico absoluto e lavagem com solução salina tamponada (PBS), com bloqueio da atividade da peroxidase endógena com solução de H₂O₂ 3%. Os métodos de recuperação de epitopos empregados variaram de acordo com o antígeno em investigação: pelo calor em panela de pressão (CD34, proteína p53, antígeno Ki-67 e PDGFRA), vaporizador (actina de músculo liso e CD44v3) ou forno de microondas (com as lâminas incubadas em solução de citrato 0,01M pH 6,0 para CD117, desmina e proteína DOG1) ou por método enzimático (tripsina 0,1% para proteína S-100 e protease XXVI 0,1% para EGFR). Após a recuperação de epitopos, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários “overnight” à 4°C na diluição apropriada e, após nova lavagem em PBS, incubadas por 60 minutos com os respectivos anticorpos secundários (apenas para actina de músculo liso e desmina, com o emprego de anticorpos biotinilados anti-IgG de camundongo, Vector, Burlingame, EUA, Cód. BA-2000), seguindo-se a utilização dos sistemas de detecção conforme instruções do fabricante (Novolink Polímero, Novocastra, Norwell, EUA, Cód. 7161, para CD117, CD34, EGFR, antígeno Ki-67 e PDGFRA; ABC Elite, Vector, Burlingame, EUA, Cód. PK-6102, para actina de músculo liso e desmina; Envision Rabbit, DAKO, Carpinteria, EUA, Cód. K4003, para proteína S-100; e Envision Mouse, DAKO, Carpinteria, EUA, Cód. K4001, para proteína DOG1, CD44v3 e proteína p53) e finalização com tratamento por solução de 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma, St. Louis, EUA, Cód. D5637 1 mg/mL +

Tris-HCl 1M pH 7,4) acrescida de H₂O₂ (concentração final 0,2%), contracoloração com hematoxilina de Mayer e montagem com resina histológica Permount (Fischer Scientific, Pittsburgh, EUA, Cód. SP15-500). Detalhes sobre os antígenos/anticorpos primários, diluições do anticorpo primário e fabricantes estão referidos na Tabela 2. O protocolo empregado para a imunocoloração para proteína HER2 está baseado nas instruções do HercepTest™ fornecidas pelo fabricante (DAKO, Carpinteria, EUA).

Tabela 2 - Especificações dos antígenos, clones dos anticorpos primários, suas diluições e fabricantes empregados no estudo imunoistoquímico

ANTÍGENO	CLONE	DILUIÇÃO	FABRICANTE
CD117 (c-kit)	Policlonal	1:200	DAKO
Actina de músculo liso	1A4	1:400	Zymed
Desmina	D33	1:3200	DAKO
Proteína S-100	Policlonal	1:5000	DAKO
CD34	My10	1:400	BD Biosciences
CD44v3	3G5	1:150	Zymed
EGFR	31G7	1:50	Zymed
Proteína p53	DO-7	1:2000	DAKO
Ki-67	MIB-1	1:4800	DAKO
Proteína DOG1	DOG 1.1	1:50	Stanford University
PDGFRA	C-20	1:750	Santa Cruz

DAKO (Carpinteria, EUA), Zymed (San Francisco, EUA), BD Biosciences (San Jose, EUA), Santa Cruz (Santa Cruz, EUA), Stanford University (Palo Alto, EUA)

Os resultados foram avaliados em microscópio óptico comum. A imunocoloração para CD117 (KIT), CD34, proteína DOG1, actina de músculo liso, desmina, proteína S-100, proteína p53 e molécula de adesão CD44v3 foi interpretada como negativa ou positiva (positiva se >10% das células neoplásicas apresentassem imunocoloração acastanhada na localização antigênica esperada para o anticorpo utilizado). A avaliação do índice de proliferação celular pelo antígeno Ki-67 foi determinada pela semiquantificação em porcentagem (%) de núcleos de células neoplásicas imunocorados, variando de 0 a 100%. A imunocoloração para PDGFRA (padrão citoplasmático/membrana) e EGFR (padrão membrana) foi classificada em escores de acordo com a intensidade da coloração: escore 0 (negativa), escore 1 (positiva em >10% das células neoplásicas, de fraca intensidade), escore 2 (positiva em >10% das células neoplásicas, de moderada intensidade) e escore 3 (positiva em >10% das células neoplásicas, de forte intensidade). A avaliação da expressão de HER-2 foi baseada nos critérios definidos pelo HercepTest™, baseados em escores: escore 0 (negativo: ausência de imunocoloração ou imunocoloração de membrana em <10% das células neoplásicas), escore 1+ (negativo: imunocoloração de membrana fraca/difícilmente perceptível em >10% das células neoplásicas; as células são coradas apenas em parte das suas membranas), escore 2+ (fracamente positivo: imunocoloração completa de membrana de fraca a moderada intensidade em >10% das células neoplásicas) e escore 3+ (fortemente positivo: imunocoloração completa de membrana de forte intensidade em >10% das células neoplásicas).

3.7 Análise de mutação dos genes *KIT* e *PDGFRA*

A análise de mutação dos genes *KIT* e *PDGFRA* foi realizada em 110 dos 513 casos de GIST utilizando-se DNA extraído de fragmentos microdissecados obtidos por cortes em micrótomo histológico dos blocos de parafina originais contendo a neoplasia fixada em formalina referente a esses 110 casos. O DNA extraído foi submetido a reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação dos éxons 11 e 9 do gene *KIT* e éxon 18 do gene *PDGFRA*, com a finalidade de se avaliar a viabilidade do material genético (DNA) desses casos. Sententa e quatro casos, os quais apresentavam DNA adequadamente preservado devido ao sucesso na amplificação dos éxons em estudo, foram avaliados inicialmente para mutação do éxon 11 do gene *KIT* através de sequenciamento direto. Os casos que não apresentassem mutações do éxon 11 do gene *KIT* eram submetidos à análise de mutações do éxon 9 do gene *KIT* e, posteriormente, em não havendo mutações do éxon 9 do gene *KIT*, eram submetidos à análise de mutações do éxon 18 do gene *PDGFRA*.

A metodologia para a análise de mutações dos genes *KIT* e *PDGFRA* está baseada na desparafinação do tecido microdissecado em xilol e passagem por álcool etílico, com extração do DNA a partir de tecido reidratado utilizando-se método salino. A seguir, realizou-se a PCR para amplificação dos éxons em estudo utilizando-se sequências de “primers” descritas na literatura (Corless et al., 2002; Heinrich et al., 2003); foi

considerado um volume de 25 μ L contendo uma mistura de 50 ng do DNA do caso em estudo, 10 mM Tris/HCl (pH 8,3), 40 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 200 M dNTP, 20 μ M de cada “primer” e 0,25 U Platinum Taq polimerase. A PCR foi realizada em um termociclador MJ Research PTC-200 (Global Medical Instrumentation, Ramsey, EUA), com desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, 44 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 54°C por 20 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, com extensão final a 72°C por 5 minutos. O DNA amplificado foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 6%. Os produtos do PCR foram, então, diretamente sequenciados em ambas as direções usando-se o BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, EUA) com “kit” padronizado para reação de sequenciamento. A análise foi realizada em um analisador genético ABI PRISM® 3100 (Applied Biosystems, Foster City, EUA) e a avaliação das sequências foi feita através de inspeção visual com a ajuda do “software” Mutation Surveyor v.2.2 (SoftGenetics, State College, EUA). A Figura 10 ilustra os passos principais da metodologia de análise de mutações dos genes *KIT* e *PDGFRA*.

Figura 10. Representação esquemática da metodologia de análise de mutações dos genes *KIT* e *PDGFRA*

3.8 Hibridização “in situ” por fluorescência (FISH)

A técnica de FISH foi utilizada para se quantificar o número de cópias dos genes *EGFR* e *HER2* empregando-se, respectivamente, a sonda LSI® *EGFR* SpectrumOrange™ (7p12)/CEP®7 SpectrumGreen™ (7p11.1-q11.1), Cód. 32-191053 (Vysis, Abbott Molecular, Des Plaines, EUA) e a sonda LSI® *HER-2* SpectrumOrange™ (17q11.2-q12)/CEP®17 SpectrumGreen™ (17p11.1-q11.1), Cód. 30-161060 (Vysis, Abbott Molecular, Des Plaines, EUA). Foram avaliados 75 casos para quantificação do número de cópias do gene *EGFR* e 71 casos para quantificação do número de cópias do gene *HER2*.

Cortes de 3 μm de espessura obtidos por micrótomo histológico a partir de blocos de TMA foram dispostos em lâminas de vidro e submetidos, nessa ordem, à desparafinação em xilol, hidratação em álcool etílico absoluto, tratamento ácido em 0,2 N HCl, lavagem em água, pré-tratamento com tiocianato de sódio 8,1%, lavagem em água e solução de cloreto de sódio 3 M + citrato de sódio 0,3 M (pH 5,3), digestão enzimática em pepsina 0,8% e lavagem em água e solução de cloreto de sódio 3 M + citrato de sódio 0,3 M (pH 5,3). A seguir, adicionou-se a sonda de forma a cobrir toda a superfície do corte histológico de TMA representado na lâmina, com colocação posterior de lamínula. As lâminas foram submetidas, então, ao processo de desnaturação e hibridização “overnight” pelo calor após a incubação com a sonda. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em solução de cloreto de sódio 3 M + citrato de sódio 0,3 M (pH 5,3) e as lamínulas retiradas. A seguir, as lâminas foram lavadas em solução pós-hibridização pré-aquecida, constituída por cloreto de sódio 3 M + citrato de sódio 0,3 M pH 5,3 e NP-40 0,3% (Cód. 30-804820, Vysis, Abbott Molecular, Des Plaines, EUA), contracoradas com DAPI em “Fluorguard Antifade” (Cód. F201/F202 e Cód. F001, Insitus, Albuquerque, EUA) e montadas com lamínula.

A contagem de sinais fluorescentes laranjas, referentes ao número de cópias dos genes *EGFR* e *HER2*, e de sinais fluorescentes verdes, referentes, respectivamente, aos centrômeros dos cromossomos 7 e 17, foi realizada em um microscópio de fluorescência Zeiss Axio Imager M1 (Carl Zeiss AG, Alemanha) com filtros apropriados para o espectro dos

sinais a serem observados (Chroma Technology GmbH, Alemanha), acoplado a um computador PC (Dell Optiplex, EUA) com os “softwares” Isis e Metafer 4 (Metasystems, Altussheim, Alemanha), os quais analisam as lâminas e quantificam precisamente o número de sinais fluorescentes (Figuras 11 e 12).

Figura 11. Fotografia do sistema Zeiss-Metasystems utilizado para quantificação do número de cópias dos genes *EGFR* e *HER2* por FISH

Figura 12. Fotografia da tela do programa Metafer 4, utilizado para quantificação dos sinais fluorescentes na técnica de FISH

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização clínica

Dos 513 pacientes incluídos no presente trabalho, 258 (50,3%) eram do sexo feminino e 255 (49,7%) eram do sexo masculino. A idade variou de 22 a 92 anos (mediana, 59 anos). Quarenta e sete pacientes tinham idade inferior a 40 anos. A Figura 13 demonstra a distribuição dos pacientes segundo sexo e idade.

Figura 13. Distribuição dos pacientes segundo sexo e idade

Informações clínicas a respeito dos sinais/sintomas referidos pelos pacientes no momento do diagnóstico estavam disponíveis em 107 casos: 54 pacientes referiram dor epigástrica e/ou abdominal, 25 pacientes apresentaram sangramento gastrintestinal e 22 casos foram diagnosticados durante procedimento cirúrgico abdominal, sendo que, em alguns desses

casos, a cirurgia havia sido realizada devido a abdome agudo/obstrução (4 casos). Náusea, vômitos, perda de peso e disfagia foram referidos em poucos casos. Apresentação inicial como metástase hepática foi observada em 12 pacientes.

Os GIST estavam localizados principalmente no estômago (38,4%), seguido pelo intestino delgado (27,1%), intestino grosso incluindo reto (6,6%), esôfago (1,4%) e ânus (0,4%). Vinte casos (3,9%) tinham localização anatômica referida como intestino, não havendo qualquer outra especificação mais detalhada. GIST extragastrintestinais foram diagnosticados na cavidade abdominal sem outra especificação (5,6%), retroperitônio (4,1%), mesentério (2,9%), peritônio (1,5%), pelve (1,4%), pâncreas (1,4%), epíplon (0,8%), próstata/tecido periprostático (0,4%) e envolvendo bexiga urinária (0,2%). Alguns GIST foram inicialmente diagnosticados como metastáticos em 14 casos (2,8%), incluindo fígado (12 casos, 2,4%) e ovários (2 casos, 0,4%). A localização anatômica não estava disponível em 6 casos (1,1%). A Figura 14 ilustra as localizações anatômicas dos GIST no momento do diagnóstico e frequências.

Figura 14. Localização anatômica dos casos de GIST e frequência

Informação a respeito do tamanho do tumor estava disponível em 306 (59,6%) casos, que variou de 0,7 a 39 cm (média, 10,3 cm).

O seguimento (“follow-up”) dos pacientes variou de 0 a 91 meses (média, 25 meses) e informações completas da evolução clínica desses pacientes estavam disponíveis em 189 casos (36,8%): 92 (48,7%) estavam vivos e não apresentavam recidivas e/ou metástases, 97 (51,3%) apresentavam recorrência e/ou metástases e 15 (15,5%) morreram da doença. As metástases foram encontradas principalmente no fígado (43 casos) e na cavidade abdominal (26 casos), incluindo epíplon, mesentério, retroperitônio e peritônio. Metástases de GIST foram infreqüentemente

observadas nos pulmões (3 casos). Metástases em adrenais (1 caso), cerebelo (1 caso) e ovário (2 casos) também foram encontradas.

4.2 Caracterização histopatológica

Considerando o tipo celular, os GIST foram classificados como de células fusiformes em 63,5% dos casos, de células epitelióides em 11,9% deles e misto em 24,6% dos casos. Necrose, calcificação e ulceração mucosa foram encontradas em 26,8%, 1,6% e 18,5% dos casos, respectivamente. A Figura 15 ilustra os tipos celulares do GIST.

Figura 15. Fotomicrografia dos tipos celulares do GIST. A: GIST de células fusiformes (hematoxilina-eosina, X200). B: GIST de células epitelióides com extensa vacuolização (hematoxilina-eosina, X400)

Em relação ao padrão histológico, os GIST de células fusiformes foram classificados nos subtipos hiper celular/sarcomatoso-símile (50,6%), paliçada/vacuolado (37,3%), esclerosante (7,4%), organóide (3,4%) e pleomórfico (1,3%); os GIST de células epitelióides foram classificados nos subtipos hiper celular/sarcomatoso-símile (49,2%), vacuolado (34,4%),

pleomórfico (8,2%), esclerosante (6,6%) e organóide (1,6%); os GIST mistos foram classificados nos subtipos hiper celular/sarcomatoso-símile (65,9%), paliçada/vacuolado (24,6%), esclerosante (4,0%), pleomórfico (3,1%) e organóide (2,4%). Fibras “skeinoid”, consideradas altamente características de GIST, foram encontradas somente em 14 casos (2,7%). Entre esses casos, 12 (85,7%) estavam localizados no intestino delgado. A Figura 16 apresenta fotomicrografias das fibras “skeinoid” e dos subtipos de padrão histológico observados no GIST. É importante referir que a vacuolização paranuclear, como uma característica isolada, foi observada em todos os subtipos de GIST, tendo sido encontrada em 43,5% dos casos incluídos neste estudo.

Figura 16. Fotomicrografias em hematoxilina-eosina de casos de GIST. A: GIST de intestino delgado rico em fibras “skeinoid” (X400), B: GIST hiper celular/sarcomatoso-símile (X400), C: GIST esclerosante (X400), D: GIST subtipo paliçada/vacuolado (X200), E: GIST pleomórfico (X400), F: GIST organóide (X200)

A contagem de mitoses (índice mitótico) variou de 1 até 51 mitoses por 50 campos de grande aumento (CGA), com média de 4 mitoses/50 CGA e mediana de 2 mitoses/50 CGA. Quatorze casos apresentavam índice mitótico superior a 50 mitoses/50 CGA.

Considerando as informações clínicas a respeito do tamanho do tumor e a contagem de mitoses, trezentos e quarenta e três (66,8%) casos puderam ser adequadamente classificados de acordo com os critérios para comportamento biológico agressivo definidos pelo NIH: 14 foram classificados como de muito baixo risco, 46 como de baixo risco, 93 como de risco intermediário e 190 casos como de alto risco para comportamento biológico agressivo. A tabela 3 apresenta a correlação entre as principais características clínicas e os grupos de risco definidos pelo NIH. A tabela 4 correlaciona o tipo celular e índice mitótico com esses grupos de risco.

Tabela 3 – Correlação entre as principais características clínicas e os grupos de risco para comportamento biológico agressivo definidos pelo NIH com as respectivas frequências (%)

CC	MUITO BAIXO	BAIXO	INTERMEDIÁRIO	ALTO
Sexo (M:F)	2:12	16:30	45:48	105:85
Idade (anos)	29-86	30-82	23-89	23-92
Localização Anatômica	Estômago (71,4%)	Esôfago (2,2%)	Estômago (40,9%)	Esôfago (1,0%)
	Delgado (21,5%)	Estômago (60,8%)	Delgado (45,1%)	Estômago (32,1%)
	Grosso (7,1%)		Grosso (4,3%)	
		Delgado (28,2%)	Outras (9,7%)	Delgado (26,3%)
		Grosso (4,4%)		Grosso (7,9%)
		Outras (4,4%)		Fígado (1,6%)
				Extra-GI (18,4%)
				Outras (12,7%)
Tamanho (cm)	0,7-1,9	2-5	3,5-10	1,6-39
“Follow-up”	V-SD (35,7%)	V-SD (50,0%)	V-SD (33,3%)	V-SD (15,8%)
	D (64,3%)		R/M (14,0%)	R/M (27,9%)
	OB (0)	R/M (6,5%)	D (50,5%)	OB (5,3%)
		D (43,5%)	OB (4,3%)	D (53,7%)
		OB (0)		

CC: características clínicas, D: desconhecido, GI: gastrintestinal, OB: óbito, R/M: recidiva e/ou metástase, V-SD: vivo, sem recidiva e/ou metástase

Tabela 4 – Correlação entre o tipo celular e índice mitótico (número de mitoses/50 CGA) e os grupos de risco para comportamento biológico agressivo definidos pelo NIH com as respectivas frequências (%)

CM	MUITO BAIXO	BAIXO	INTERMEDIÁRIO	ALTO
Tipo	CF (78,6%)	CF (73,9%)	CF (59,1%)	CF (60,5%)
celular	CE (7,1%)	CE (10,9%)	CE (10,8%)	CE (13,7%)
	M (14,3%)	M (15,2%)	M (30,1%)	M (25,8%)
Índice	1-2	1-4	1-9	1-50
mitótico				>50 (7,4%)

CE: células epitelióides, CF: células fusiformes, CM: características morfológicas, M: misto

Considerando o grupo de pacientes que estavam vivos e não apresentavam recidivas e/ou metástases, formado por 92 pacientes, 89 casos puderam ser adequadamente classificados segundo os critérios de risco para comportamento biológico agressivo definidos pelo NIH: 5 (5,6%) foram classificados como de muito baixo risco, 23 (25,9%) como de baixo risco, 31 (34,8%) como de risco intermediário e 30 (33,7%) como de alto risco. Nesse grupo, o tamanho médio do tumor foi de 8,0 cm. Sessenta e seis (71,7%) eram morfolologicamente de células fusiformes, 20 (21,8%) eram mistos (de células fusiformes e epitelióides) e 6 (6,5%) eram de células epitelióides. O índice mitótico médio no grupo foi de 3/50 CGA, sendo que somente 6 (6,5%) casos apresentavam mais de 10 mitoses/50 CGA.

No grupo de pacientes que apresentaram recorrência e/ou metástases e/ou morreram da doença, formado por 97 pacientes, 76 casos puderam ser adequadamente classificados segundo os critérios de risco

para comportamento biológico agressivo definidos pelo NIH: 3 (3,9%) como de baixo risco, 15 (19,8%) como de risco intermediário e 58 (76,3%) como de alto risco. Não houve casos classificados como de muito baixo risco. Nesse grupo, o tamanho médio do tumor foi de 13,1 cm. Cinquenta e sete (58,8%) eram morfologicamente de células fusiformes, 24 (24,7%) eram mistos (de células fusiformes e epitelióides) e 16 (16,5%) eram de células epitelióides. O índice mitótico médio no grupo foi de 6/50 CGA, sendo que 24 (24,7%) casos apresentavam mais de 10 mitoses/50 CGA.

Considerando apenas o grupo de pacientes que morreram da doença, 71,4% e 28,6% dos casos foram classificados como de alto risco e risco intermediário, respectivamente.

4.3 Caracterização imunoistoquímica

A expressão de CD117 (KIT) foi observada em 95,7% dos casos, sendo que apenas 4,3% deles (22 casos) foram completamente negativos. A expressão da proteína DOG1, CD34, actina de músculo liso, proteína S-100 e de desmina foi encontrada em 85,9%, 64,7%, 51,4%, 6,7% e 3,7% dos casos, respectivamente. A Figura 17 apresenta fotomicrografias de caso de GIST com expressão difusa de CD117 (KIT) e CD34. A Figura 18 ilustra caso de GIST revelando expressão da proteína DOG1.

Figura 17. Fotomicrografias de imunoistoquímica (contracoloração com hematoxilina de Mayer) de um caso de GIST. A: expressão difusa citoplasmática de CD117/KIT (X400). B: expressão difusa em padrão membrana de CD34 (X200)

Figura 18. Fotomicrografia de imunoistoquímica (contracoloração com hematoxilina de Mayer) de um caso de GIST revelando expressão difusa citoplasmática da proteína DOG1 (X400)

A expressão da proteína p53 foi encontrada em apenas 2,6% dos GIST, sendo que todos esses casos foram classificados como de alto risco para comportamento biológico agressivo pelos critérios do NIH. Não houve expressão da molécula de adesão CD44v3 em todos os casos. O índice de proliferação celular determinado pela expressão do antígeno Ki-67 variou de 1 a 80% (média, 7%; mediana, 5%), sendo superior nos GIST de alto risco para comportamento biológico agressivo. A tabela 5 correlaciona os resultados desses marcadores prognósticos (proteína p53 e antígeno Ki-67) com os grupos de risco para comportamento biológico agressivo definidos pelo NIH. A figura 19 apresenta um caso de GIST classificado como de baixo risco com ausência de expressão da proteína p53 e um caso de GIST classificado como de alto risco com expressão difusa da proteína p53.

Tabela 5 – Correlação entre a expressão imunoistoquímica dos marcadores prognósticos proteína p53 e índice de proliferação celular definido pelo antígeno Ki-67 e os grupos de risco para comportamento biológico agressivo definidos pelo NIH com as respectivas frequências (%)

MP - IHQ	MUITO BAIXO	BAIXO	INTERMEDIÁRIO	ALTO
p53+	0	0	0	3,9%
Ki-67	1-10%	1-20%	1-15%	1-80%
(média)	(3%)	(3%)	(3%)	(10%)

MP – IHQ: marcadores prognósticos avaliados pela imunoistoquímica

Figura 19. A: Fotomicrografia de GIST classificado como de baixo risco para comportamento biológico agressivo (hematoxilina-eosina, X400). B: Fotomicrografia do mesmo caso revelando ausência de expressão nuclear da proteína p53 (coloração imunoistoquímica e contracoloração com hematoxilina de Mayer, X400). C: Fotomicrografia de GIST classificado como de alto risco para comportamento biológico agressivo (hematoxilina-eosina, X400). D: Fotomicrografia do mesmo caso revelando expressão nuclear difusa da proteína p53 (coloração imunoistoquímica e contracoloração com hematoxilina de Mayer, X400)

Com relação à expressão imunoistoquímica da proteína PDGFRA, apenas 5,6% dos casos foram completamente negativos (escore 0) e 94,4% deles apresentaram expressão variável da proteína (escore 1: 42,0%, escore 2: 38,0% e escore 3: 14,4%). A Figura 20 ilustra um caso de GIST com expressão de forte intensidade (escore 3) da proteína PDGFRA.

Figura 20. GIST revelando expressão de forte intensidade (escore 3) da proteína PDGFRA

A expressão imunoistoquímica de EGFR foi observada em 84,4% dos 513 casos. Selecionou-se aleatoriamente um dos blocos de TMA para classificação da expressão de EGFR em escores. Esse bloco continha 79 casos, observando-se expressão variável de EGFR em 76 (96,0%) casos: dez (12,0%) casos foram classificados como escore 1, 21 (27,0%) casos como escore 2 e 45 (57,0%) casos como escore 3. Somente três (4,0%) casos foram classificados como escore 0 (negativo). A figura 21 ilustra a classificação em escores da expressão imunoistoquímica de EGFR.

Figura 21. Fotomicrografias da imunoistoquímica (contracoloração com hematoxilina de Mayer, X200) para EGFR e classificação em escores. A: escore 0. B: escore 1. C: escore 2. D: escore 3

A avaliação da superexpressão da proteína HER2 pelo HercepTest™ foi realizada em 477 casos e todos eles foram classificados como escore 0 (Figura 22), sem qualquer expressão imunoistoquímica dessa proteína.

Figura 22. Fotomicrografia da imunohistoquímica (contracoloração com hematoxilina de Mayer, X400) para a proteína HER2 pelo HercepTest™. Este caso, assim como todos os outros testados, foi classificado como escore 0 (negativo)

4.4 Análise de mutação dos genes *KIT* e *PDGFRA*

Dos 110 casos submetidos à análise de mutação dos genes *KIT* e *PDGFRA*, a amplificação do DNA e a reação de sequenciamento tiveram sucesso em 74 (67,3%) casos. Mutações do gene *KIT* foram encontradas em 46 (62,2%) casos, sendo a maioria delas (43 casos) ocorrendo no éxon 11 (28 deleções, 8 mutações pontuais, 4 duplicações em “internal tandem” e 3 inserções). Apenas 3 casos apresentaram mutações envolvendo o éxon 9 do gene *KIT*, todas do tipo inserção. Mutações envolvendo o éxon 18 do gene *PDGFRA* foram observadas em 6 (8,1%)

casos, sendo 3 mutações do tipo D842V (substituição de valina por ácido aspártico no aminoácido 842) e 3 deleções. Todos esses 6 casos com mutação no éxon 18 do gene *PDGFRA* não expressaram a proteína KIT (CD117) à imunistoquímica. Não foram detectadas mutações envolvendo os éxons 11 e 9 do gene *KIT* e éxon 18 do gene *PDGFRA* em 22 (29,7%) casos. Os casos apresentando mutações no éxon 11 do gene *KIT* estavam localizados principalmente no estômago (39,5%) e intestino delgado (18,6%). Os tumores com mutações no éxon 9 do gene *KIT* estavam localizados no intestino delgado, retroperitônio e fígado. Os casos com mutações envolvendo o éxon 18 do gene *PDGFRA* localizavam-se no estômago (83,3%) e cavidade abdominal (16,7%).

A figura 23 ilustra o sequenciamento de um caso de GIST apresentando mutação do tipo deleção no éxon 11 do gene *KIT*.

Figura 23. Representação gráfica do sequenciamento de um caso de GIST apresentando mutação do tipo deleção envolvendo o éxon 11 do gene *KIT*. A: sequência normal do éxon 11 do gene *KIT*. B: caso de GIST revelando mutação do tipo deleção no éxon 11 do gene *KIT* em que há a deleção da sequência CCT próxima à posição 120

Considerando os GIST que apresentaram mutação do gene *KIT*, houve expressão imunoistoquímica de intensidade variável da proteína PDGFRA em 97,5% dos casos (escore 1: 60,0%, escore 2: 32,5% e escore 3: 7,5%). Considerando os casos com mutação do gene *PDGFRA*, houve expressão imunoistoquímica de intensidade variável da proteína *PDGFRA* em todos os casos (escore 1: 40,0%, escore 2: 40,0% e escore 3: 20,0%).

4.5 Caracterização dos casos de GIST CD117-negativos

Como referido anteriormente, 22 (4,3%) casos não expressaram a proteína KIT (CD117) à imunoistoquímica. Desses 22 casos,

12 pacientes eram do sexo masculino e 10 do sexo feminino. A idade média no momento do diagnóstico foi de 56 anos, variando de 29 a 83 anos. Os tumores estavam localizados no estômago (63,6%), intestino delgado (18,2%), mesentério (13,6%) e cavidade abdominal (4,6%). O tamanho da neoplasia variou de 1 a 39 cm (média, 10,5 cm). Não se observaram diferenças quanto às características morfológicas e demais características imunoistoquímicas. A expressão imunoistoquímica da proteína PDGFRA foi encontrada em 85,0% dos casos (escore 1: 47,0%, escore 2: 41,2% e escore 3: 11,8%). Onze desses casos foram submetidos à análise de mutação, que revelou mutações no éxon 18 do gene *PDGFRA* em 6 (54,5%) casos.

4.6 Pesquisa de amplificação dos genes *EGFR* e *HER2* por FISH

Setenta e cinco casos de GIST foram investigados para amplificação do gene *EGFR* e 71 casos para amplificação do gene *HER2*. Todos esses casos apresentaram 2 sinais laranjas (referentes aos genes em estudo) e 2 sinais verdes (referentes às porções centroméricas dos cromossomos relacionados a esses genes), o que indica ausência de amplificação dos genes *EGFR* (Figura 24A) e *HER2* (Figura 24B) nos casos de GIST avaliados, com razão gene/centrômero de 1. A amplificação gênica é definida por uma razão gene/centrômero igual ou maior que 2.

Figura 24. Fotomicrografias de casos de GIST avaliados por FISH (sondas fluorescentes laranjas e verdes, contracoloração com DAPI). A: 2 sinais laranjas referentes ao gene *EGFR* e 2 sinais verdes referentes à porção centromérica do cromossomo 7, indicando ausência de amplificação do gene *EGFR*. B: 2 sinais laranjas referentes ao gene *HER2* e 2 sinais verdes referentes à porção centromérica do cromossomo 17, indicando ausência de amplificação do gene *HER2*

5 DISCUSSÃO

A literatura vem trazendo, há cerca de 10 anos, muitas publicações sobre GIST, abordando-o sob os mais diferentes aspectos. Muitos têm tratado da patogênese dessa neoplasia, outros estudado seus aspectos clínicos e cirúrgicos e resposta ao tratamento com mesilato de imatinibe. Alguns trabalhos apresentam casos inusitados e outros tantos revisões, porém há um número relativamente limitado de estudos clinicopatológicos sobre GIST, incluindo a correlação com dados imunoistoquímicos e/ou genéticos moleculares (Miettinen et al., 2000; Miettinen et al., 2005; Miettinen et al., 2003; Miettinen et al., 2006; Miettinen et al., 2001; Miettinen et al., 1999; Makar et al., 2002; Zepeda-Gomes et al., 2004; Khoo e Gunn, 2005; Liu et al., 2006; Kim et al., 2005; Urbanczyk et al., 2005; Ueyama et al., 1992; Koay et al., 2005; Li et al., 2005; Orosz et al., 2005; Alvarado-Cabrero et al., 2007; Wang et al., 2001). De acordo com o levantamento bibliográfico realizado, esse é o primeiro estudo clinicopatológico, imunoistoquímico e genético molecular sobre GIST em pacientes brasileiros, além de tratar-se de uma das maiores séries mundiais (513 casos).

As principais características clinicopatológicas observadas neste estudo, incluindo sexo e idade dos pacientes, além de aspectos morfológicos principais como tipo celular e demais características histopatológicas, não mostraram diferenças em relação aos dados apresentados por outros países, como EUA/Finlândia (Miettinen et al., 2000; Miettinen et al., 2005; Miettinen et al., 2003; Miettinen et al., 2006; Miettinen

et al., 2001; Miettinen et al., 1999), Kuwait (Makar et al., 2002), Coréia (Kim et al., 2005), China (Wang et al., 2001), Polônia (Urbanczyk et al., 2005), Austrália (Koay et al., 2005), Taiwan (Li et al., 2005), Hungria (Orosz et al., 2005) e México (Alvarado-Cabrero et al., 2007).

Com relação à localização anatômica, chamou a atenção a maior frequência de casos com localização extra-GI (18,3%) e menor frequência de casos com localização gástrica (38,4%) nesta série em comparação com os dados de literatura, o que provavelmente está relacionado ao fato dos casos serem recebidos em consulta na *Consultoria em Patologia* para opinião diagnóstica e estudo imunoistoquímico e, nessa situação, os GIST de localização gástrica seriam mais frequentemente diagnosticados nos laboratórios de origem do que os casos extragastrentestinais, que causariam mais dúvida diagnóstica. Ainda sobre os casos com localização extragastrentestinal, é interessante atentar para a ocorrência de casos com localização rara como tecido prostático/periprostático, pâncreas e metástases para ovário, encontradas no presente trabalho, embora sejam referidas na literatura (Daum et al., 2005; Lee et al., 2006; Herawi et al., 2006; Irving et al., 2005; Reith et al., 2000).

Embora este trabalho tenha apresentado dados sobre a evolução clínica (“follow-up”) dos pacientes, é importante considerar que há limitações na interpretação dessas informações, devido à grande dificuldade de obtenção desses dados, considerando que os casos estudados foram oriundos das mais diferentes regiões do Brasil, o que dificultou o contato

com os médicos assistentes. Assim, essas informações encontravam-se disponíveis em apenas 36,8% dos casos; além disso, não houve disponibilidade de informações a respeito do tratamento realizado. No entanto, foi possível constatar que a classificação dos GIST de acordo com os critérios propostos pelo NIH (Fletcher et al., 2002), os quais determinam o risco de comportamento biológico agressivo de acordo com o tamanho do tumor e o índice mitótico, correlacionou-se bem com a evolução clínica observada. Assim, verificou-se a maior ocorrência de recidivas e/ou metástases nos casos classificados como de risco intermediário e alto risco, com casos de morte pela doença restritos a esses dois grupos de risco. Dessa forma, foi possível concordar com a literatura, que considera esses critérios como os mais importantes para definição prognóstica do GIST. Quando consideramos dois grupos distintos de evolução clínica, um formado por pacientes vivos que não apresentaram recidiva e/ou metástase e outro constituído por pacientes que apresentaram recidiva e/ou metástase e/ou eventualmente morreram por causa da neoplasia, verificou-se que o tamanho médio do tumor, o índice mitótico, o número de casos classificados como de risco intermediário e alto risco e a frequência de neoplasias com morfologia epitelióide foram superiores neste último grupo em comparação com o primeiro grupo.

As características imunoistoquímicas, em geral, estavam de acordo com a literatura (Fletcher et al., 2002; Mikhael et al., 1994; Sarlomo-Rikala et al., 1998) e a imunocoloração contra a proteína KIT (CD117) foi positiva em 95,7% dos casos incluídos neste trabalho. A proteína DOG1 foi

expressa em 85,9% dos GIST, resultado inferior ao descrito na literatura (West et al., 2004), que é de 97,8%, o que pode estar relacionado ao fato de que o anticorpo utilizado por West et al. (2004) difere do empregado neste estudo (anticorpo policlonal de coelho no estudo de West et al. e anticorpo monoclonal de camundongo neste estudo). A expressão da proteína DOG1 foi observada em 20,0% dos casos com ausência de expressão imunistoquímica da proteína KIT (CD117). Devido à característica de ter sua expressão praticamente restrita aos GIST, a proteína DOG1 pode contribuir para o diagnóstico desses casos não diagnosticados pelo CD117 (KIT).

Devido à escassez de estudos na literatura sobre expressão imunistoquímica de PDGFRA em GIST (Pauls et al., 2005; Peterson et al., 2006; Yi et al., 2005; Rossi et al., 2005), optou-se pela inclusão dessa proteína no painel de imunistoquímico com a finalidade de se estudar melhor suas características. Assim, o estudo imunistoquímico demonstrou expressão frequente (mas de intensidade variável) da proteína PDGFRA, observada em 94,4% dos casos e em 85,0% dos casos CD117-negativos, ao contrário do que é referido por Rossi et al. (2005), que demonstraram expressão exclusiva dessa proteína nos GIST CD117-negativos, sendo que todos os seus casos de GIST CD117-positivos revelaram ausência de expressão imunistoquímica da proteína PDGFRA. Provavelmente questões de ordem técnica podem estar relacionadas a esses resultados tão discrepantes.

O presente estudo também demonstrou a frequente superexpressão da proteína EGFR pela imunoistoquímica, observada em 84,4% dos casos. O EGFR (HER-1) é um receptor com atividade tirosino-quinase que desempenha papel fundamental na regulação de processos celulares normais e na fisiopatologia do câncer. Sabe-se que o EGFR é essencial na mediação de sinais de proliferação e sobrevivência celulares. A ativação da via de sinalização do EGFR está relacionada a um aumento da proliferação celular, angiogênese, metástase e redução da apoptose. A literatura vem apresentando muitos trabalhos que estabelecem um vínculo entre EGFR e alguns tipos de câncer (Chung et al., 2006; Stadlmann et al., 2006; Layfield et al., 2006; Kersting et al., 2006; Hanawa et al., 2006; Sauter et al., 1994), geralmente associado à evolução clínica ruim. Pequenas moléculas que inibem o domínio da tirosina quinase do EGFR têm se tornado novas opções de tratamento de alguns tipos de câncer, como os carcinomas não pequenas células do pulmão (Edelman, 2005). O papel do EGFR têm sido estudado em vários tipos de sarcomas (Dobashi et al., 2004; Thomas et al., 2005; Ganti et al., 2006; Yang et al., 2006; Sato et al., 2005; Moinfar et al., 2005; Hughes et al., 2004; Nielsen et al., 2003; Gusterson et al., 1985), principalmente em sarcomas sinoviais (Bode et al., 2006; Thomas et al., 2005; Nielsen et al., 2003). Por outro lado, poucos trabalhos estudam a relação entre GIST e EGFR (Cai et al., 1999; Lanzafame et al., 2006; Yoo et al., 2004). Cai et al. (1999) estudaram a expressão do fator de crescimento transformador alfa (TGF- α) e do EGFR (HER-1) em GIST utilizando técnicas imunoistoquímicas convencionais. Eles verificaram que a

maioria dos GIST expressavam TGF- α , porém poucos expressavam EGFR (HER-1), o que sugeriria a presença de uma alça autócrina TGF- α /EGFR em GIST e que TGF- α poderia induzir a proliferação das células neoplásicas do GIST através da interação com o HER-1 em pelo menos alguns casos. Lanzafame et al. (2006) relataram um caso de GIST ocorrendo durante a gravidez, o qual demonstrava expressão imunoistoquímica de EGFR, indicando que essa expressão poderia proporcionar informação biológica pertinente para se determinar regimes terapêuticos específicos. Por outro lado, Yoo et al. (2004) analisaram o gene *EGFR* em 60 casos de GIST e não encontraram mutações nos éxons 18, 19 e 21, indicando que o *EGFR* poderia não estar mutado no GIST e que tratamentos anti-EGFR poderiam não ser úteis. Apesar desse achado, Yang et al. (2006) exploraram o efeito do ZD6474, um inibidor do receptor para fator de crescimento vascular-endotelial 2 (VEGFR-2) e do EGFR, em células de cultura GIST-T1, havendo indução da parada do crescimento e apoptose das células. Devido a esses achados contraditórios, a investigação adicional da associação GIST-EGFR era necessária. Neste trabalho, apesar da frequente superexpressão da proteína EGFR, não se observou amplificação do gene *EGFR* por FISH, embora Tornillo et al. (2005) tivessem detectado amplificação gênica em 5,3% dos GIST estudados por eles. Resultados sobre a superexpressão da proteína EGFR na ausência de amplificação gênica foram também obtidos por Bode et al. (2006) em sarcomas sinoviais. Eles estudaram 13 casos de sarcoma sinovial que apresentavam expressão forte (difusa ou focalmente) de EGFR na ausência de amplificação do gene *EGFR*, porém com a

detecção de diversas mutações pontuais nos éxons 18-21 de dois desses casos. Eles sugeriram que esse achado poderia tornar “subset” de sarcomas sinoviais elegíveis para tratamento com inibidores do EGFR. Outros autores (Bredel et al., 1999; Waha et al., 1996) observaram resultados parecidos em gliomas, sendo sugerido que outros mecanismos diferentes da amplificação gênica poderiam explicar a superexpressão da proteína EGFR, destacando-se a ocorrência de mutações ativadoras do gene *EGFR*, aumento da transcrição/tradução do EGFR, redução da destruição protéica e superexpressão dos ligantes dos receptores EGFR (Wang et al., 2007). Considerando que os mecanismos de superexpressão da proteína EGFR não são bem conhecidos e que a possibilidade de que terapias anti-EGFR podem ser úteis para os pacientes com GIST apresentando superexpressão de EGFR, estudos adicionais são necessários, incluindo a pesquisa de mutações do gene *EGFR* em GIST.

O papel da proteína HER2 e do gene homônimo também não é bem conhecido em GIST, com poucos estudos na literatura (Tornillo et al., 2005; Cai et al., 1999). O gene *HER2* codifica uma glicoproteína transmembrânica chamada de HER2 ou erbB2, que pertence à família dos receptores EGFR. Essa glicoproteína está envolvida na ativação de vias intracelulares de sinalização que controlam o crescimento celular, diferenciação, motilidade e adesão. A proteína HER2 é superexpressa em cerca de 20% dos pacientes com câncer de mama, que podem ser beneficiar de terapia alvo-específica anti-HER2 (Slamon et al., 1987; Maguire e Greene, 1989; Tandon et al., 1989; Gusterson et al., 1992;

Dougall et al., 1994; Menard et al., 2004; Johnson e Esteva, 2007; Meric-Bernstam e Hung, 2006). Especificamente em relação ao GIST, Cai et al. (1999) não observaram expressão imunoistoquímica da proteína HER2 em 15 casos de GIST. Tornillo et al. (2005), por sua vez, estudaram 81 casos de GIST por FISH e não encontraram amplificação do gene *HER2*. Devido ao número relativamente pequeno de casos publicados, decidiu-se, neste estudo, pela investigação adicional do papel do *HER2* em GIST, sendo que não se observaram expressão da proteína HER2 pelo HercepTest™ e amplificação gênica por FISH. Esses resultados indicam que não parece haver participação do *HER2* no desenvolvimento e/ou progressão do GIST, o que tornaria a terapia anti-HER2 não elegível para o seu tratamento.

Embora os critérios propostos pelo NIH para se estimar o risco de comportamento biológico agressivo do GIST sejam amplamente utilizados e que consideram dois dos mais importantes fatores prognósticos em GIST divulgados pela literatura, tamanho do tumor e índice mitótico, vários estudos têm sido publicados com a finalidade de se investigar o valor de outros possíveis marcadores prognósticos. O índice de proliferação celular pelo antígeno Ki-67 e a expressão da proteína p53 determinados pela imunoistoquímica têm sido divulgados pela literatura como úteis para definição prognóstica do GIST (Hasegawa et al., 2002; Seidal e Edvardsson, 1999; Carrilo et al., 1997; Hu et al., 2006; Panizo-Santos et al., 2000; Rudolph et al., 1998; Liebermann et al., 2007; Sabah et al., 2006; Feakins, 2005; Hu et al., 2006; Nakamura et al., 2005; Yalcinkaya et al., 2007). Este estudo mostrou que o índice de proliferação celular médio definido pelo

antígeno Ki-67 foi superior no grupo de alto risco em comparação com os demais grupos de risco (10,0% contra 3,0%). Além disso, a expressão da proteína p53, embora infrequente nos casos estudados (2,6%), estava restrita aos casos classificados como de alto risco para comportamento biológico agressivo segundo os critérios do NIH. Investigações adicionais são, entretanto, necessárias para se verificar o real valor prognóstico da proteína p53 em GIST.

A molécula de adesão CD44 e suas isoformas (CD44v3-v6 e v9) são moléculas de adesão que têm papel documentado no desenvolvimento de metástases e/ou invasão local (Sy et al., 1997). Montgomery et al. (2004) demonstraram que a perda da expressão de CD44 estava relacionada com evolução clínica ruim, principalmente da molécula de adesão CD44s ("standard"). Este estudo mostrou ausência de expressão da isoforma v3 (CD44v3) em todos os casos, o que a tornaria possivelmente dispensável devido à sua pouca utilidade na definição prognóstica do GIST. É importante referir também que, apesar de Montgomery et al. (2004) terem observado expressão de CD44v3 em GIST, esse resultado não foi compartilhado pelo presente trabalho, o que está provavelmente relacionado à utilização de diferentes anticorpos. Assim, novos estudos avaliando as demais isoformas merecem ser realizados para se determinar o valor prognóstico dessa família de moléculas de adesão no GIST.

A análise de mutação mostrou que as mutações no éxon 11 do gene *KIT* foram as mais frequentemente encontradas e que as mutações envolvendo o éxon 18 do gene *PDGFRA* foram observadas em grande parte

dos casos com ausência de expressão da proteína KIT (CD117) à imunoistoquímica, resultados concordantes com a literatura (Rubin, 2006; Miettinen e Lasota, 2006; Medeiros et al., 2004). Não foram detectadas mutações envolvendo os éxons 11 e 9 do gene *KIT* e éxon 18 do gene *PDGFRA* em 22 (29,7%) casos, o que certamente está relacionado à presença de mutações em outros éxons dos genes *KIT* e *PDGFRA* ou tipo selvagem (“wild-type”), ou seja, não-*KIT* e não-*PDGFRA*.

É importante frisar que os GIST que apresentaram mutação do gene *KIT* também apresentaram expressão imunoistoquímica de intensidade variável da proteína PDGFRA em 97,5% dos casos, assim como os casos com mutação do gene *PDGFRA*, que também tiveram expressão de intensidade variável da proteína *PDGFRA* em todos os casos. Esses resultados mostraram que a expressão da proteína não estava restrita aos casos com mutação do gene *PDGFRA*, ao contrário do que raros trabalhos na literatura indicam (Pauls et al. 2005; Rossi et al, 2005), sendo discutível sua utilidade na determinação da mutação envolvida. Essa discrepância poderia estar relacionada à metodologia imunoistoquímica empregada.

Chamou a atenção no presente trabalho que o índice de insucesso no procedimento de análise de mutação desses genes foi de 32,7%. Esse resultado se deveu provavelmente à preservação insatisfatória do DNA. Foi observado neste estudo que os casos que apresentavam fragmentos da neoplasia armazenados em parafina por menor período de tempo tinham DNA melhor preservado e, portanto, passível de amplificação. Por esse motivo, os casos de GIST submetidos à análise de mutação foram

os mais recentemente diagnosticados, especificamente entre os anos de 2005 e 2006. A quase totalidade dos casos anteriores a 2005 não apresentava DNA amplificável e, portanto, esses casos foram dispensados da análise de mutação. É possível que ocorra degradação do DNA ao longo dos anos em material de arquivo em parafina, o que interferiria na análise genética de mutações dos genes *KIT* e *PDGFRA*.

Este trabalho, portanto, apresentou as características clinicopatológicas, imunoistoquímicas e moleculares dos tumores estromais gastrintestinais de pacientes brasileiros através do estudo de uma série grande composta de 513 casos, contribuindo para o conhecimento dessas características da neoplasia em nosso país, as quais apresentaram similaridades às referidas por outros autores de diferentes países, indicando não haver influências geográficas na sua determinação.

6 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste estudo levaram às seguintes conclusões:

1. Os casos de GIST de pacientes brasileiros apresentaram características demográficas e de apresentação clínica semelhantes às referidas em outros países pela literatura; o tamanho médio do tumor foi superior no grupo de pacientes que tiveram recorrência e/ou metástase e/ou morreram da doença em comparação com o grupo de pacientes que estavam vivos e não apresentavam recidivas e/ou metástases; com relação à evolução clínica dos pacientes incluídos neste estudo, o grupo de pacientes que tiveram recorrência e/ou metástase e/ou morreram da doença apresentava casos classificados como de risco intermediário e alto risco para comportamento biológico agressivo segundo critérios propostos pelo NIH mais frequentemente em comparação com o grupo de pacientes que estavam vivos e não apresentavam recidivas e/ou metástases; além disso, morte pela doença só foi referida nos casos classificados como de risco intermediário e alto risco;

2. As características morfológicas dos GIST de pacientes brasileiros foram semelhantes às referidas na literatura; o grupo de pacientes que tiveram recorrência e/ou metástase e/ou morreram da doença apresentava mais frequentemente casos com morfologia de células epitelióides e maior índice mitótico em comparação com o grupo de

pacientes que estavam vivos e não apresentavam recidivas e/ou metástases; além disso, a frequência de casos com morfologia mista (de células epitelióides e fusiformes) e de células epitelióides foi superior no grupo constituído por casos classificados como de risco intermediário e alto risco para comportamento biológico agressivo segundo critérios propostos pelo NIH em comparação com o grupo constituído por casos classificados como de muito baixo risco e baixo risco;

3. Com relação à imunoistoquímica, a pesquisa da expressão de CD117 (KIT), embora não específica, confirmou o diagnóstico de 95,7% dos casos de GIST; a expressão da proteína DOG1 contribuiu para o diagnóstico de 20% dos casos de GIST KIT-negativos pela imunoistoquímica; a expressão de PDGFRA foi frequente em GIST e não estava restrita aos casos com mutação do gene *PDGFRA*; o índice de proliferação celular pelo antígeno Ki-67 foi superior nos casos de GIST classificados como de alto risco para comportamento biológico agressivo em relação ao observado nos demais grupos de risco definidos segundo critérios do NIH; a expressão da proteína p53 em GIST foi infrequente (2,6% dos casos), porém todas as neoplasias que expressaram a proteína foram classificadas como de alto risco para comportamento biológico agressivo segundo critérios definidos pelo NIH; não se observou expressão da molécula de adesão CD44v3 em GIST; a expressão de EGFR foi frequente em GIST (84,4% dos casos); não houve superexpressão da proteína HER2 nos casos de GIST utilizando-se o HercepTest™;

4. O perfil genético-molecular de mutações dos genes *KIT* e *PDGFRA* em GIST foi semelhante ao que é referido pela literatura; além disso, a pesquisa de mutações foi útil para o diagnóstico definitivo de GIST nos casos com ausência de expressão de CD117 (KIT) pela imunohistoquímica, pois 54,5% desses casos apresentaram mutações do gene *PDGFRA*;

5. Não se observou amplificação (aumento do número de cópias) dos genes *EGFR* e *HER2* pelo método de FISH nos GIST.

7 REFERÊNCIAS

Alvarado-Cabrero I, Vazquez G, Sierra Santiesteban FI, Hernandez-Hernandez DM, Pompa AZ. Clinicopathologic study of 275 cases of gastrointestinal stromal tumors: the experience at 3 large medical centers in Mexico. *Ann Diagn Pathol*. 2007;11:39-45.

Bode B, Frigerio S, Behnke S, et al. Mutations in the tyrosine kinase domain of the EGFR gene are rare in synovial sarcoma. *Mod Pathol*. 2006;19:541-7.

Bredel M, Pollack IF, Hamilton RL, James CD. Epidermal growth factor receptor expression and gene amplification in high-grade non-brainstem gliomas of childhood. *Clin Cancer Res*. 1999;5:1786-92.

Cai YC, Jiang Z, Vitimberga F, et al. Expression of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in gastrointestinal stromal tumours. *Virchows Arch*. 1999;435:112-5.

Carrillo R, Candia A, Rodriguez-Peralto JL, Caz V. Prognostic significance of DNA ploidy and proliferative index (MIB-1 index) in gastrointestinal stromal tumors. *Hum Pathol*. 1997;28:160-5.

Chung CH, Ely K, McGavran L, et al. Increased epidermal growth factor receptor gene copy number is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. *J Clin Oncol.* 2006;24:4170-6.

Corless CL, Fletcher JA, Heinrich MC. Biology of gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol.* 2004;22:3813-25.

Corless CL, McGreevey L, Haley A, Town A, Heinrich MC. KIT mutations are common in incidental gastrointestinal stromal tumors one centimeter or less in size. *Am J Pathol.* 2002;160:1567-72.

Daum O, Klecka J, Ferda J, et al. Gastrointestinal stromal tumor of the pancreas: case report with documentation of KIT gene mutation. *Virchows Arch.* 2005;446:470-2.

Dobashi Y, Takei N, Suzuki S, et al. Aberration of epidermal growth factor receptor expression in bone and soft-tissue tumors: protein overexpression, gene amplification and activation of downstream molecules. *Mod Pathol.* 2004;17:1497-1505.

Dougall WC, Qian X, Peterson NC, et al. The neu-oncogene: signal transduction pathways, transformation mechanisms and evolving therapies. *Oncogene.* 1994;9:2109-23.

Duensing A, Medeiros F, McConarty B, et al. Mechanisms of oncogenetic KIT signal transduction in primary gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *Oncogene*. 2004;23:3999-4006.

Edelman MJ. An update on the role of epidermal growth factor receptor inhibitors in non-small cell lung cancer. *Semin Oncol*. 2005;32:S3-S8.

Feakins RM. The expression of p53 and bcl-2 in gastrointestinal stromal tumours is associated with anatomical site, and p53 expression is associated with grade and clinical outcome. *Histopathology*. 2005;46:270-9.

Fletcher CD, Berman JJ, Corless C, et al. Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: A consensus approach. *Hum Pathol*. 2002;33:459-65.

Ganti R, Skapek SX, Zhang J, et al. Expression and genomic status of EGFR and ErbB-2 in alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma. *Mod Pathol*. 2006;19:1213-20.

Gusterson B, Cowley G, McIlhinney J, Ozanne B, Fisher C, Reeves B. Evidence for increased epidermal growth factor receptors in human sarcomas. *Int J Cancer*. 1985;36:689-93.

Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, et al. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer

Study Group. *J Clin Oncol*. 1992;10:1049-56.

Hanawa M, Suzuki S, Dobashi Y, et al. EGFR protein overexpression and gene amplification in squamous cell carcinomas of the esophagus. *Int J Cancer*. 2006;118:1173-80.

Hasegawa T, Matsuno Y, Shimoda T, Hirohashi S. Gastrointestinal stromal tumor: consistent CD117 immunostaining for diagnosis, and prognostic classification based on tumor size and MIB-1 grade. *Hum Pathol*. 2002;33:669-76.

Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, et al. PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science*. 2003;299:708-10.

Herawi M, Montgomery EA, Epstein JI. Gastrointestinal stromal tumors (GISTs) on prostate needle biopsy: A clinicopathologic study of 8 cases. *Am J Surg Pathol*. 2006;30:1389-95.

Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, et al. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science*. 1998;279:577-80.

Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA Jr, et al. Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy

number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol.* 2003;21:3798-3807.

Hu TH, Chuah SK, Lin JW, et al. Expression and prognostic role of molecular markers in 99 KIT-positive gastric stromal tumors in Taiwanese. *World J Gastroenterol.* 2006;12:595-602.

Hughes DP, Thomas DG, Giordano TJ, Baker LH, McDonagh KT. Cell surface expression of epidermal growth factor receptor and HER2 with nuclear expression of Her-4 in primary osteosarcoma. *Cancer Res.* 2004;64:2047-53.

Irving JA, Lerwill MF, Young RH. Gastrointestinal stromal tumors metastatic to the ovary: a report of five cases. *Am J Surg Pathol.* 2005;29:920-26.

Johnson PH, Esteva FJ. The use of HER2 modulation in the adjuvant setting. *Curr Oncol Rep.* 2007;9:9-16.

Kersting C, Kuijper A, Schmidt H, et al. Amplifications of the epidermal growth factor receptor gene (EGFR) are common in phyllodes tumors of the breast and are associated with tumor progression. *Lab Invest.* 2006;86:54-61.

Khoo JJ, Gunn A. A clinical and immunohistochemical study of

gastrointestinal stromal tumours. *Malays J Pathol.* 2005;27:9-16.

Kim KM, Kang DW, Moon WS, et al. Gastrointestinal stromal tumors in Koreans: its incidence and the clinical, pathologic and immunohistochemical findings. *J Korean Med Sci.* 2005;20:977-84.

Kindblom LG, Remotti HE, Aldenborg F, et al. Gastrointestinal pacemaker cell tumor (GIPACT): gastrointestinal stromal tumors show phenotypic characteristics of the interstitial cells of Cajal. *Am J Pathol.* 1998;153:1259-69.

Koay MH, Goh YW, Iacopetta B, et al. Gastrointestinal stromal tumours (GISTs): a clinicopathological and molecular study of 66 cases. *Pathology.* 2005;37:22-31.

Lanzafame S, Minutolo V, Caltabiano R, et al. About a case of GIST occurring during pregnancy with immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptor and progesterone receptor. *Pathol Res Pract.* 2006;202:119-23.

Layfield LJ, Willmore C, Tripp S, et al. Epidermal growth factor receptor gene amplification and protein expression in glioblastoma multiforme: prognostic significance and relationship to other prognostic factors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2006;14:91-6.

Lee CH, Lin YH, Lin HY, Lee CM, Chu JS. Gastrointestinal stromal tumor of the prostate: a case report and literature review. *Hum Pathol*. 2006;37:1361-5.

Li CF, Chuang SS, Lu CL, Lin CN. Gastrointestinal stromal tumor (GIST) in southern Taiwan: a clinicopathologic study of 93 resected cases. *Pathol Res Pract*. 2005;201:1-9.

Liebermann DA, Hoffman B, Vesely D. p53 induced growth arrest versus apoptosis and its modulation by survival cytokines. *Cell Cycle*. 2007;6:166-70.

Liu FY, Qi JP, Xu FL, Wu AP. Clinicopathological and immunohistochemical analysis of gastrointestinal stromal tumor. *World J Gastroenterol*. 2006;12:4161-5.

Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. 2004;350:2129-39.

Maguire HC Jr, Greene MI. The neu (c-erbB-2) oncogene. *Semin Oncol*. 1989;16:148-55.

Makar RR, al-Waheeb S, John B, Junaid TA. Gastrointestinal stromal tumors: clinicopathological and immunohistochemical features. *Med Princ Pract.* 2002;11:93-9.

Medeiros F, Corless CL, Duensing A, et al. KIT-negative gastrointestinal stromal tumors: proof of concept and therapeutic implications. *Am J Surg Pathol.* 2004;28:889-94.

Menard S, Casalini P, Campiglio M, Pupa SM, Tagliabue E. Role of HER2/neu in tumor progression and therapy. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61:2965-78.

Meric-Bernstam F, Hung MC. Advances in targeting human epidermal growth factor receptor-2 signaling for cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2006;12:6326-30.

Miettinen M, Furlong M, Sarlomo-Rikala M, Burke A, Sobin LH, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors, intramural leiomyomas, and leiomyosarcomas in the rectum and anus: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 144 cases. *Am J Surg Pathol.* 2001;25:1121-33.

Miettinen M, Kopczynski J, Makhoulf HR, et al. Gastrointestinal stromal tumors, intramural leiomyomas, and leiomyosarcomas in the duodenum: a

clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 167 cases. *Am J Surg Pathol*. 2003;27:625-41.

Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumours. Review on morphology, molecular pathology, prognosis, and differential diagnosis. *Arch Pathol Lab Med*. 2006;130:1466-78.

Miettinen M, Makhlouf H, Sobin LH, 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. *Am J Surg Pathol*. 2006;30:477-89.

Miettinen M, Monihan JM, Sarlomo-Rikala M, et al. Gastrointestinal stromal tumors/smooth muscle tumors (GISTs) primary in the omentum and mesentery: clinicopathologic and immunohistochemical study of 26 cases. *Am J Surg Pathol*. 1999;23:1109-18.

Miettinen M, Sarlomo-Rikala M, Sobin LH, Lasota J. Esophageal stromal tumors: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 17 cases and comparison with esophageal leiomyomas and leiomyosarcomas. *Am J Surg Pathol*. 2000;24:211-22.

Miettinen M, Sarlomo-Rikala M, Sobin LH, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors and leiomyosarcomas in the colon: a clinicopathologic,

immunohistochemical, and molecular genetic study of 44 cases. *Am J Surg Pathol.* 2000;24:1339-52.

Miettinen M, Sobin LH, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors of the stomach: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 1765 cases with long-term follow-up. *Am J Surg Pathol.* 2005;29:52-68.

Mikhael AI, Bacchi CE, Zarbo RJ, et al. CD34 expression in stromal tumors of the gastrointestinal tract. *Appl Immunohistochem.* 1994;2:89-93.

Moinfar F, Gogg-Kamerer M, Sommersacher A, et al. Endometrial stromal sarcomas frequently express epidermal growth factor receptor (EGFR, HER-1): potential basis for a new therapeutic approach. *Am J Surg Pathol.* 2005;29:485-89.

Montgomery E, Abraham SC, Fisher C, et al. CD44 loss in gastric stromal tumors as a prognostic marker. *Am J Surg Pathol.* 2004;28:168-77.

Nakamura N, Yamamoto H, Yao T, et al. Prognostic significance of expressions of cell-cycle regulatory proteins in gastrointestinal stromal tumor and the relevance of the risk grade. *Hum Pathol.* 2005;36:828-37.

Nielsen TO, Hsu FD, O'Connell JX, et al. Tissue microarray validation of

epidermal growth factor receptor and SALL2 in synovial sarcoma with comparison to tumors of similar histology. *Am J Pathol*. 2003;163:1449-56.

Orosz Z, Tornoczky T, Sapi Z. Gastrointestinal stromal tumors: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 136 cases. *Pathol Oncol Res*. 2005;11:11-21.

Panizo-Santos A, Sola I, Vega F, et al. Predicting metastatic risk of gastrointestinal stromal tumors: role of cell proliferation and cell cycle regulatory proteins. *Int J Surg Pathol*. 2000;8:133-44.

Pauls K, Merkelbach-Bruse S, Thal D, Buttner R, Wardelmann E. PDGFRalpha- and c-kit-mutated gastrointestinal stromal tumours (GISTs) are characterized by distinctive histological and immunohistochemical features. *Histopathology*. 2005;46:166-75.

Peterson MR, Piao Z, Weidner N, Yi ES. Strong PDGFRA positivity is seen in GISTs but not in other intra-abdominal mesenchymal tumors: Immunohistochemical and mutational analyses. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2006;14:390-6.

Reith JD, Goldblum JR, Lyles RH, Weiss SW. Extragastrointestinal (soft tissue) stromal tumors: an analysis of 48 cases with emphasis on histologic predictors of outcome. *Mod Pathol*. 2000;13:577-85.

Rossi G, Valli R, Bertolini F, et al. PDGFR expression in differential diagnosis between KIT-negative gastrointestinal stromal tumours and other primary soft-tissue tumours of the gastrointestinal tract. *Histopathology*. 2005;46:522-31.

Rubin BP. Gastrointestinal stromal tumours: an update. *Histopathology*. 2006;48:83-96.

Rudolph P, Gloeckner K, Parwaresch R, et al. Immunophenotype, proliferation, DNA ploidy, and biological behavior of gastrointestinal stromal tumors: a multivariate clinicopathologic study. *Hum Pathol*. 1998;29:791-800.

Sabah M, Cummins R, Leader M, Kay E. Altered expression of cell cycle regulatory proteins in gastrointestinal stromal tumors: markers with potential prognostic implications. *Hum Pathol*. 2006;37:648-55.

Sanders KM. A case for interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*. 1996;111:492-515.

Sarlomo-Rikala M, Kovatich AJ, Barusevicius A, et al. CD117: a sensitive marker for gastrointestinal stromal tumors that is more specific than CD34. *Mod Pathol*. 1998;11:728-34.

Sato O, Wada T, Kawai A, et al. Expression of epidermal growth factor receptor, ERBB2 and KIT in adult soft tissue sarcomas: a clinicopathologic study of 281 cases. *Cancer*. 2005;103:1881-90.

Sauter G, Haley J, Chew K, et al. Epidermal-growth-factor-receptor expression is associated with rapid tumor proliferation in bladder cancer. *Int J Cancer*. 1994;57:508-14.

Savage DG, Antman KH. Imatinib mesylate - a new oral targeted therapy. *N Engl J Med*. 2002;346:683-93.

Seidal T, Edvardsson H. Expression of c-kit (CD117) and Ki-67 provides information about the possible cell of origin and clinical course of gastrointestinal stromal tumours. *Histopathology*. 1999;34:416-24.

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER2/neu oncogene. *Science*. 1987;235:177-82.

Stadlmann S, Gueth U, Reiser U, et al. Epithelial growth factor receptor status in primary and recurrent ovarian cancer. *Mod Pathol*. 2006;19:607-10.

Sy MS, Mori H, Liu D. CD44 as a marker in human cancers. *Curr Opin*

Oncol. 1997;9:108-12.

Takano T, Ohe Y, Sakamoto H, et al. Epidermal growth factor receptor gene mutations and increased copy numbers predict gefitinib sensitivity in patients with recurrent non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23:6829-37.

Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, et al. HER2/neu oncogene protein and prognosis in breast cancer. *J Clin Oncol.* 1989;7:1120-28.

Thomas DG, Giordano TJ, Sanders D, et al. Expression of receptor tyrosine kinases epidermal growth factor receptor and HER2/neu in synovial sarcoma. *Cancer.* 2005;103:830-8.

Tornillo L, Duchini G, Carafa V, et al. Patterns of gene amplification in gastrointestinal stromal tumors (GIST). *Lab Invest.* 2005;85:921-31.

Ueyama T, Guo KJ, Hashimoto H, Daimaru Y, Enjoji M. A clinicopathologic and immunohistochemical study of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer.* 1992;69:947-55.

Urbanczyk K, Limon J, Korobowicz E, et al. Gastrointestinal stromal tumors. A multicenter experience. *Pol J Pathol.* 2005;56:51-61.

Waha A, Baumann A, Wolf HK, et al. Lack of prognostic relevance of

alterations in the epidermal growth factor receptor-transforming growth factor-alpha pathway in human astrocytic gliomas. *J Neurosurg.* 1996;85:634-41.

Wang X, Mori I, Tang W, et al. Gastrointestinal stromal tumors: clinicopathological study of Chinese cases. *Pathol Int.* 2001;51:701-6.

Wang X, Zhang S, MacLennan GT, et al. Epidermal growth factor receptor protein expression and gene amplification in small cell carcinoma of the urinary bladder. *Clin Cancer Res.* 2007;13:953-7.

West RB, Corless CL, Chen X, et al. The novel marker, DOG1, is expressed ubiquitously in gastrointestinal stromal tumors irrespective of KIT or PDGFRA mutation status. *Am J Pathol.* 2004;165:107-13.

Yalcinkaya U, Yerci O, Koc EU. Significance of p53 expression in gastrointestinal stromal tumors. *Hepatogastroenterology.* 2007;54:140-3.

Yang JL, Hannan MT, Russell PJ, Crowe PJ. Expression of HER1/EGFR protein in human soft tissue sarcomas. *Eur J Surg Oncol.* 2006;32:466-8.

Yang Y, Ikezoe T, Nishioka C, et al. ZD6474 induces growth arrest and apoptosis of GIST-T1 cells, which is enhanced by concomitant use of sunitinib. *Cancer Sc.* 2006;97:1404-9.

Yi ES, Strong CR, Piao Z, Perucho M, Weidner N. Epithelioid gastrointestinal stromal tumor with PDGFRA activating mutation and immunoreactivity. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2005;13:157-61.

Yoo NJ, Lee JW, Soung YH, et al. Mutational Analysis of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Gastrointestinal Stromal Tumors. *J Korean Gastric Cancer Assoc*. 2004;4:268-71.

Zepeda-Gomez S, Nuncio JF, Maldonado H, et al. Gastrointestinal stromal tumors: clinical and pathological analysis of 24 cases. *Rev Invest Clin*. 2004;56:443-8.

APÊNDICE

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 13.07.05 **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **442/05** intitulado " **Caracterização de parâmetros anátomo-clínicos, imuno-histoquímicos e moleculares do tumor estromal gastro-intestinal (GIST) e sua eventual correlação com comportamento biológico**", apresentado pelo Departamento de **PATOLOGIA**, inclusive Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parcial e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador(a) Responsável: **Prof.DR. Carlos Eduardo Bacchi**

Pesquisador(a) Executante: **Lisandara Ferreira Lopes**

CAPPesq, 13 de julho de 2005.

PROF. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa