



INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Oncologia

O PAPEL DAS PROTEÍNAS PKC θ , FOSFO-
PKC θ , DOG1 E IGF1R COMO POTENCIAIS
BIOMARCADORES DE DIAGNÓSTICO DOS
TUMORES ESTROMAIS
GASTROINTESTINAIS (GISTs)

Danielle de Almeida Braggio

Rio de Janeiro
Março de 2010



INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Oncologia

O PAPEL DAS PROTEÍNAS PKC θ , FOSFO-PKC θ ,
DOG1 E IGF1R COMO POTENCIAIS
BIOMARCADORES DE DIAGNÓSTICO DOS
TUMORES ESTROMAIS GASTROINTESTINAIS
(GISTs)

Danielle de Almeida Braggio

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação *Stricto Sensu* em
Oncologia do Instituto Nacional de Câncer
para obtenção do título de Mestre em
Oncologia

Orientador: Dr. Carlos Gil Moreira Ferreira
Co-orientadora: Dr^a. Denise Peixoto Guimarães

Rio de Janeiro
Março de 2010

FICHA CATALOGRÁFICA

B813p Braggio, Danielle de Almeida

O papel das proteínas PKC θ , fosfo-PKC θ , DOG1 e IGF1R como potenciais biomarcadores de diagnóstico dos tumores estromais gastrointestinais (GISTs) / Danielle de Almeida Braggio – Rio de Janeiro: INCA, 2010.

xxiv; 129 f. il. color.

Dissertação (Mestrado) – Oncologia – Instituto Nacional de Câncer.

Orientador: Carlos Gil Moreira Ferreira

Co-orientadora: Denise Peixoto Guimarães

Inclui bibliografia.

1. Tumores do estroma gastrointestinal 2. Proteínas proto-oncogênicas C-KIT
3. Proteína quinase C 4. Imunoistoquímica

I. Ferreira, Carlos Gil Moreira II. Guimarães, Denise Peixoto III. Instituto Nacional de Câncer IV. Título

CDD 616.994330635

O papel das proteínas PKC θ , fosfo-PKC θ , DOG1 e IGF1R
como potenciais biomarcadores de diagnóstico dos
tumores estromais gastrointestinais (GISTs)

Danielle de Almeida Braggio

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação *Stricto Sensu* em
Oncologia do Instituto Nacional de Câncer
para obtenção do título de Mestre em
Oncologia

Aprovada em 22 de Março de 2010, pela banca examinadora:

Dra. Vera Pannain

Dra. Ilana Zalberg Renault

Dr. José Cláudio Casali da Rocha

Dr. Pedro Éder Portari Filho

Dr. Claudio Gustavo Stefanoff

Rio de Janeiro
Março de 2010

Dedico esta dissertação às pessoas mais importantes da minha vida e que sempre acreditaram em mim e me deram apoio e amor incondicional:

Meus amados pais Esdra de Almeida e Cirus Magalhães Braggio e a minha querida irmã Flávia de Almeida Braggio

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Dr. Carlos Gil Ferreira**, por ter aberto as portas do INCA para mim e ter permitido o desenvolvimento desse trabalho no laboratório da Coordenação de Pesquisa Clínica e por sua orientação, críticas e sugestões para a melhoria deste trabalho.

À minha co-orientadora, **Dra. Denise Guimarães**, por sua orientação e principalmente pela sua dedicação, paciência e confiança. Muito obrigada por ter sido essa co-orientadora sempre prestativa e sempre pronta a ajudar. Graças a sua orientação, tanto no âmbito profissional, como no pessoal, eu tenho certeza que hoje sou uma profissional e uma pessoa muito melhor do que a que eu era quando comecei a trabalhar no INCA. Além da sua orientação, sua amizade e sua risada contagiante foram essenciais para que eu estivesse sempre motivada, mesmo quando algo dava errado. Esse trabalho, com certeza, é igualmente meu e seu! Muito obrigada por tudo!!

Ao patologista, **Dr. Sérgio Romano**. Tenho plena certeza que a realização desse trabalho seria impossível sem a sua ajuda. Muito obrigada por toda a dedicação na revisão dos casos e por toda paciência para contar as “bolinhas” do TMA. Obrigada, principalmente, pela sua amizade e por sempre ter me ensinado sobre patologia, mesmo que não fosse a dos GISTs. Esses ensinamentos foram de grande importância para o meu crescimento profissional.

Aos meus pais **Cirus Magalhães Braggio** e **Esdra de Almeida Braggio**. Sem eles tudo o que eu conquistei até hoje seria impossível. Muito obrigada por todo o amor, cuidado, atenção, carinho e investimentos (que não foram poucos) que vocês me dedicaram. Obrigada por todos os valores importantíssimos que vocês me passaram, como ética, respeito, educação e muitos outros. Podem ter certeza que tudo isso me transformou na pessoa que eu sou hoje. Muito obrigada também por todas as broncas e puxões de orelhas que vocês me deram e me dão até hoje. Graças a elas, a cada dia eu cresço um pouco mais. Sou eternamente grata a vocês por tudo que já fizeram e que continuam fazendo por mim. Amo muito vocês!

À minha irmã, **Flávia de Almeida Braggio**, por todo carinho, amor, paciência e amizade. Alguns dias nem eu me suporto, mas você está sempre do meu lado me alegrando, me fazendo rir. Muito obrigada por ser a pessoa que você sempre foi comigo! Amo você, irmã!

Ao meu namorado, **Guilherme Romano Torres**, por todo amor, respeito, confiança, carinho, paciência e amizade. Tenha certeza que alguns momentos estressantes da vida se tornaram muito mais leves graças a sua presença e sua ajuda. Muito obrigada por me aguentar mesmo nos meus momentos mais insuportáveis, principalmente na falta de serotonina (*risos*)!!

Muito obrigada também pela paciência para fazer a revisão desta dissertação. Amo você!!

À minha tia, **Ariza Saldanha**, por sempre cuidar de mim como a filha que você não teve.

Ao **Dr. Christopher Corless**, pelo envio do anticorpo anti-DOG1, por toda as discussões, críticas e sugestões que ajudaram na melhoria deste trabalho. Todas elas foram de grande importância.

Aos meus queridos amigos da Coordenação de Pesquisa Clínica: **Cyn (thia Bangoim Marques), Luciene Fontes, João de Séllos, Isabel Nóbrega, Daniele Blasquez, Jânio Mororó, Marcus Valadão, João Paulo Vidal, Ana Carolina Laus e Dr. Marcelo Mamede**. Uma página é muito pouco para agradecer o que cada um de vocês já fez por mim. Primeiro, antes de mais nada, muito obrigada por vocês terem me aceitado com tanto carinho! Nunca poderei me esquecer disso. Muito obrigada pela amizade, pelos momentos de aprendizado, diversão, apoio e desabafos nessa minha jornada no laboratório.

Aos meus “eternos amigos de laboratório”, **Joyce Luana de Moraes, Fernanda Costas, Ana Carolina Dantas e Vitor Hugo Almeida**. Muito obrigada por me ensinarem a trabalhar em equipe, e, principalmente, muito obrigada pela amizade que vocês sempre tiveram por mim, pelos momentos em que a barriga chegava a ficar doendo de tanto dar risadas! Foi muito bom trabalhar com vocês! Vocês não fazem idéia da falta que eu sinto da nossa convivência!

À grande amiga-irmã, **Mariana de Almeida Nogueira**, pela amizade, apoio, risos e por compartilhar muitos momentos bons e ruins comigo (faz parte, não é, amiga?!). Todos os nossos momentos de risos e choros estarão guardados sempre no meu coração!

À **Isabele Ávila Small**, pela ajuda com a análise estatística.

Aos funcionários da Divisão de Patologia, **Priscila, Jaqueline, Maria Thereza, Patrícia**. Muito obrigada pela ajuda técnica com a imuno-histoquímica e com os cortes dos tecidos.

Aos funcionários da Coordenação de Pesquisa Clínica, **Alexandre, Thais, Vera e Sônia**, por sempre terem me ajudado nas burocracias e em tudo mais que eu necessitei. Muito obrigada!

À **Cecília Herculano e Danielle Brito**, da pós-graduação, por toda paciência e ajuda, que foram fundamentais nos anos de realização deste trabalho.

Aos **membros da banca examinadora**, por terem aceito o convite para contribuir com esse trabalho, com discussão, críticas e sugestões.

Ao **Ministério da Saúde** e a empresa farmacêutica **Novartis**, pelo apoio financeiro deste projeto.

“É melhor tentar e falhar do que se preocupar e ver a vida passar.
É melhor tentar, ainda que em vão, do que se sentar fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar, do que em dias frios em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco, do que em conformidade viver.
Mesmo as noites totalmente sem estrelas podem anunciar a aurora de uma
grande realização.”

(Martin Luther King)

RESUMO

Atualmente, os GISTs são diferenciados de outros tumores mesenquimais e direcionados ao tratamento com inibidores de tirosina quinase (TKIs) baseado em características morfológicas e na detecção da proteína KIT por imuno-histoquímica. No entanto, aproximadamente 5% dos tumores com características morfológicas de GIST não expressam KIT (GIST KIT-negativo), mas se comportam clinicamente semelhante aos GISTs KIT-positivo. Assim, um diagnóstico preciso de GIST é crucial para tornar os GISTs KIT-negativo elegíveis ao tratamento com TKIs. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo caracterizar o *status* mutacional dos receptores tirosina quinase (KIT e PDGFRA) e avaliar o valor de PKC θ , fosfo-PKC θ , DOG1 e IGF1R, através da imuno-histoquímica, como possíveis marcadores de diagnóstico dos GISTs. Após aprovação do estudo pelo CEP-INCA, 131 tumores foram selecionados através de um levantamento retrospectivo de tumores tratados no INCA entre 1993 e 2007 e reavaliados morfolologicamente. Os GISTs (KIT-negativo; n=22 e KIT-positivo; n=46) foram avaliados com imuno-histoquímica também para os marcadores usualmente utilizados no diagnóstico de GISTs (KIT, CD34, S100 e desmina). Os tumores mesenquimais não-GIST (n = 31) e os tumores não-GIST KIT-positivo (n = 32) foram utilizados como grupos de comparação nas análises estatísticas. A análise de imuno-histoquímica de PKC θ , fosfo-PKC θ , DOG1 e IGF1R e dos outros marcadores foi realizada utilizando um *tissue microarray* construído a partir dos tumores incluídos nesse estudo. Para quantificar a marcação de PKC θ , fosfo-PKC θ , DOG1 e IGF1R, um *score* foi calculado multiplicando a intensidade de marcação pela porcentagem de células positivas. As mutações nos genes *PDGFRA* (exons 12, 14, 18) e *KIT* (exons 9, 11,13 e 17) foram examinados em 17 dentre os 22 GISTs KIT-negativo pelo sequenciamento automático. O teste do χ^2 e de Mann-Whitney foram utilizados para comparar as expressões de PKC θ , fosfo-PKC θ , DOG1 e IGF1R entre os grupos de tumores incluídos. Os grupos de estudo foram estratificado pela imunofenotipagem usando CD34, desmina e S100. A frequência de positividade de PKC θ nos GISTs (76,9%) e nos GISTs KIT-negativo (63,6%) foi significativamente maior do que nos tumores

mesenquimais não-GIST (10,7%) ($P<0.001$; $P<0.001$) e do que nos tumores não-mesenquimais KIT-positivo (34,4%) ($P<0.001$; $P=0.034$, respectivamente). Em relação a fosfo-PKC θ , a expressão dessa proteína acompanhou a expressão de PKC θ total. Da mesma forma, a frequência de positividade de DOG1 nos GISTs (89,6%) e nos GISTs KIT-negativo (81,8%) foi significativamente maior do que nos tumores mesenquimais não-GIST (10%) ($P<0,001$; $P<0.001$, respectivamente) e do que nos tumores não-mesenquimais KIT-positivo (18,8%) ($P<0.001$; $P<0.001$, respectivamente). Em relação à frequência de positividade de IGF1R foi observada uma pequena diferença, mas significativa, entre os GISTs e tumores mesenquimais não-GIST (91,5% versus 75,9%; $P=0.044$). Porém, não foi encontrada diferença significativa entre a frequência de expressão de IGF1R dos GISTs e nos tumores não-mesenquimais KIT-positivo (91,5% versus 100%; $P=0.113$). A diferença na frequência de expressão da proteína IGF1R no grupo dos GISTs KIT-negativo não foi significativa quando comparada aos tumores mesenquimais não-GISTs (84,2% versus 75,9%; $P=0.486$). Entretanto, a frequência de expressão de IGF1R se encontrou tão elevada nos tumores não-mesenquimais KIT-positivo que a diferença foi significativa quando comparados aos GISTs KIT-negativo, mas dessa vez mostrando a associação do IGF1R com os tumores não-mesenquimais KIT-positivo (100 versus 84,2%, respectivamente; $P=0.030$). Ainda, foram encontradas mutações no gene *PDGFRA* em 7/17 (41.2%) (exon 18, 17.6%; exon 12, 17.6%; exon 14, 5.9%) e no gene *KIT* em 1/14 (5.9%; éxon 9) dos tumores analisados. Em contraste com estudos anteriores, não houve predominância de mutações no exon 18 do gene *PDGFRA*. Neste estudo ainda foi demonstrado, por imuno-histoquímica, a presença de fosfo-PKC θ e IGF1R nos GISTs KIT-negativo. Neste estudo, PKC θ e DOG1 conseguiram diferenciar os GISTs, tanto KIT-positivo quanto KIT-negativo, dos tumores não-GIST sugerindo que possam vir a ser usado como um potencial biomarcador de diagnóstico para os GISTs KIT-negativo.

Palavras-chaves: GIST KIT-negativo, PKC θ , DOG1, IGF1R, imuno-histoquímica, mutação, *PDGFRA*, *KIT*.

ABSTRACT

Currently, GIST is differentiated from other mesenchymal tumors and directed to treatment with tyrosine kinase inhibitors (TKIs) based on morphologic characteristics and immunohistochemical detection of KIT. Nevertheless, 5% of tumors with clinicopathologic features of GIST lack KIT expression (KIT-negative GIST). A precise diagnosis of GIST is crucial to make KIT-negative GISTs eligible for treatment with TKIs in Brazil. Thus, our goal was to characterize mutational status of tyrosine kinase receptors (KIT and PDGFRA) and to evaluate by immunohistochemistry (IHC) the value of PKC θ , phospho-PKC θ , DOG1 and IGF1R as potential diagnostic marker for KIT-negative GISTs. After study approval by Institutional Review Board, 131 tumors were selected through a retrospective survey of tumors treated at INCA between 1993 and 2007 and morphologically re-evaluated by a pathologist (S.R.). Besides morphological features, GISTs (KIT-negative, n=22 and KIT-positive, n=46) were also analyzed by IHC for a panel of markers that are commonly used for differential diagnosis of mesenchymal tumors (CD34, S100 and desmin). As controls, we included mesenchymal non-GIST tumors (n=31) and non-mesenchymal KIT-positive tumors (n=32). Analysis of immunohistochemistry for PKC θ , phospho-PKC θ , DOG1 and IGF1R and other markers was performed using a tissue microarray constructed containing cores representative of which tumors included in this study. To quantify the staining, a score were calculated by multiplying the intensity value by the percentage of positive cells. Mutational analysis in *PDGFRA* gene (exons 12, 14, 18) and *KIT* gene (exons 9, 11,13 and 17) were performed in 17 out of 22 KIT-negative GISTs by direct sequencing. The χ^2 and Mann-Whitney tests were used to associate the presence of PKC θ , phospho-PKC θ , IGF1R and DOG1 among the tumors included. The frequency of PKC θ positivity was significantly higher in GISTs (76.9%) and in KIT-negative GISTs (63.6%) when compared with non-GIST mesenchymal tumors (10.7%) ($P<0.001$; $P<0.001$, respectively) and non-mesenchymal KIT-positive tumors (34.4%) ($P<0.001$; $P=0.034$, respectively). Regarding phospho-PKC θ , its expression paralleled the expression of total PKC θ . Similarly, GISTs (89.6%) and KIT-negative GISTs (81.8%) showed a

significantly higher frequency of DOG1 expression when compared with non-GIST mesenchymal tumors (10.0%) ($P<0.001$; $P<0.001$, respectively) and non-mesenchymal KIT positive tumors (18.8%) ($P<0.001$; $P<0.001$, respectively). Regarding the frequency IGF1R positivity it was observed a small, but significant difference between GISTs and non-GIST mesenchymal tumors (91.5% versus 75.9%, $P=0.044$). However, we found no significant difference in the frequency of IGF1R positivity in GISTs when compared to non-mesenchymal KIT-positive tumors (91.5% versus 100%, $P=0.113$). The frequency of IGF1R positivity in KIT-negative GISTs was not significantly different from non-GIST mesenchymal tumors (84.2% versus 75.9%, $P=0.486$). On the other hand, the frequency of IGF1R positivity was higher in non-mesenchymal KIT-positive tumors than in KIT-negative GISTs (100 versus 84.2%, respectively, $P=0.030$). With respect to other markers, CD34 was detected in 59.1% of KIT-negative GISTs and 87% of KIT-positive GISTs, desmin in 13.6% of KIT-negative GISTs and 17.8% of GISTs KIT - positive. None KIT-negative GISTs expressed S-100, but S100 was detected in 2 (4.4%) KIT-positive GISTs. Further, *PDGFRA* mutations were found in 7/17 (41.2%) (exon 18, 17.6%, exon 12, 17.6%, exon 14, 5.9%) tumors analyzed. *KIT* mutation was found in 1/14 (5.9%; exon 9) tumors analyzed. In contrast to previous reports, there was no predominance of *PDGFRA* exon 18 mutations in our KIT-negative GISTs. In this study we also demonstrated, by immunohistochemistry, the expression of phospho-PKC θ and IGF1R in KIT-negative GISTs. In this study PKC θ and DOG1 could differentiate GIST, both KIT-positive and KIT-negative tumors, from non-GIST tumors and emerged as potential diagnostic biomarkers for KIT-negative GISTs.

Keywords: KIT-negative GISTs, PKC θ , DOG1, IGF1R, immunohistochemistry, mutation, *PDGFRA*, *KIT*

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Sinalização dos receptores KIT e PDGFRA nos GISTs | 04 |
| Figura 2. Mecanismo de ação do mesilato de imatinibe..... | 05 |
| Figura 3. Morfologia típica dos GISTs..... | 07 |
| Figura 4. Esquema da parede muscular do intestino delgado..... | 09 |
| Figura 5. Transformação das Células Intersticiais de Cajal (ICC) em GIST.... | 10 |
| Figura 6. Esquema da via de sinalização da proteína PKC θ ativada pelo receptor KIT ou PDGFRA..... | 14 |
| Figura 7. Esquema representando a via de sinalização do receptor IGF1R..... | 18 |
| Figura 8. Esquema reproduzindo a montagem do bloco de <i>Tissue Microarray</i> (TMA) para esse estudo, realizado no departamento de anatomia patológica do Hospital A.C.Camargo..... | 27 |
| Figura 9. Lâmina construída a partir do corte de 4 μ M após a coloração com HE..... | 28 |
| Figura 10. Esquema mostrando as principais etapas da técnica de imunohistoquímica utilizada nesse estudo..... | 29 |
| Figura 11. Esquema reproduzindo a extração de DNA utilizada nesse estudo..... | 38 |
| Figura 12. Esquema reproduzindo a leitura do sequenciador automático utilizado nesse estudo..... | 46 |

| | |
|---|-----|
| Figura 13. Expressão das proteínas KIT, CD34, desmina e S100 nos GISTs e nos tumores mesenquimais não-GIST (40X)..... | 52 |
| Figura 14. Expressão de KIT e PKC θ em casos representativos de GISTs e tumores não-GIST..... | 57 |
| Figura 15. Expressão de KIT e fosfo-PKC θ em casos representativos de GISTs e tumores não-GISTs..... | 62 |
| Figura 16. Casos representativos da imuno-histoquímica para DOG1 nos grupos estudados..... | 67 |
| Figura 17. Imuno-histoquímica de casos representativos, mostrando o padrão de expressão de KIT e IGF1R..... | 72 |
| Figura 18. Exemplo de cromatograma resultante do sequenciamento do DNA de um GIST KIT-negativo, mostrando um tumor mutado para o gene <i>PDGFRA</i> | 76 |
| Figura 19. Hipótese de como seria a sequência para a utilização do painel de marcadores contendo as proteínas KIT, CD34, DOG1, PKC θ e o <i>status</i> mutacional no diagnóstico dos GISTs..... | 107 |

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Comparação entre as frequências de positividade da proteína PKC θ dos grupos de GISTs e GISTs KIT-negativo com aquelas dos grupos tumorais mesenquimais não-GIST e não-mesenquimais KIT-positivo..... 58
- Gráfico 2.** Gráfico *box-plot* com os valores da mediana da expressão de PKC θ nos diferentes grupos tumorais incluídos..... 59
- Gráfico 3.** Associação da frequência de positividade da proteína fosfo-PKC θ nos grupos tumorais incluídos..... 63
- Gráfico 4.** Gráfico *box-plot* com os valores da mediana da expressão de fosfo-PKC θ nos diferentes grupos tumorais incluídos..... 64
- Gráfico 5.** Comparação entre as frequências de positividade da proteína DOG1 nos grupos tumorais incluídos..... 68
- Gráfico 6.** Gráfico *box-plot* mostrando a diferença do *score* da mediana da expressão de DOG1 nos diferentes grupos tumorais incluídos..... 69
- Gráfico 7.** Análise da associação da diferença na frequência de positividade da proteína IGF1R nos grupos tumorais incluídos..... 73
- Gráfico 8.** Gráfico *box-plot* mostrando a diferença do *score* da mediana da expressão de IGF1R entre os diferentes grupos tumorais incluídos..... 74

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Características dos anticorpos utilizados nesse estudo..... | 31 |
| Tabela 2. Classificação da expressão por imuno-histoquímica das proteínas KIT, CD34, S100 e desmina..... | 34 |
| Tabela 3. Critérios para classificação da intensidade de marcação das células tumorais..... | 35 |
| Tabela 4. Características dos iniciadores utilizados para amplificar os exons 12, 14 e 18 do gene <i>PDGFRA</i> | 40 |
| Tabela 5. Reagentes, concentrações e volumes utilizados para a amplificação dos exons 12, 14 e 18 do gene <i>PDGFRA</i> por PCR..... | 41 |
| Tabela 6. Características dos iniciadores utilizados para amplificação dos éxons 9, 11, 13 e 17 do gene <i>KIT</i> | 42 |
| Tabela 7. Reagentes, concentrações e volumes utilizados para amplificar os éxons 9, 11, 13 e 17 do gene <i>KIT</i> por PCR..... | 43 |
| Tabela 8. Expressão de CD34, S100 e desmina nos GISTs e nos tumores mesenquimais não-GIST..... | 50 |
| Tabela 9. Frequência de positividade de expressão das proteínas PKC θ , fosfo-PKC θ , DOG1 e IGF1R nos GISTs e nos tumores não-GIST..... | 56 |
| Tabela 10. Características clínica, histológica, de imuno-fenotipagem e mutacional dos GISTs KIT-negativo..... | 77 |
| Tabela 11. Combinações de marcadores para o diagnóstico dos GISTs KIT-negativo..... | 79 |

| | |
|---|-----|
| Tabela 12. Estudos que analisaram PKC θ em GISTs..... | 88 |
| Tabela 13. Estudos que analisaram PKC θ nos GISTs KIT-negativo..... | 90 |
| Tabela 14. Estudos que analisaram DOG1 nos GISTs..... | 96 |
| Tabela 15. Estudos que analisaram a expressão de IGF1R nos GISTs KIT-positivo..... | 101 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------------|---|
| A | Adenina |
| AKT | Proteína AKT |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| BSA | Albumina de soro bovino |
| C | Citosina |
| cDNA | DNA complementar |
| CEP | Comitê de Ética em Pesquisa |
| D | Ácido Aspártico |
| DAB | 3,3' tetrahidroclorídrico diaminobenzidina |
| ddNTP | Desixirribonucleotideo trifosfatado marcado com corante |
| DEPC | Dietilpirocarbonato |
| dHPLC | Cromatografia líquida desnaturante de alta performance |
| DIPAT | Divisão de Patologia |
| DNA | Acido desoxirribonucléico |
| dNTP | Desixirribonucleotideo trifosfatado |
| <i>DOG1</i> | Gene codificante da proteína DOG1 |
| DOG1 | Proteína DOG1, <i>Discovered on GIST</i> |
| E | Ácido glutâmico |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| Ex | Exon |
| Fosfo-PKC θ | Proteína PKC θ fosforilada no resíduo T538 |
| G | Guanina |
| Gli | Glicina |
| GIST | Tumor estromal gastrointestinal |
| HE | Hematoxilina-eosina |
| HCl | Cloreto de Hidrogênio |
| HSP90 | Heat shock protein 90 |
| H ₂ O | Óxido de hidrogênio |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de hidrogênio |
| ICC | Célula Intersticial de Cajal |
| IGF | Fator de crescimento insulina-símile |
| IGF1R | Receptor do fator de crescimento insulina-símile 1 |

| | |
|-------------------|--|
| IGFBP | Proteína ligadora de fator de crescimento insulina-símile |
| INCA | Instituto Nacional de Câncer |
| IR | Receptor de insulina |
| K | Lisina |
| KCl | Cloreto de potássio |
| <i>KIT</i> | Gene que codifica o receptor KIT |
| KIT | Receptor tirosina quinase |
| M | Molar |
| MAPK | Proteína quinase ativada por mitógenos |
| Met | Metionina |
| MgCl ₂ | Cloreto de Magnésio |
| mL | Mililitro (s) |
| mM | Milimolar |
| NCBI | <i>National Center for Biotechnology Information</i> |
| NFKB | Fator Nuclear K B |
| nm | Nanômetro (s) |
| P53 | Proteína supressora de tumor P53 |
| pb | Pares de base |
| PBS | Solução salina de tampão fosfato |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| pH | Potencial Hidrogenioiônico |
| <i>PDGFRA</i> | Gene codificante do receptor PDGFRA |
| PDGFRA | Receptor do fator de crescimento derivado das plaquetas alfa |
| PI3k | Fosfatidilinositol |
| PKC θ | Proteína quinase C Teta |
| <i>PRKCQ</i> | Gene que codifica a proteína PKC θ |
| RPM | Rotações por minuto |
| RAS | Vírus do sarcoma de rato |
| SCF | <i>Stem Cell Factor</i> |
| SPSS | <i>Statistical Package for Social Sciences</i> |
| SUS | Sistema Único de Saúde |
| T | Timina |
| TCR | Receptor de células T |
| TE | Tampão Tris,EDTA |

| | |
|----------------|---------------------------|
| TBE | Tampão Tris, Borato, EDTA |
| TMA | <i>Tissue microarray</i> |
| W | Triptofano |
| WT | <i>Wild-type</i> |
| V | Valina |
| μg | Micrograma (s) |
| μL | Microlitro (s) |
| μm | Micrômetro (s) |
| μM | Micromolar (s) |
| χ ² | Qui-quadrado |

SUMÁRIO

| | |
|---|-------|
| RESUMO | ix |
| ABSTRACT | xi |
| LISTA DE FIGURAS | xiii |
| LISTA DE GRÁFICOS | xv |
| LISTA DE TABELAS | xvi |
| LISTA DE ABREVIATURAS | xviii |
| 1. INTRODUÇÃO | 01 |
| 1.1. GISTs: importância do conhecimento das mutações em <i>KIT</i> e <i>PDGFRA</i> para o tratamento..... | 02 |
| 1.2. Classificação histológica e diagnóstico dos GISTs..... | 06 |
| 1.3. Possibilidades de novos marcadores em GISTs..... | 12 |
| 1.3.1. Proteína Tirosina quinase PKC θ | 13 |
| 1.3.2. Proteína DOG1..... | 15 |
| 1.3.3. Receptor do fator de crescimento insulina-símile 1 (IGF1R)..... | 17 |
| 1.4. Mutação oncogênica de <i>PDGFRA</i> e <i>KIT</i> | 20 |
| 2. OBJETIVOS | 21 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 23 |
| 3.1. Pacientes e amostras tumorais..... | 24 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2. Análise da expressão das proteínas PKC θ , fosfo-PKC θ , DOG1 e IGF1R..... | 25 |
| 3.2.1. Construção do <i>Tissue Microarray</i> (TMA)..... | 26 |
| 3.2.2. Imuno-histoquímica..... | 28 |
| 3.2.3. Quantificação..... | 33 |
| 3.3. Análise da mutação dos genes <i>PDGFRA</i> e <i>KIT</i> nos tumores GISTs KIT-negativo..... | 35 |
| 3.3.1. Extração do DNA genômico a partir dos tecidos tumorais inseridos em parafina..... | 36 |
| 3.3.2. Quantificação e análise da qualidade do DNA..... | 39 |
| 3.3.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação dos exons 12, 14 e 18 do gene <i>PDGFRA</i> | 39 |
| 3.3.4. Reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação dos exons 9, 11, 13 e 17 do gene <i>KIT</i> | 41 |
| 3.3.5. Purificação do produto de PCR..... | 43 |
| 3.3.6. Sequenciamento automático..... | 44 |
| 3.3.7. Análise nas alterações nas sequências dos genes <i>PDGFRA</i> e <i>KIT</i> | 45 |
| 3.4. Análises estatísticas..... | 47 |
| 4. RESULTADOS..... | 48 |
| 4.1. Características clinico-patológicas dos pacientes incluídos..... | 49 |
| 4.2. Expressão de CD34, S100 e desmina nos GISTs e nos tumores mesenquimais não-GIST..... | 49 |

| | |
|--|-----------|
| 4.3. Expressão de PKC θ , fosfo-PKC θ , DOG1 e IGF1R nos GISTs e nos tumores não-GIST..... | 53 |
| a. Expressão da proteína PKC θ | 53 |
| b. Expressão da proteína fosfo-PKC θ | 60 |
| c. Expressão da proteína DOG1..... | 65 |
| d. Expressão da proteína IGF1R..... | 70 |
| 4.4. Análise mutacional..... | 75 |
| 4.5. Combinação de marcadores (CD34, PKC θ , DOG1 e <i>status</i> mutacional) entre os GISTs KIT-negativo..... | 78 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 80 |
| 5.1. Perfil dos pacientes com GISTs incluídos nesse estudo em comparação com o perfil de pacientes incluídos nos outros estudos de biomarcadores em GISTs..... | 83 |
| 5.2. Grupos de estudo estratificados pela morfologia e imunofenotipagem..... | 84 |
| 5.3. PKC θ expressa em elevada frequência nos GISTs..... | 87 |
| 5.4. PKC θ distinguiu os GISTs dos tumores mesenquimais não-GIST e dos tumores não-mesenquimais KIT-positivo..... | 91 |
| 5.5. Proteína quinase c θ fosforilada (fosfo-PKC θ) acompanhou os resultados da proteína total..... | 93 |
| 5.6. A frequência de expressão da proteína DOG1 foi altamente detectada nos GISTs..... | 95 |

| | |
|--|------------|
| 5.7. A proteína DOG1 foi capaz de distinguir os GISTs dos tumores não-GIST..... | 98 |
| 5.8. IGF1R está altamente expressa nos GISTs, inclusive nos GISTs KIT-negativo..... | 99 |
| 5.9. IGF1R não foi capaz de distinguir os GISTs dos tumores não-GIST..... | 101 |
| 5.10. Análises de alterações em <i>PDGFRA</i> e <i>KIT</i> | 103 |
| 5.11. Potencial combinação de painel de marcadores (CD34, PKC θ , DOG1 e <i>status</i> mutacional) para o diagnóstico dos GISTs KIT-negativo..... | 105 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 108 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 110 |
| 8. ANEXOS..... | 125 |
| 8.1. Anexo I..... | 126 |
| 8.2. Anexo II..... | 127 |
| 8.3. Anexo III..... | 128 |
| 8.4. Anexo IV..... | 129 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. GISTs: IMPORTÂNCIA DO CONHECIMENTO DAS MUTAÇÕES EM *KIT* E *PDGFR* PARA O TRATAMENTO

Os tumores estromais gastrointestinais (GISTs), neoplasias mesenquimais mais frequentes do trato gastrointestinal, formam um grupo de tumores que vem despertando especial interesse entre os oncologistas, patologistas e pesquisadores pelas seguintes características: resistência quase absoluta à quimioterapia e à radioterapia, elevada frequência de mutações com ganho de função no gene que codifica o receptor com função de tirosina quinase KIT e o potencial terapêutico promissor da droga inibidora da atividade de tirosina quinase, STI571 (Gleevec™, Novartis, Basel, Suíça).

Nos GISTs, a ressecção cirúrgica com intenção curativa é considerada o tratamento de escolha para os tumores localizados. Por outro lado, os tumores não-ressecáveis ou metastáticos apresentam elevadas taxas de resistência tanto à quimioterapia citotóxica clássica quanto, à radioterapia [Suster, 1996].

A grande maioria dos GISTs apresenta mutações com ganho de função no gene *KIT* (NCBI, referência NG_009250.1), que está localizado no cromossomo 4, posição q11-q12, indicando que a ativação de KIT representa um fator essencial no desenvolvimento e progressão desse tumor [Rubin e colaboradores, 2001; Sandberg e colaboradores, 2002]. O proto-oncogene *KIT* apresenta 21 exons e codifica uma proteína transmembrana de peso molecular de 145.000 kD (OMIM #164920). Essa proteína é estruturalmente dividida em três regiões: uma região de ligação extracelular, uma região transmembrana e uma região intracelular que contém os domínios juxtamembrana e o de tirosina quinase [Hubbard, 2004; Pawson, 2002]. O receptor KIT é um membro da família dos receptores de tirosina quinase da sub-classe III que inclui dois outros membros, FLT3 e PDGFR. A interação do ligante SCF (“stem cell factor”) ao receptor KIT resulta em autofosforilação nas tirosinas localizadas na região intracelular, seguida pela fosforilação de proteínas comprometidas com várias vias de sinalização intracelular [Blume-Jensen e colaboradores, 1991]. O domínio juxtamembrana, codificado pelo exon 11, é considerado o pivô da transdução de sinal KIT devido, tanto à interação com fosfatases, quanto à

modulação da atividade catalítica de KIT. Mutações nesta região causam dimerização do receptor e ativação de tirosina quinase independentemente da presença do ligante [Rossi e colaboradores, 2006; Rubin e colaboradores, 2001].

A maioria das mutações encontradas no gene *KIT* estão localizadas na região que codifica para os domínios transmembrana e juxtamembrana da proteína [Hirota e colaboradores, 1998; Nishida e colaboradores, 1998], conduzindo à ativação da tirosina quinase independentemente do ligante e promovendo, assim, o desenvolvimento e crescimento do tumor. Nos tumores onde a mutação no exon 11 não foi identificada, as mutações descritas estavam localizadas nos exons 9 (que codifica para uma porção da região extracelular da proteína), 13, 14, 15 e 17 (formam parte do domínio intracelular) [Andersson e colaboradores, 2002; Hirota e colaboradores, 1998; Isozaki e colaboradores, 2000; Lasota e colaboradores, 2000; Lux e colaboradores, 2000].

Apesar da elevada frequência na qual a mutação oncogênica do gene *KIT* é encontrada nos GISTs, uma porcentagem desses tumores apresenta o gene *KIT* selvagem (*KIT*-WT). Foi demonstrado que uma parte de tumores *KIT*-WT apresenta mutações no gene que codifica outro receptor de tirosina kinase, *PDGFRA* (receptor do fator de crescimento derivado de plaqueta alfa) [Heinrich e colaboradores, 2003b]. A frequência de mutação em *PDGFRA* (NCBI, referência NG_007456.1), que está localizado no cromossomo 4, posição q11-q13, varia entre 5% e 7% e as mutações estão distribuídas predominantemente nos exons 12 e 18. Raramente, elas também podem estar localizadas no exon 14. O sinal de sinalização celular consequente à ativação da via de *PDGFRA* é indistinguível daquela consequente à ativação da via *KIT*. E, provavelmente, isso explica porque a ocorrência de mutação nos dois genes em GISTs é mutuamente exclusiva [Heinrich e colaboradores, 2003b; Heinrich e colaboradores, 2003a]. Ambos receptores ativam as vias Ras/MAPK e PI3k/AKT, culminando na proliferação e aumento da sobrevivência celular, como demonstrado na figura 1.

O conhecimento de mutações com ganho de função do gene *KIT* e *PDGFRA* na carcinogênese e na progressão dos GISTs proporcionou o

desenvolvimento de uma droga com alvo molecular definido que interfere na atividade tirosina quinase dos receptores KIT e PDGFRA, o inibidor da atividade de proteína quinase mesilato de imatinibe, comercialmente conhecida como Gleevec™ (Novartis, Basel, Suíça) [Buchdunger e colaboradores, 2000]. O sucesso clínico dos inibidores de tirosina quinase no tratamento dos tumores GISTs resulta da inativação das vias de sinalização citadas anteriormente, através da competição pelo sítio onde o ATP se liga ao receptor tirosina quinase KIT e PDGFRA, como demonstrado na figura 2 [Rubin e colaboradores, 2007].

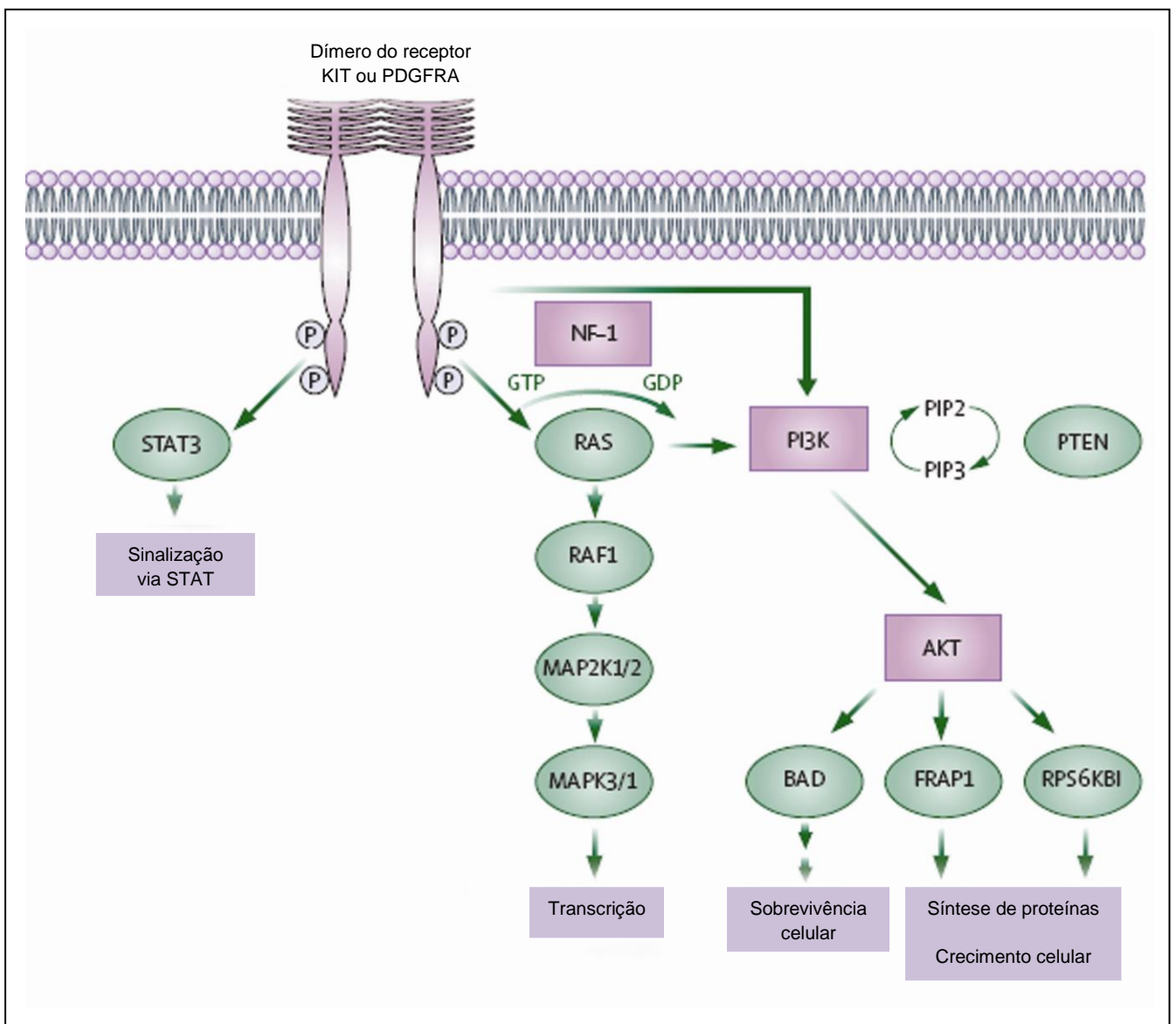


Figura 1 – Sinalização dos receptores KIT e PDGFRA nos GISTs (adaptado de [Rubin e colaboradores, 2007]).

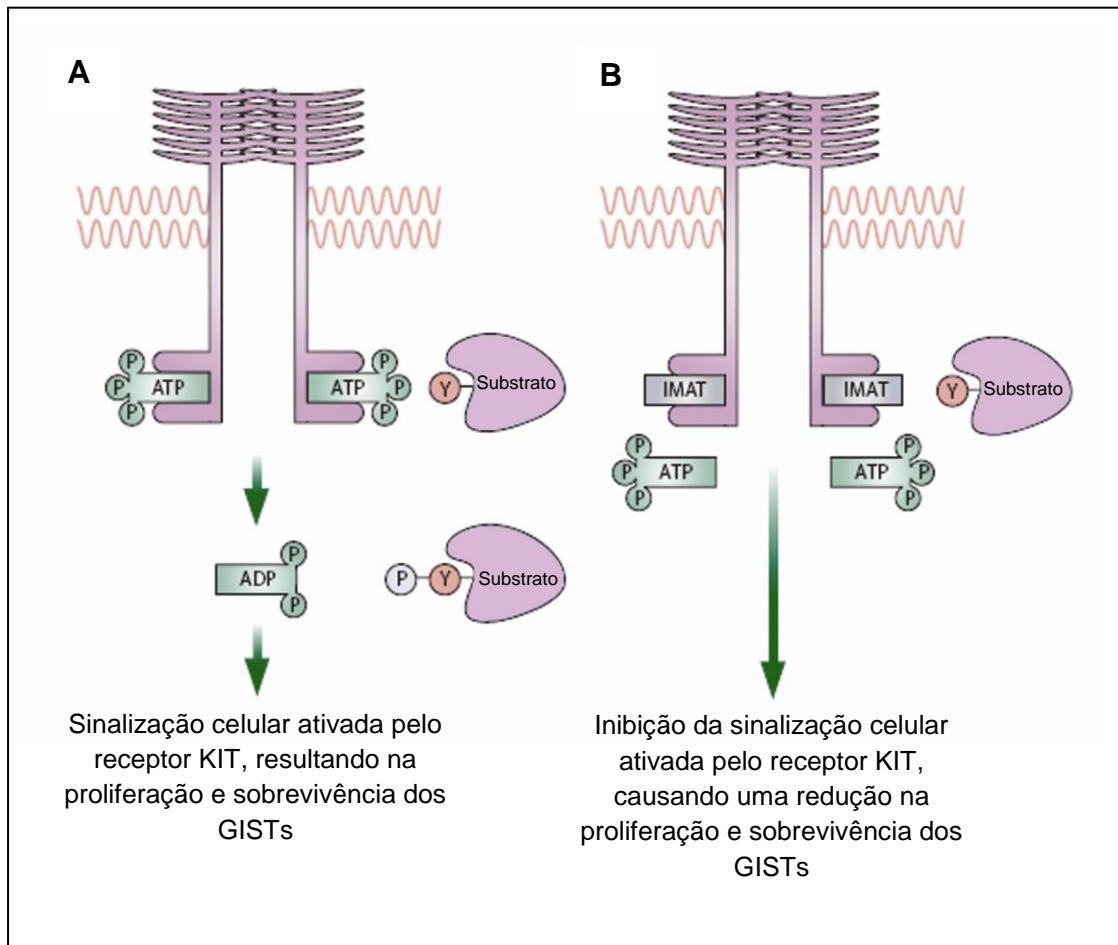


Figura 2 – Mecanismo de ação do mesilato de imatinibe. (A) Normalmente o ATP se liga ao sítio de ativação dos receptores KIT e PDGFRA, resultando na ativação da sinalização celular. (B) Mesilato de imatinibe, um inibidor competitivo, se liga ao mesmo sítio do ATP, impedindo que este se ligue, o que inibe a sinalização desencadeada por KIT e PDGFRA (adaptado de [Rubin e colaboradores, 2007]).

Inicialmente utilizado no tratamento da leucemia mielóide crônica com grande sucesso, a introdução do mesilato de imatinibe no tratamento dos GISTs metastáticos e irrecutíveis revolucionou o tratamento dos pacientes portadores desses tumores em estágio avançado, não-cirúrgico [Demetri e colaboradores, 2002; Heinrich e colaboradores, 2006; Verweij e colaboradores, 2004]. Em torno de 70% até 85% dos pacientes com doença avançada apresentam doença controlada com o uso do mesilato de imatinibe [Blanke e

colaboradores, 2008; Heinrich e colaboradores, 2003a; Verweij e colaboradores, 2004].

Apesar da resposta clínica ao mesilato de imatinibe ocorrer na maior parte dos pacientes com doença considerada irresssecável, já foram relatados casos de resistências tanto primária quanto secundária a essa droga [Antonescu e colaboradores, 2005; Chen e colaboradores, 2004; Debiec-Rychter e colaboradores, 2004; Debiec-Rychter e colaboradores, 2005]. Do ponto de vista molecular, a resistência a esta nova droga poderia ser explicada pela variedade de mutações no gene *KIT* descritas nos GISTs. Além da localização, os diferentes tipos de mutações em um mesmo exon são responsáveis pela resistência de um subgrupo de GISTs ao tratamento com mesilato de imatinibe [Suster, 1996]. Por esse motivo, novas opções terapêuticas estão sendo desenhadas e testadas em ensaios clínicos e já vem sendo disponibilizadas, inclusive no Brasil, na rotina clínica para os pacientes resistentes ao mesilato de imatinibe, como é o caso do malato de sunitinibe (Sutent, Pfizer, New York, NY) [Demetri e colaboradores, 2006].

Além dos inibidores tirosina quinase, outras possíveis drogas com objetivo de inibir a via de sinalização desencadeada pelo receptor KIT vem sendo investigadas *in vitro*. Em algumas dessas drogas a eficiência da inibição da via de sinalização resultante da ativação do receptor KIT está sendo examinada em estudos clínicos, como ocorre com os inibidores da HSP90 [Bauer e colaboradores, 2006] e o flavopiridol [Sambol e colaboradores, 2006]. Entretanto, para que os pacientes sejam beneficiados do uso de imatinibe e de novos tratamentos para os GISTs resistentes ao imatinibe com esses novos tratamentos, é necessário que haja um diagnóstico preciso dos GISTs.

1.2. CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA E DIAGNÓSTICO DOS GISTs

Os GISTs foram durante muito tempo fonte frequente de controvérsias quanto à sua classificação histológica e linhas de diferenciação. O conhecimento da ativação da via de sinalização da proteína quinase KIT na sua patogênese e a possível origem a partir das células de Cajal e suas

implicações fenotípicas trouxeram relevantes conhecimentos para o diagnóstico histopatológico e comportamento biológico deste tumor [Fletcher e colaboradores, 2002; Huizinga e colaboradores, 1995; Sarlomo-Rikala e colaboradores, 1998].

Antes do conhecimento da importância do receptor KIT nos GISTs, a maioria desses tumores era classificada como leiomioma visceral ou leiomiossarcoma, por ser uma neoplasia também mesenquimal, com alguma semelhança morfológica e de localização. Atualmente, a maior parte dos GISTs é diferenciada de outras neoplasias mesenquimais baseada nas características morfológicas e na imuno-histoquímica positiva para o receptor de tirosina quinase KIT (CD117) [Fletcher e colaboradores, 2002; Sarlomo-Rikala e colaboradores, 1998]. Em torno de 95% dos tumores GISTs expressam KIT. Um exemplo da morfologia típica dos GISTs pode ser observado na figura 3.

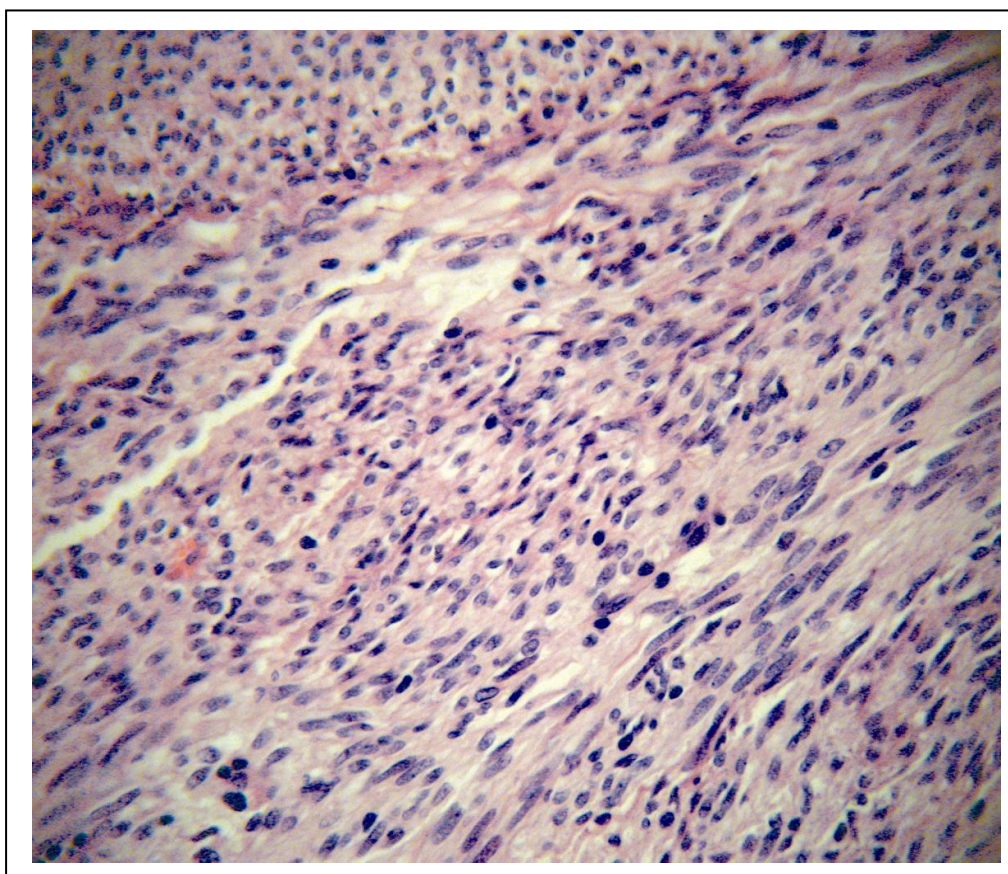


Figura 3 – Morfologia típica dos GISTs. Caso representativo de um GIST incluído no nosso estudo corado com hematoxilina-eosina, onde podem ser observadas células fusiformes, morfologia típica dos GISTs.

Além disso, a menor frequência de marcadores de diferenciação muscular, e as semelhanças fenotípicas ultraestruturais às células intersticiais de Cajal (ICC) definiram estes tumores como uma nova e única entidade tumoral [Sandberg e colaboradores, 2002].

As células intersticiais de Cajal formam um sistema complexo de células localizadas na camada muscular da parede intestinal e funcionam como um marcapasso no controle da atividade peristáltica, como demonstrado na figura 4. A ativação da via de sinalização do receptor KIT exerce um papel fundamental na diferenciação dessas células. Pelo fato da quase totalidade dos GISTs expressarem o receptor KIT, especula-se que esse tumor se desenvolva a partir das células de Cajal [Huizinga e colaboradores, 1995] (figura 5).

Além da expressão de KIT, os GISTs são caracterizados pela positividade para outros marcadores com frequências variadas, tais como CD34 (60-70%), Actina de músculo liso (30-40%), S100 (5%), Desmina (1-2%) e queratina (1-2%) [Fletcher e colaboradores, 2002; Kindblom e colaboradores, 1998; Sarlomo-Rikala e colaboradores, 1998]. Esse painel de marcadores, incluindo o KIT, com frequências definidas associado à morfologia típica, definiram então os GISTs como uma neoplasia mesenquimal diferente de todas as outras, com mecanismo de carcinogênese, biologia tumoral e comportamento clínico próprios.

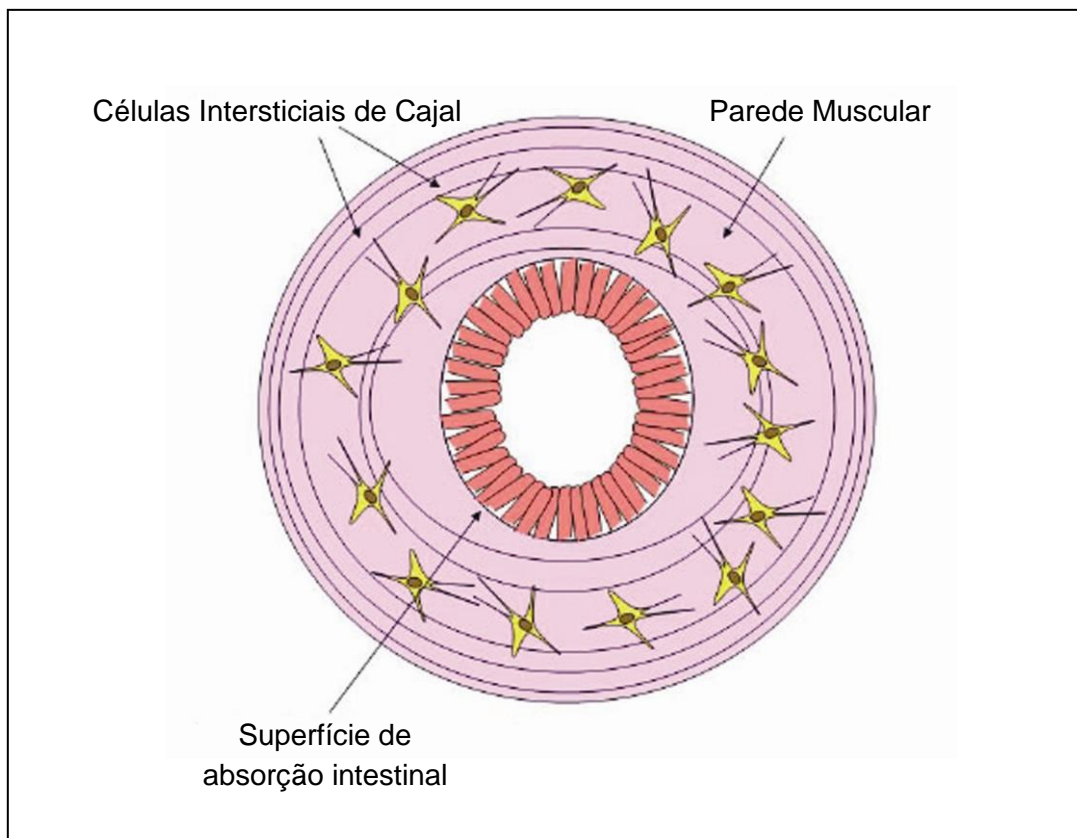


Figura 4 – Esquema da parede muscular do intestino delgado. As células de Cajal se encontram dentro da parede muscular do intestino e estão envolvidas no movimento peristáltico do órgão em questão (adaptado de <http://www.liferaftgroup.org>).

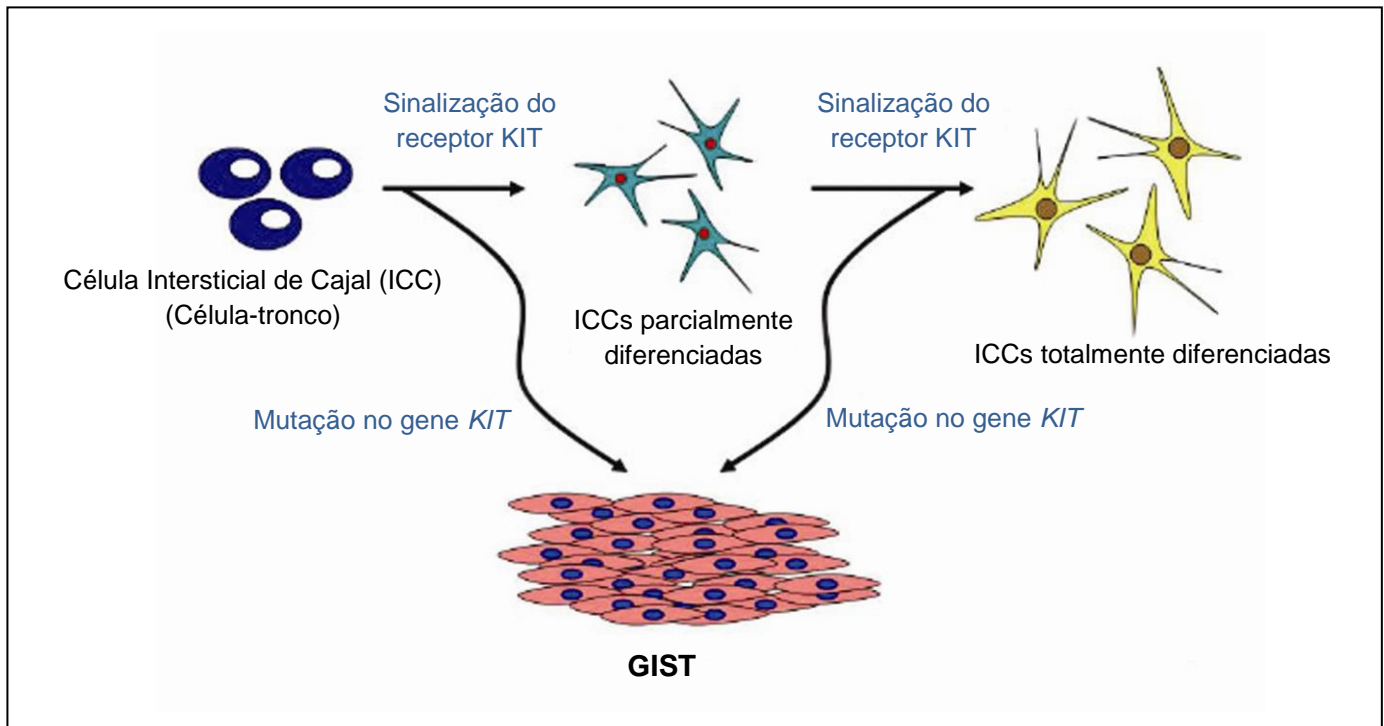


Figura 5 – Transforma o das Células Intersticiais de Cajal (ICC) em GIST. As células-tronco formadoras das ICCs se diferenciam em parcialmente diferenciadas e totalmente diferenciadas sob influência da sinaliza o do receptor KIT (adaptado de <http://www.liferaftgroup.org>). A muta o no genes *KIT* pode ocorrer tanta nas células-tronco como nas células já diferenciadas resultando na transforma o em GIST.

Dessa forma, o diagnóstico dos GISTs   baseado na análise desses marcadores, mas a elegibilidade ao tratamento com imatinibe   baseada fundamentalmente na positividade de KIT (anticorpo anti-CD117). Contudo, em torno de 2% até 10% dos tumores com características morfológicas que preenchem os critérios de defini o de GIST não expressam o receptor KIT (GISTs KIT-negativo) [Corless e colaboradores, 2004; Medeiros e colaboradores, 2004]. A não expressão de KIT torna os pacientes do Sistema  nico de Saúde (SUS) no Brasil, portadores desses tumores, inelegíveis ao tratamento com imatinibe, apesar da comprova o de resposta ao mesmo [Bauer e colaboradores, 2003]. Segundo descrito no Diário Oficial da União N 182 - Se o 1, portaria N  1.655 de 17 de Setembro de 2002 (Anexo I)   exigido como condi o *sine qua non* o resultado positivo do exame anti-CD117

(anti-KIT), realizado pela técnica de imuno-histoquímica para a utilização do mesilato de imatinibe no tratamento dos pacientes do SUS portadores de GIST. Conseqüentemente, os pacientes portadores de GISTs KIT-negativo não apresentam possibilidade de tratamento visto que, assim como os KIT-positivo, esses também são resistentes à quimioterapia e à radioterapia [Demetri e colaboradores, 2007; Pidhorecky e colaboradores, 2000].

Os GISTs KIT-negativo podem ser resultado da perda da expressão de KIT por evolução clonal que é observada em GISTs avançados que se tornaram resistentes ao mesilato de imatinibe. Ou, podem apresentar baixa expressão de KIT não detectada pelos anticorpos e técnicas normalmente utilizados. E, dentre os 5% , menos do que 2% dos tumores primários não expressam KIT [Fletcher e colaboradores, 2002]. A incidência dos GISTs KIT-positivo, segundo dados americanos, é de 4.000 a 5.000 casos por ano. Como citado anteriormente, desse número, somente em torno de 5% são GISTs KIT-negativo, ou seja, em torno de 250 casos por ano nos EUA. Esse pequeno número de casos não permite a realização de estudos com número amostral suficiente para atingir um poder estatístico necessário para conclusões definitivas sobre biomarcadores.

Para os casos verdadeiramente negativos, ainda há muito para se entender quais são os mecanismos biológicos desse tumor KIT-negativo. Apesar de não expressar KIT, a maioria desses tumores apresenta mutação no gene *PDGFRA* [Medeiros e colaboradores, 2004]. Ainda, alguns tumores apresentam mutação em *KIT* e em menor frequência não apresentam mutação em nenhum dos dois genes [Medeiros e colaboradores, 2004]. A mutação em *PDGFRA* aparece como uma via alternativa durante a carcinogênese dos GISTs KIT-negativo [Liegel e colaboradores, 2009; Medeiros e colaboradores, 2004; Miettinen e colaboradores, 2009]. Nos casos dos GISTs que não expressam KIT e que não foram previamente tratados com imatinibe, ou que não apresentam mutação em nenhum dos dois genes, a possível explicação para a ausência de expressão seria a independência da via de KIT durante a progressão da doença e a ocorrência de mutação em outro receptor de tirosina quinase.

A necessidade da positividade de KIT para o diagnóstico de GIST deve ser cuidadosamente examinada. A ocorrência de GISTs KIT-negativo vem atraindo a atenção dos patologistas, oncologistas e pesquisadores, principalmente pela possibilidade de resposta desses tumores ao imatinibe, já demonstrado por Bauer e colaboradores [Bauer e colaboradores, 2003] ou a outro inibidor de tirosina quinase. Apesar dos patologistas com experiência no diagnóstico de GISTs se sentirem suficientemente seguros para diagnosticar esses tumores sem o auxílio da imuno-fenotipagem, atualmente, no Brasil, o tratamento com inibidores seletivos de tirosina quinase pelo SUS, como o mesilato de imatinibe, só tem beneficiado pacientes com GISTs positivos para a expressão de KIT. Dessa forma, a busca de novos biomarcadores que consigam diagnosticar precisamente os GISTs KIT-negativo torna-se de grande importância, pois beneficiaria os pacientes portadores desses tumores pelo tratamento com inibidor de tirosina quinase, o que pode ter impacto para a Política de Controle de Câncer no Brasil.

1.3. POTENCIAIS NOVOS BIOMARCADORES EM GISTS

Pelo já publicado na literatura previamente, as proteínas PKC θ , fosfo-PKC θ e IGF1R e a proteína com função desconhecida DOG1 aparecem como eventuais possíveis biomarcadores de diagnóstico de GISTs, seja porque participam da via de carcinogênese dos GISTs, e/ou porque aparecem superexpressas nos GISTs. Nessa mesma linha de pensamento, as mutações nos genes *KIT* e *PDGFRA* também são fortes candidatas. Segundo definição do Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos (NCI), biomarcadores são todas as moléculas biológicas encontradas no sangue, outros fluidos corporais ou tecidos, que sinalizam processos normais ou anormais, ou de uma condição ou doença.

1.3.1. PROTEÍNA TIROSINA QUINASE PKC θ

A proteína PKC θ é uma nova isoforma da família PKC. A família PKC faz parte da família das serina/treonina quinases que está envolvida na diferenciação de diferentes tecidos [Baier e colaboradores, 1993; Sparatore e colaboradores, 2000] e na regulação de diversas funções celulares, como proliferação celular, transcrição e apoptose [Altman e colaboradores, 2003; Liu e colaboradores, 2001; Sun e colaboradores, 2000]. PKC θ atua na célula através da ativação das vias de sinalização de Ras/MAPK e de PI3k/AKT [Altman e colaboradores, 2002], como demonstrado na figura 6.

O papel biológico da proteína PKC θ vem sendo bastante estudado nas células T, onde PKC θ regula a produção de interleucina-2 e a expressão de CD25 através do fator nuclear K B (NF κ B) e da proteína ativadora-1 [Bi e colaboradores, 2001; Sun e colaboradores, 2000]. As interações PKC θ :NF κ B podem ser bidirecionais, como acontece na ativação do NF κ B induzida pelo receptor de células T (TCR), que podem ativar PKC θ . A via de sinalização de TCR também regula a fosforilação de PKC θ , mediado por proteínas tirosina quinase da família SCR, como por exemplo a proteína LCK [Liu e colaboradores, 2000]. Além disso, a fosforilação de PKC θ pode regular a expressão gênica, funcionando como um modulador positivo da transcrição dependente do elemento responsivo ao receptor retinóide X, que ocorre na ativação de células T [Ishaq e colaboradores, 2002]. Os estudos em PKC θ que não se concentraram nas células T demonstraram que a inibição de PKC θ resulta na parada de ciclo celular independente de p53 em diferentes linhagens celulares, incluindo linhagens originadas de células mesenquimais [Deeds e colaboradores, 2003]. Além disso, a ativação de PI3K e da fosfolipase C γ mediada por KIT e PDGFRA, pode gerar os cofatores de PKC θ (fosfatidilserina e diacilglicerol) e parece estar relacionada à modulação da função de PKC θ [Altman e colaboradores, 2003].

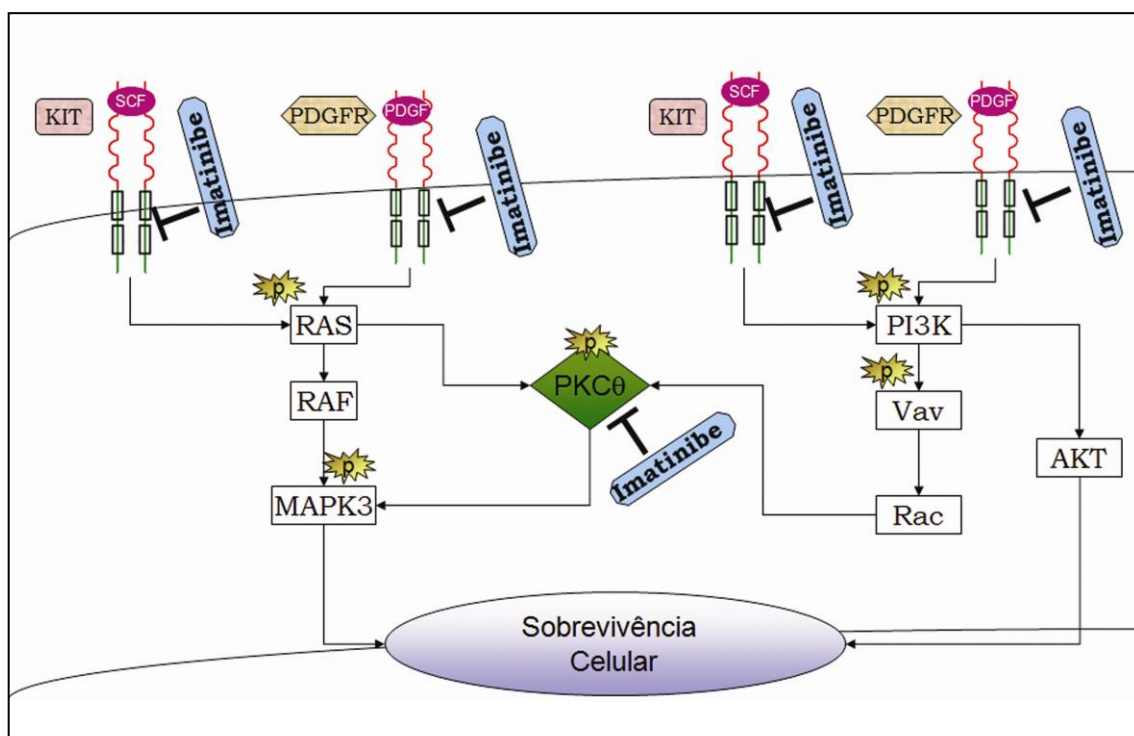


Figura 6 – Esquema da via de sinalização da proteína PKC θ ativada pelo receptor KIT ou PDGFRA.

O gene *PRKCQ* (NCBI, referência NM_006257.2), localizado no cromossomo 10, posição p10-p15, que codifica a proteína PKC θ foi recentemente identificado como superexpresso em GISTs em dois estudos prévios. Esses estudos analisaram a expressão gênica em GISTs usando a técnica de microarranjos de cDNA e mostraram que os tumores GISTs apresentam um perfil de expressão gênica homogênea entres eles e distinta de outros tumores de origem mesenquimal [Allander e colaboradores, 2001; Nielsen e colaboradores, 2002]. Dentre os transcritos identificados nesses estudos, o gene *PRKCQ* apareceu como um dentre os genes que discriminam os tumores GISTs, mostrando o seu potencial como candidato a um novo marcador molecular de diagnóstico nos GISTs. Desde então, o interesse de PKC θ nos GISTs vem crescendo. Os estudos in vitro demonstram que a proteína PKC θ , em linhagens celulares de GISTs, é fosforilada via KIT-dependente e inibida por inibidores de tirosina quinase, tais como o mesilato de imatinibe e o PKC412 [Zhu e colaboradores, 2007]. A partir desses dados,

cinco estudos analisaram a expressão da proteína PKC θ em GISTs [Blay e colaboradores, 2004; Duensing e colaboradores, 2004; Kim e colaboradores, 2006; Lee e colaboradores, 2008; Motegi e colaboradores, 2005]. De modo geral, esses estudos demonstraram através da imuno-histoquímica que a proteína PKC θ é frequentemente detectada nos GISTs tanto KIT-positivo quanto KIT-negativo. Entretanto, apesar da demonstração da presença de PKC θ nos GISTs, nenhum estudo, até o momento, comparou as frequências de PKC θ nos GISTs com as frequências encontradas nos diferentes tumores mesenquimais não-GISTs e tumores não-mesenquimais KIT-positivo e, ainda, o número de casos GISTs KIT-negativo analisados é pequeno. Dessa forma, a expressão de PKC θ ainda não é utilizada na rotina clínica. Além disso, não há qualquer estudo avaliando PKC θ na população brasileira. Dessa maneira, estudos adicionais ainda devem ser feitos, sendo assim um dos objetivos propostos nesse estudo.

Em relação à forma fosforilada da proteína PKC θ (fosfo-PKC θ) só existe um trabalho até o momento que tenha analisado a expressão de fosfo-PKC θ nas linhagens celulares provenientes de GISTs. Ou e colaboradores analisaram a expressão e a fosforilação de PKC θ em três linhagens celulares de GISTs KIT-positivo (GIST882, GIST48 e GIST430) e em duas linhagens celulares de GISTs KIT-negativo (GIST62 e GIST522). Eles analisaram a expressão e fosforilação de PKC θ nos resíduos T538 e S676 e demonstraram uma forte expressão de fosfo-PKC θ nas três linhagens celulares provenientes de GISTs KIT-positivo. Entretanto, nas duas linhagens celulares de GISTs KIT-negativo a expressão da fosforilação no resíduo T538 foi muito baixa e a no resíduo S676 foi praticamente indetectável [Ou e colaboradores, 2008].

1.3.2. PROTEÍNA DOG1

A proteína DOG1 aparece como um outro candidato a marcador de diagnóstico dos GISTs. Recentemente estudos utilizando a técnica de microarranjo identificaram uma série de genes que apareciam relativamente

mais expressos nos GISTs, quando comparados com outros tumores mesenquimais [Allander e colaboradores, 2001; Khan e colaboradores, 2001; Nielsen e colaboradores, 2002]. Esses estudos incluíram genes codificantes de proteínas sabidamente superexpressas nos GISTs, como KIT e CD34, e genes que ainda não foram bem caracterizados, incluindo DOG1, que apareceu como um gene específico de GIST.

DOG1 foi recentemente identificado como um gene localizado no locus *CCND1-EMS1* do cromossomo 11q13 [Galindo e colaboradores, 2005; Katoh e colaboradores, 2003], que possui 26 exons. Apesar de ter sido encontrado expresso em uma série de tumores, a função biológica precisa da proteína e o mecanismo responsável pela superexpressão de DOG1 nos GISTs continuam desconhecidos. A análise da sequência prediz que a proteína DOG1 é composta por oito domínios transmembranares com caudas de N- e C- terminal revestindo o citoplasma. O grande número de domínios transmembranares sugere que essa proteína seja um canal de íon.

A partir desses estudos de microarranjos que demonstraram DOG1 como um gene específico dos GISTs, cinco estudos recentes analisaram a expressão da proteína DOG1 em GISTs através da imuno-histoquímica [Espinosa e colaboradores, 2008; Liegl e colaboradores, 2009; Miettinen e colaboradores, 2009; Miwa e colaboradores, 2008; West e colaboradores, 2004]. Esses estudos mostraram que a proteína DOG1 está altamente expressa não só nos GISTs típicos, como também nos GISTs selvagens para mutação nos genes *KIT* e *PDGFRA* e nos GISTs KIT-negativo. Além disso, o anticorpo anti-DOG1 se apresentou sensível e específico e, dessa maneira, esses autores sugeriram que a proteína DOG1 é um marcador específico de GISTs, independente da mutação ou da expressão da proteína KIT [Espinosa e colaboradores, 2008; Liegl e colaboradores, 2009; West e colaboradores, 2004].

Ainda, para tentar entender o mecanismo que levava à superexpressão da proteína DOG1 nos GISTs, Miwa e colaboradores realizaram uma análise de sequenciamento genômico do gene *DOG1* em 10 tumores GISTs com expressão positiva para a proteína DOG1. Todos os exons do gene *DOG1*

foram analisados e nenhuma mutação foi encontrada [Miwa e colaboradores, 2008].

Entretanto, da mesma forma que PKC θ , os estudos em DOG1 se limitaram a descrever as frequências de positividade encontradas nos GISTs, nos tumores mesenquimais não-GIST e nos tumores não-mesenquimais KIT-positivo, sem, entretanto, comparar as diferenças encontradas. Além disso, apesar de atualmente alguns estudos específicos utilizarem a expressão de DOG1 como marcador de diagnóstico de GISTs, a expressão de DOG1 também não é utilizada ainda na rotina clínica, e também não foi avaliada em nenhum estudo com a população brasileira. Dessa maneira, estudos adicionais devem ser feitos para que essa proteína possa ser integrada na rotina clínica de diagnóstico de GISTs.

1.3.3. RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO INSULINA-SÍMILE 1 (IGF1R)

IGF1R faz parte da família de receptores tirosina quinase classe II. O fator de crescimento insulina-símile 1 (IGF-1) está envolvido na proliferação e no desenvolvimento de vários tecidos. Além disso, parece estar envolvido na regulação do crescimento celular global [LeRoith e colaboradores, 2003]. A família IGF é composta por dois ligantes (IGF-1 e IGF-2), dois receptores (IGF1R e IGF2R), receptor de insulina (IR) e por seis proteínas regulatórias (IGFBPs). IGF1R é um receptor de transmembrana que interage com os ligantes IGF-1 e IGF-2.

A interação entre IGF1R e IGF1 leva a uma autofosforilação que resulta na modificação estrutural e ativação do receptor. Uma vez ativado, o receptor IGF1R ativa as vias de sinalização de Ras/MAPK e de PI3k/AKT, levando a uma proliferação celular e inibição de apoptose, como demonstrado na figura 7 [Garrouste e colaboradores, 2002; Yu e colaboradores, 2000].

IGF1R está envolvido na proliferação celular, apoptose, diferenciação, motilidade celular e crescimento independentemente de ancoragem [Valentinis

e colaboradores, 2001]. Sua superexpressão já foi identificada em vários tipos tumorais [Gotlieb e colaboradores, 2006; Sarfstein e colaboradores, 2006; Wu e colaboradores, 2006; Yanochko e colaboradores, 2006]. Diversos estudos epidemiológicos investigaram a correlação entre o nível plasmático de IGF1 e de IGFBPs em pessoas saudáveis e o risco de desenvolvimento de câncer. Níveis alterados de IGF1 e IGFBPs parecem estar associados ao risco de desenvolver câncer de próstata [Renehan e colaboradores, 2004; Severi e colaboradores, 2006] e câncer de mama [Baglietto e colaboradores, 2007]. Estudos mais recentes, porém, não confirmaram esses dados [Allen e colaboradores, 2007; Weiss e colaboradores, 2007].

Apesar da superexpressão de IGF1R ser detectada em diferentes tipos tumorais, pouco é conhecido sobre o mecanismo molecular envolvido nessa superexpressão. Em 1994, foi mostrado que o cromossomo 15q26, onde está localizado o gene *IGF1R*, apresentava-se amplificado em 10% dos tumores de mama [Almeida e colaboradores, 1994].

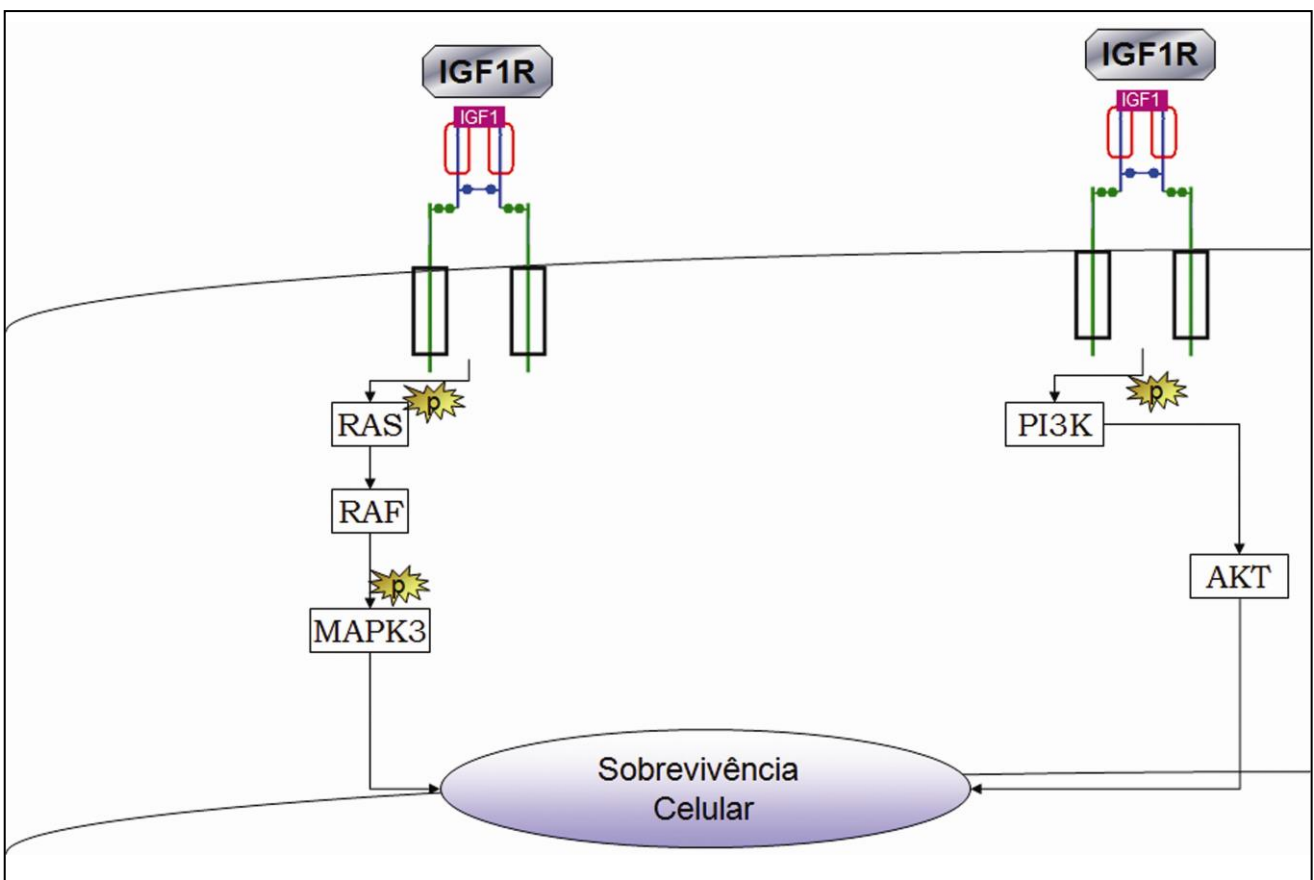


Figura 7 – Esquema representando a via de sinalização do receptor IGF1R.

O envolvimento da família IGF em GISTs é evidenciado pelos vários casos de pacientes portadores de GISTs que apresentaram hipoglicemia causada por fatores diferentes do que a hiperinsulinemia [Escobar e colaboradores, 2007; Guiteau e colaboradores, 2006; Hamberg e colaboradores, 2006; Rikhof e colaboradores, 2005; Singh e colaboradores, 2006]. A partir desses dados, diversos estudos analisaram a importância da expressão de membros da família IGF na patogênese dos GISTs [Agaram e colaboradores, 2008; Belinsky e colaboradores, 2008; Braconi e colaboradores, 2008; Tarn e colaboradores, 2008; Trent e colaboradores, 2006].

Braconi e colaboradores analisaram 94 pacientes portadores de GISTs KIT-positivo e mostraram que a expressão aumentada de IGF1 e IGF2 se correlacionou com sobrevida livre de doença [Braconi e colaboradores, 2008]. Tarn e colaboradores mostraram uma expressão aumentada do receptor IGF1R nos GISTs selvagens e nos GISTs pediátricos quando comparados aos GISTs que apresentavam mutação [Tarn e colaboradores, 2008], o que sugere que esses subgrupos de tumores podem utilizar uma via de sinalização independentemente de KIT. Essa hipótese é corroborada por experimentos *in vivo* que demonstraram que linhagens tumorais resistentes ao imatinibe (GIST882) são sensíveis a um inibidor de IGF1R (NVP-AEW541) [Tarn e colaboradores, 2008].

Como citado anteriormente, alguns autores já demonstraram que IGF1R ativa a mesma via de sinalização dos receptores KIT e PDGFRA, e parece estar mais expresso nos GISTs selvagens para os genes *KIT* e *PDGFRA*, sugerindo que esse receptor utilize uma via alternativa a via dos receptores KIT e PDGFRA, o que demonstra que IGF1R pode ser importante na carcinogênese dos GISTs KIT-negativo. Entretanto, nenhum estudo avaliou a expressão de IGF1R nesses tumores. Dessa maneira, estudos adicionais devem ser feitos incluindo GISTs KIT-negativo, um dos objetivos propostos nessa dissertação.

1.4. MUTAÇÃO ONCOGÊNICA DE *PDGFRA* E *KIT*

A frequência de mutações nos GISTs KIT-negativo, assim como para os GISTs KIT-positivo, é muito variável. Alguns estudos em GISTs KIT-negativo já relataram frequências de 24% até 90% [Kim e colaboradores, 2006; Liegl e colaboradores, 2009; Medeiros e colaboradores, 2004; Miettinen e colaboradores, 2009; Miwa e colaboradores, 2008; Tzen e colaboradores, 2005].

Nos GISTs KIT-negativo, diferentemente do que ocorre para os GISTs KIT-positivo, a maior parte dos trabalhos detectaram um número maior de mutações no gene *PDGFRA*. A variação na frequência de mutações no gene *PDGFRA* encontrada nos estudos é de 82% até 93% [Kim e colaboradores, 2006; Liegl e colaboradores, 2009; Medeiros e colaboradores, 2004; Miettinen e colaboradores, 2009]. Entretanto, Miwa e colaboradores e Tzen e colaboradores relataram uma frequência de 100% das mutações localizadas no gene *KIT* [Miwa e colaboradores, 2008; Tzen e colaboradores, 2005].

Em todos os estudos onde a porcentagem de mutações foi maior no gene *PDGFRA*, a maior parte das mutações encontradas se localizava no exon 18 [Liegl e colaboradores, 2009; Medeiros e colaboradores, 2004; Miettinen e colaboradores, 2009], sendo a mutação mais frequente a que resulta em uma mudança de um ácido aspártico para uma valina no códon 842 (D842V). Essa mutação é bem descrita na literatura e é reconhecida por sua resistência ao mesilato de imatinibe [Corless e colaboradores, 2005; Heinrich e colaboradores, 2003b].

A análise de mutação, mesmo não sendo uma técnica ideal para a rotina clínica, devido à sua elevada complexidade, necessidade de técnicos especializados, custo elevado e dificuldade na análise, pela frequência em que ela ocorre e pela importância das mesmas na carcinogênese dos GISTs, como já citado anteriormente, poderia contribuir de alguma forma para o diagnóstico dos GISTs KIT-negativo.

2. OBJETIVOS

O conjunto de dados anteriores mostra a dificuldade de identificação dos GISTs KIT-negativo e sugere o potencial do uso das proteínas DOG1 e PKC θ como biomarcadores de diagnóstico nos GISTs, o que justifica a melhor caracterização da expressão dessas duas proteínas nos GISTs, com foco nos GISTs KIT-negativo. Ainda, foi mostrado previamente na introdução dessa dissertação, dados de expressão da proteína IGF1R nos GISTs KIT-positivo e da proteína fosfo-PKC θ em linhagens celulares provenientes de GISTs. Até o momento, nenhum estudo havia sido feito com o objetivo de analisar o potencial destas duas proteínas como biomarcadores de diagnóstico de GISTs.

Dessa forma, o objetivo geral desse trabalho foi investigar possíveis biomarcadores de diagnóstico dos GISTs, com foco nos GISTs KIT-negativo.

Os objetivos específicos foram:

- Investigar o padrão de expressão (frequência de positividade e intensidade) das proteínas PKC θ , fosfo-PKC θ , DOG1 e IGF1R nos GISTs através da análise por imuno-histoquímica
- Investigar o valor das proteínas PKC θ , fosfo-PKC θ , DOG1 e IGF1R como possíveis marcadores de diagnóstico nos GISTs, com foco nos GISTs KIT-negativo, através da comparação do padrão de expressão dos GISTs com aquele dos tumores mesenquimais não-GISTs e tumores não-mesenquimais que expressam KIT.
- Caracterizar o *status* mutacional dos receptores tirosina quinase (KIT e PDGFRA) nos GISTs KIT-negativo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. PACIENTES E AMOSTRAS TUMORAIS

Neste estudo, foi incluído um total de 131 tumores diagnosticados no Instituto Nacional de Câncer (INCA). Os tumores foram ressecados cirurgicamente (n=103) ou biopsiados (n=28) entre os anos de 1998 e 2008.

Os tumores foram retrospectivamente selecionados através de uma busca ativa nos arquivos da Divisão de Patologia do INCA (DIPAT). Para a identificação dos GISTs, tanto KIT-positivo quanto KIT-negativo, a palavra-chave para a procura foi “neoplasias fusiformes do trato gastrointestinal”. Para a identificação dos outros tipos histológicos incluídos, a palavra-chave foi o diagnóstico anatomopatológico de cada um deles (ex. seminoma).

Dentre os 131 tumores incluídos nesse estudo, 68 são GISTs e 63 são tumores não-GIST, os últimos utilizados como um grupo controle nas análises estatísticas de comparação. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INCA (protocolo CEP – 08/03 e emendas 4 e 5) (ANEXOS II, III e IV).

O grupo dos GISTs foi dividido em GISTs KIT-positivo (n=46) e GISTs KIT-negativo (n=22), baseado na positividade de KIT por imuno-histoquímica. Além das análises histopatológicas e da expressão da proteína KIT e com o objetivo de melhor caracterizar o grupo dos GISTs, foram obtidas, através da análise do prontuário eletrônico, as características clinico-patológicas dos tumores incluídos nesse grupo, incluindo sítio do tumor primário, idade e gênero dos pacientes.

O grupo dos tumores não-GIST foi dividido em tumores mesenquimais não-GIST (n=31) e tumores não-mesenquimais que expressam a proteína KIT (KIT-positivo) (n=32). O grupo dos tumores mesenquimais não-GIST é composto por 12 leiomiossarcomas, 7 leiomiomas e 12 schwannomas. No grupo dos tumores não-mesenquimais KIT-positivo, 9 são melanomas, 9 carcinomas de grandes células, 4 carcinomas neuroendócrino e 10 são seminomas.

As lâminas e blocos de parafina dos tumores incluídos foram recuperados do arquivo da divisão de patologia do INCA e analisados com o objetivo de encontrar um bloco com a melhor representação tumoral de cada tumor incluído. A partir dos blocos representativos de cada um dos tumores, os mesmos foram morfológicamente reavaliados pelo médico patologista Dr. Sérgio Romano do DIPAT. Para a confirmação do diagnóstico, foram consideradas as características histopatológicas, analisadas através das lâminas coradas por hematoxilina-eosina (HE), e a localização tumoral.

Além das características morfológicas, nos grupos dos GISTs e dos tumores mesenquimais não-GIST também foi analisado, por imunohistoquímica, um painel de marcadores que é recomendado e geralmente utilizado na rotina clínica para se fazer o diagnóstico diferencial dos tumores mesenquimais. Esses marcadores são: CD34, S100 e desmina. A expressão desses marcadores é mais variável do que a proteína KIT nos GISTs. A proteína CD34 está expressa em aproximadamente 60-70% dos GISTs. A desmina pode ser encontrada em células mesoteliais, células de músculo estriado e liso, sendo útil na identificação dos rabiomiossarcomas, leiomiomas, leiomiiossarcomas e mesoteliomas, e é raramente encontrada nos GISTs (1-2%). Em relação ao S100, aproximadamente 100% dos schwannomas apresentam imunopositividade para essa proteína, que em geral se encontra negativa nos GISTs [Fletcher e colaboradores, 2002].

3.2. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS PKC θ , FOSFO-PKC θ , DOG1 E IGF1R

Com a finalidade de investigar o valor das proteínas PKC θ , fosfo-PKC θ , DOG1 e IGF1R como possíveis marcadores de diagnóstico nos GISTs, a expressão das mesmas foi analisada pela técnica de imunohistoquímica utilizando como ferramenta o método de *tissue microarray* (TMA). O TMA é um método no qual um bloco de parafina receptor é construído através da inclusão de numerosos fragmentos cilíndricos de amostras de tecidos obtidos a partir de

dezenas ou centenas de blocos de parafina convencionais (blocos doadores). A distribuição dos tecidos a serem incluídos no bloco receptor segue uma ordem pré-determinada. Ou seja, em um único bloco de parafina podem estar reunidas centenas de amostras de tecidos, que por sua vez poderão ser analisadas em um único momento, resultando na economia de tempo e de reagentes para a realização de diferentes técnicas e, principalmente, permitindo uma uniformização nos experimentos realizados nos estudos retrospectivos envolvendo uma grande amostra populacional. A potencial utilização do TMA na rotina dos protocolos de imuno-histoquímica já foi demonstrada para vários anticorpos [Hsu e colaboradores, 2002; Mengel e colaboradores, 2002; Parker e colaboradores, 2002].

3.2.1. CONSTRUÇÃO DO *TISSUE MICROARRAY* (TMA)

Nas preparações histológicas convencionais coradas com HE foram identificadas e demarcadas, pelo Dr. Sérgio Romano, as áreas tumorais a serem incluídas no bloco de TMA.

O bloco de TMA foi construído no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C.Camargo em colaboração com Dr. Fernando Soares (São Paulo, SP, Brasil). Utilizando um equipamento manual e agulhas de 1mm de diâmetro (Beecham Labs, Baltimore, MD, EUA), foram retirados dos blocos de parafina doadores, cilindros de 1mm de diâmetro de tecidos representativos de cada um dos 131 tumores incluídos. Estes cilindros foram inseridos, de forma ordenada e definida previamente, em um bloco receptor de resina sintética (Histosec®, Merck & Co, Hunterdon County, NJ, EUA) (figura 8). Cada tumor foi representado por dois cilindros. Tumores selecionados como controles positivos internos para as reações de imuno-histoquímica também foram inseridos no bloco de TMA. Os tumores utilizados como controles positivos foram GISTs, carcinoma renal, schwannoma e carcinoma de próstata pelo fato destes tecidos sabidamente expressarem proteínas reconhecidas pelos anticorpos utilizados nesse estudo.

A partir do bloco TMA, foram feitos cortes de 4 μm , recolhidos com o auxílio de filme aderente comercial (Instrumedics, Microarray Technology, Richmond, IL, EUA) e montados sobre lâminas comerciais com uso de adesivos (Leica Microsystems Inc, São Paulo, SP, BR). O tecido foi fixado através da exposição das lâminas à luz ultravioleta por 15 minutos. Após a fixação do tecido na lâmina, o adesivo plástico foi removido com solvente não clorinado (TPC®, Instrumedics). As lâminas foram, então, apropriadamente identificadas e armazenadas a -20°C até o seu uso nas análises por imunohistoquímica. Como exemplo representativo, uma lâmina pode ser observada na figura 9.

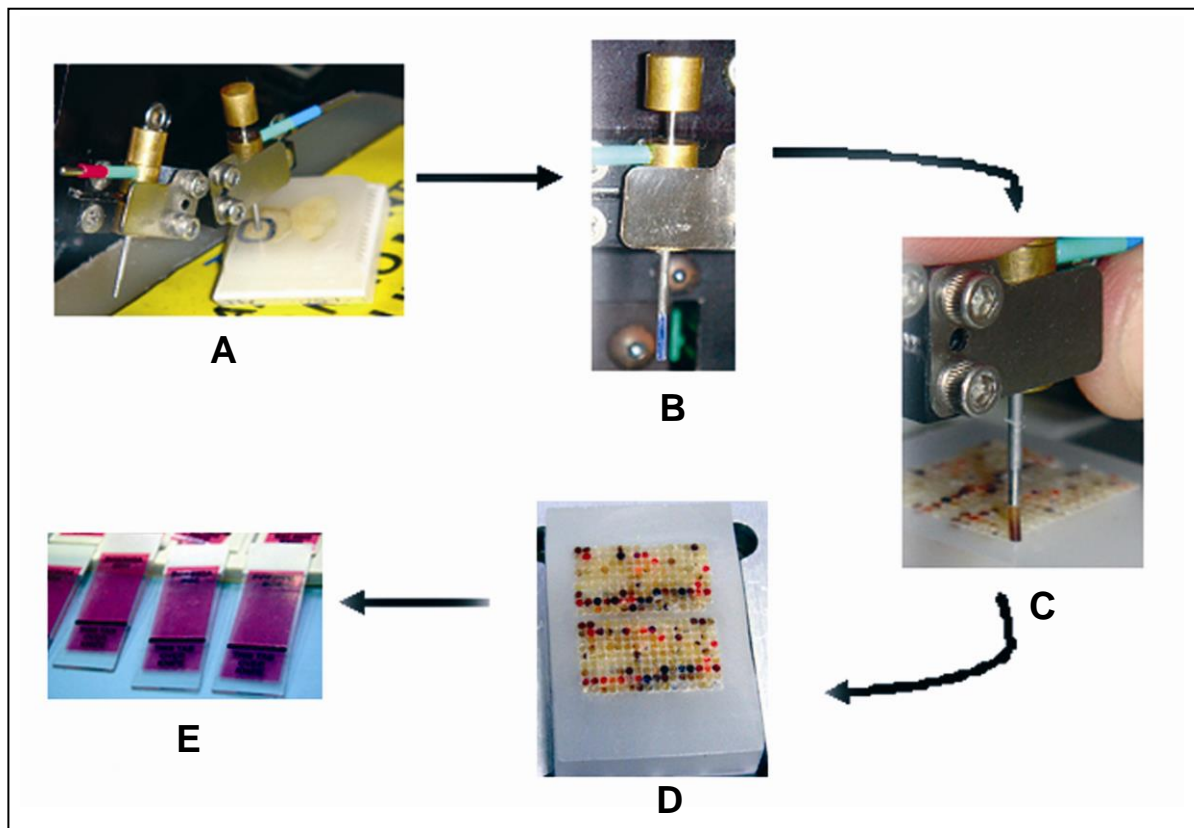


Figura 8 – Esquema reproduzindo a montagem do bloco de *Tissue Microarray* (TMA) para esse estudo, realizado no departamento de anatomia patológica do Hospital A.C.Camargo. (A) a retirada do cilindro do tecido de uma área demarcada previamente no bloco doador (B) a agulha de 1 mm de diâmetro utilizada para retirada do cilindro (C) a inserção, de forma ordenada, definida previamente, em um bloco receptor de resina sintética (D) bloco de TMA (E) cortes de 4 μm montados sobre lâminas comerciais com adesivos.

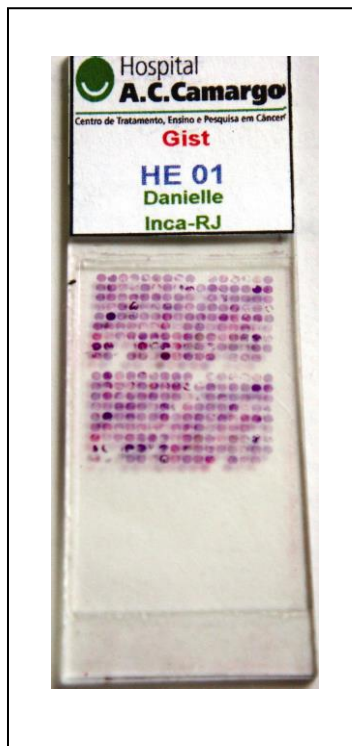


Figura 9 – Lâmina construída a partir do corte de 4 μM após a coloração com HE.

3.2.2. IMUNO-HISTOQUÍMICA

Para as análises de imuno-histoquímica, inicialmente, todas as lâminas de TMA foram submetidas à desparafinização através da imersão das mesmas em xilol (Isofar, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foi feita a hidratação das lâminas através da imersão em soluções de etanol nas concentrações de 100, 90, 80 e 70%, por 2 minutos cada, também em temperatura ambiente. As principais etapas do protocolo utilizado para a técnica de imuno-histoquímica estão ilustradas na figura 10.

Resumidamente a técnica de imuno-histoquímica consistiu nas seguintes etapas:

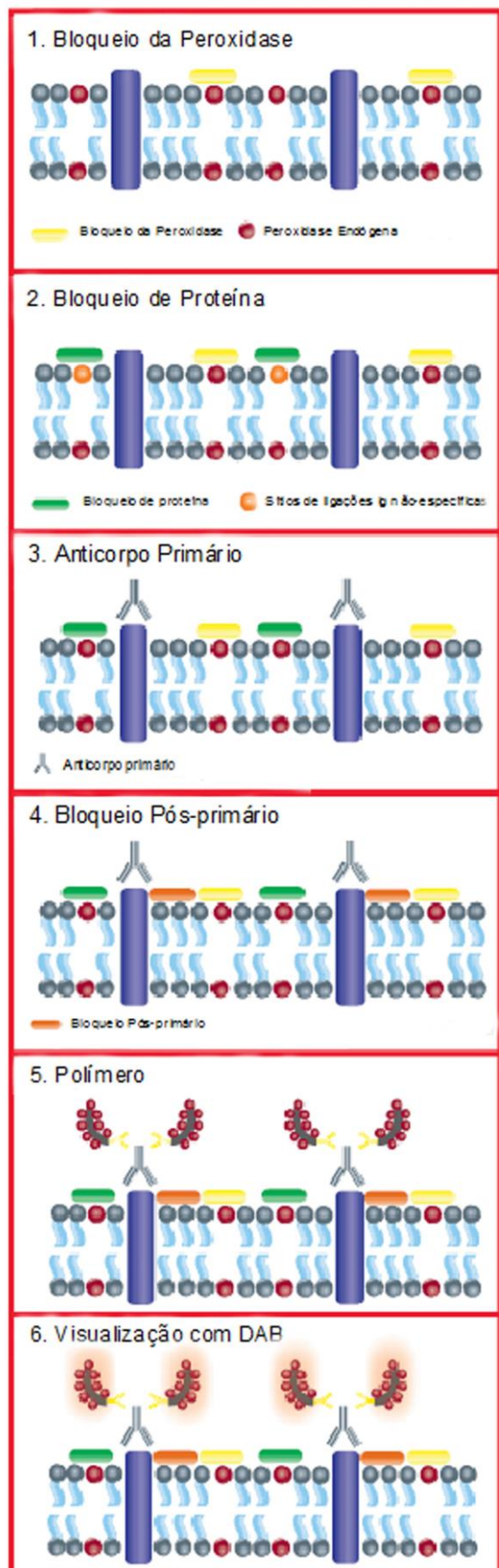


Figura 10 – Esquema mostrando as principais etapas da técnica de imunohistoquímica utilizada nesse estudo (adaptado do *datasheet* do kit Novolink; Novocastra Laboratories Ltd.).

a. Recuperação antigênica:

A fixação em formalina bloqueia o acesso dos anticorpos aos epítomos alvos, o que mascara o antígeno. Isso ocorre porque a formalina promove múltiplas ligações entre os grupos aminos e a formação de pontes de metileno entre os vários aminoácidos presentes nos peptídeos de uma determinada proteína e destas com as proteínas adjacentes. Com o objetivo de expor o antígeno, uma recuperação antigênica foi feita incubando as lâminas em panela a vapor (Walita, Varginha, MG, Brasil) contendo tampão citrato pH 6.0 por 30 minutos. Após a recuperação, as lâminas foram deixadas em temperatura ambiente por 15 minutos e posteriormente foram lavadas em água corrente por 5 minutos.

b. Bloqueio da peroxidase endógena:

Normalmente nas hemácias, pseudoperoxidase, granulócitos, mieloperoxidase, hepatócitos, sistema nervoso central e tecidos sensíveis a estrogênio ocorrem atividade de peroxidase, que reagem com 3,3' tetrahydroclorídrico diaminobenzidina (DAB). Para inibir essa peroxidase endógena as lâminas foram incubadas com o peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 10 vol) (Merck & Co.) por 20 minutos, seguido por 3 lavagens com PBS contendo NP40 0.05% (Usb Corp., Cleveland, OH, EUA) por 5 minutos.

c. Bloqueio das proteínas inespecíficas:

Os conjugados de Peroxidase (HRP tipo IV) são proteínas básicas e podem se ligar de modo inespecífico a sítios aniônicos teciduais. Para reduzir a ligação de proteínas inespecíficas, foi utilizada a incubação em leite em pó desnatado e BSA (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA) por 30 minutos, uma vez que esses reagentes competem com os sítios de ligação dessas proteínas inespecíficas.

d. Incubação com o anticorpo primário:

Os anticorpos primários foram diluídos em BSA 3% (Sigma Chemical Co). As lâminas foram então incubadas com os anticorpos primários por 12 horas a 4°C, com a padronização previamente estabelecida. O antígeno, clone, fabricante e diluição utilizados estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 – Características dos anticorpos utilizados nesse estudo

| Antígeno | Diluição | Clone | Fabricante |
|--------------------|-----------------|--------------|-------------------|
| KIT | 1:600 | CD117 | DAKO |
| CD34 | 1:100 | QBEnd/10 | Novocastra |
| S100 | 1:10000 | Z0311 | DAKO |
| Desmina | 1:200 | D33 | DAKO |
| PKC θ | 1:50 | 27 | BD Biosciences |
| Fosfo-PKC θ | 1:50 | | Cell Signaling |
| DOG1* | 1:50 | K9 | Novocastra |
| IGF1R | 1:300 | 111A9 | Cell Signaling |

* Esse anticorpo foi gentilmente cedido pelo Dr. Christopher Corless de Oregon Health and Science University (Portland, OR, EUA).

e. Detecção do anticorpo primário:

A incubação com o anticorpo primário foi seguida por 3 lavagens de 5 minutos com PBS contendo NP40 0.05% (Usb Corp.). O kit Novolink (Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle, UK) foi utilizado para aumentar a sensibilidade da detecção do anticorpo primário. O Novolink é composto por um bloqueador pós-primário, que bloqueia ligações não-específicas do polímero, e por um polímero que possui um formato compacto, o que permite que ele alcance antígenos inacessíveis para os polímeros de cadeias longas, e contém uma grande proporção de enzimas, com o objetivo de aumentar a sensibilidade. Para a detecção do anticorpo primário, após as lavagens, as lâminas foram incubadas com o bloqueador pós-primário (Novocastra

Laboratories Ltd., Newcastle, UK) por 30 minutos. Após a incubação com o pós-primário, as lâminas foram incubadas por 30 minutos com o polímero Novolink (Novocastra Laboratories Ltd.), seguido por 3 lavagens de 5 minutos com PBS contendo NP40 0.05% (Usb Corp.).

f. Revelação:

As lâminas foram incubadas com 3,3' tetrahidroclorídrico diaminobenzidina (DAB) (DAKO Corp., Carpinteria, CA, EUA) diluído em 10mL de PBS por 5 minutos em temperatura ambiente, seguido por uma lavagem em água corrente por 5 minutos. O DAB foi utilizado como cromógeno, por ser um dos substratos mais sensíveis para a peroxidase

g. Contra-coloração:

As lâminas foram contra-coradas em solução de hematoxilina de Harris (Merck & Co) por 40 segundos. A contra-coloração foi utilizada para que fosse possível a visualização das estruturas não reconhecidas pelos anticorpos. A hematoxilina foi utilizada por colorir os componentes aniônicos (ácidos) dos tecidos e estruturas basofílicas.

i. Desidratação e montagem das lâminas:

Com o objetivo de aumentar a sobrevivência do preparado histológico foi feita uma desidratação através da imersão das lâminas em etanol 90, 70 e 100% por 3 minutos, seguido da imersão em xilol por 5 minutos. As lâminas foram montadas e cobertas com lamínulas utilizando a goma de damar (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil) diluída em xilol (Isofar, Rio de Janeiro, RJ, BR).

As condições de funcionamento de cada anticorpo utilizado nesse estudo foram padronizadas utilizando lâminas convencionais de tecidos, os quais sabidamente expressam a proteína a ser analisada (controle positivo). O controle positivo utilizado para o anticorpo primário anti-KIT, que reconhece o receptor tirosina quinase KIT, foi um GIST, que sabidamente expressa a proteína KIT. Como o anticorpo anti-CD34 marca células hematopoiéticas primitivas e células endoteliais, os controles positivos utilizados na padronização desse anticorpo foram células hematopoiéticas presentes nos

vasos sanguíneos. O anticorpo anti-desmina marca células de músculo liso e estriado e por esse motivo o controle positivo utilizado foram células musculares do estômago. As células de Schwann provenientes de um schwannoma de coxa são sabidamente reconhecidas pelo anticorpo anti-S100 e, portanto, foram utilizadas como controle positivo na padronização do anticorpo anti-S100. Para o anticorpo primário anti-DOG1, um GIST, tumor onde essa proteína foi descoberta, foi utilizado. Como os anticorpos anti-PKC θ e anti-fosfo-PKC θ marcam linfócitos, um linfonodo foi utilizado como controle positivo. Já para o anticorpo anti-IGF1R, um carcinoma de próstata foi utilizado como controle positivo.

Para o controle negativo, o anticorpo primário foi omitido durante o procedimento.

3.2.3. QUANTIFICAÇÃO

A quantificação das áreas marcadas pela imuno-histoquímica foi feita em conjunto com o patologista Dr. Sérgio Romano em microscópio óptico comum e os resultados foram classificados da seguinte maneira:

- Anticorpos anti-KIT, anti-CD34, anti-S100 e anti-desmina

A classificação da marcação das proteínas KIT, CD34, S100 e desmina foi baseada somente na positividade de células marcadas, uma vez que o objetivo era somente identificar a presença ou ausência das mesmas (positiva ou negativa) (tabela 2). Dessa forma, não foi necessário quantificar a marcação ou identificar o grau de intensidade de marcação dessas proteínas.

Tabela 2 – Classificação da expressão por imuno-histoquímica das proteínas KIT, CD34, S100 e desmina

| Intensidade de células marcadas | Classificação |
|---|----------------------|
| Nenhuma marcação ou marcação fraca em todas as células tumorais | Negativo |
| Marcação forte ou marcação fraca em algumas células tumorais | Positivo |

- Anticorpos anti-PKC θ , anti-fosfo-PKC θ , anti-IGF1R e anti-DOG1

O objetivo dessa parte do trabalho foi caracterizar o padrão da expressão das proteínas PKC θ , fosfo-PKC θ , IGF1R e DOG1 e quantificar essas expressões, através das análises da intensidade, e também da porcentagem de células marcadas. A intensidade de marcação foi dividida em quatro graus: 0, 1, 2 e 3, de acordo com os critérios da tabela 3.

A quantificação final da expressão (*score*) foi determinada através da multiplicação da quantidade de células marcadas pela intensidade da marcação da proteína analisada em cada tumor incluído [Guimaraes e colaboradores, 2009]. O valor de *score* foi utilizado como instrumento durante as análises estatísticas de comparação.

Tabela 3 – Critérios para classificação da intensidade de marcação das células tumorais

| Características | Graus de intensidade |
|---|-----------------------------|
| Ausência de expressão | 0 |
| >5% das células marcadas com uma expressão fraca | 1 |
| >5% das células marcadas com uma expressão moderada | 2 |
| >5% das células marcadas com uma expressão forte | 3 |

3.3. ANÁLISE DA MUTAÇÃO DOS GENES *PDGFRA* E *KIT* NOS TUMORES GISTs KIT-NEGATIVO

Uma vez que a nossa investigação teve foco nos GISTs KIT-negativo, apenas nestes foi realizada a extração de DNA com posterior análise por sequenciamento direto dos genes *KIT* e *PDGFRA*.

Para as análises de mutação nos genes *PDGFRA* e *KIT*, o DNA foi submetido à reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento direto.

3.3.1. EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO A PARTIR DOS TECIDOS TUMORAIS INSERIDOS EM PARAFINA

O DNA genômico de cada GIST KIT-negativo incluído nesse estudo foi extraído de tecido inserido em parafina. Um esquema do procedimento de extração pode ser observado na figura 11. Os tecidos foram submetidos à desparafinização, seguido pela extração de DNA utilizando o kit *wizard genomic DNA purification* (Promega Corp., Madison, WI, EUA), que é composto pelo tampão de lise celular e pelo tampão de precipitação de proteínas. A extração do DNA consistiu em 5 etapas:

a. Desparafinização:

Cinco cortes de 10 μ M de tecido inserido em parafina de cada tumor incluído foram inseridos em um microtubo de 1,5 mL contendo xilol e mantidos por 30 minutos no termobloco (Eppendorf, Westbury, NY EUA) a 95°C. Em seguida os cortes sofreram lavagens seriadas com etanol nas concentrações de 70, 90 e, 100%, como descrito na literatura [Gomes e colaboradores, 2007] para evitar o excesso de xilol, o qual inibiria as etapas a seguir.

b. Digestão enzimática pela proteinase K:

Para a digestão dos tecidos, após a sua desparafinização, o mesmo foi ressuspense em 200-500 μ L da solução de digestão (KCl 50 mM, Tris-HCl pH 8.0 10 mM; EDTA 0,1 mM; Tween 20[®] 0,5% (Usb Corp.), fornecida pelo kit *wizard genomic DNA purification* (Promega Corp.), H₂O destilada e proteinase K (200 μ g/mL) (BioAmerica Inc., Miami, FL, EUA), seguido pela incubação a 65°C por 12 horas. Após as 12 horas de incubação, a proteinase K foi renovada, seguida de uma nova incubação a 65°C por mais 6 horas. Após a

digestão, centrifugou-se a solução a 13.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo.

c. Precipitação de proteínas:

Para tentar obter um DNA com alto grau de pureza, foi feita uma precipitação de proteínas adicionando uma solução de acetato de amônio a 7,5M, também fornecida pelo kit *wizard genomic DNA purification* (Promega Corp.), ao sobrenadante resultante da centrifugação da etapa anterior, seguido por homogeneização e incubação a 4°C por 5 minutos. Em seguida, a solução foi centrifugada por 5 minutos a 13.000 rpm e o sobrenadante resultante foi transferido para outro microtubo.

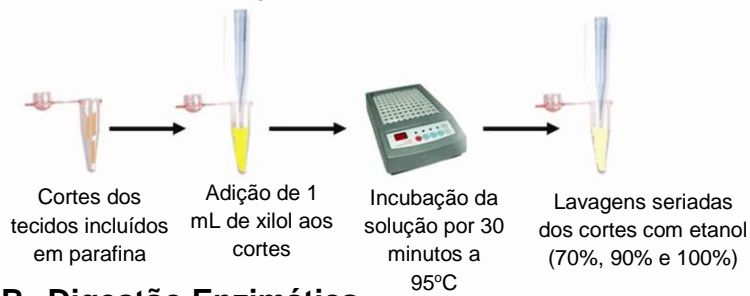
d. Precipitação de DNA:

O DNA das amostras foi precipitado através da adição de isopropanol (Merck & Co.), seguido por uma incubação a -80°C por 12 horas. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 13.000 rpm e o precipitado contendo o DNA foi submetido a lavagens com solução de etanol 95% por 3 vezes.

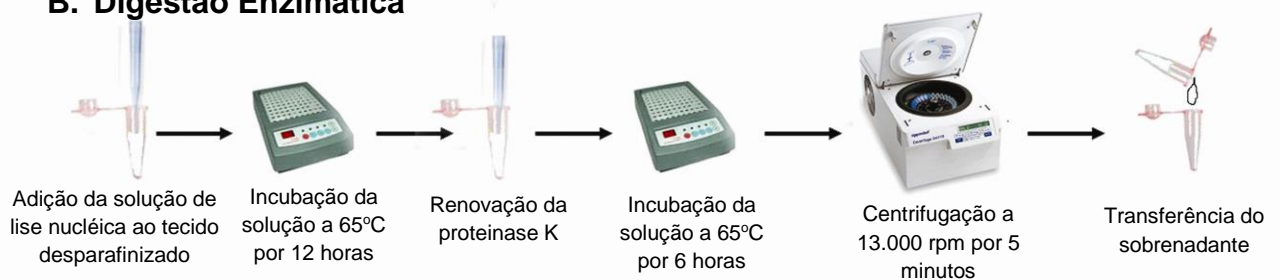
e. Ressuspensão do DNA:

O precipitado contendo DNA, após retirada completa do etanol, foi solubilizado em 50 a 70µL de TE (Tris 100 mM, EDTA 10 mM) a 37°C por 30 minutos. O DNA diluído em TE foi armazenado a -20°C até a sua utilização.

A. Desparafinização



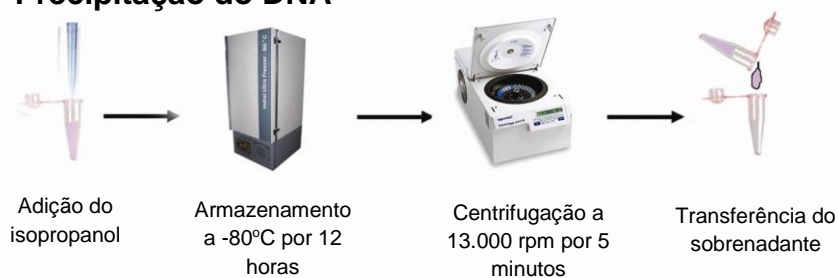
B. Digestão Enzimática



C. Precipitação de Proteínas



D. Precipitação do DNA



E. Solubilização do DNA

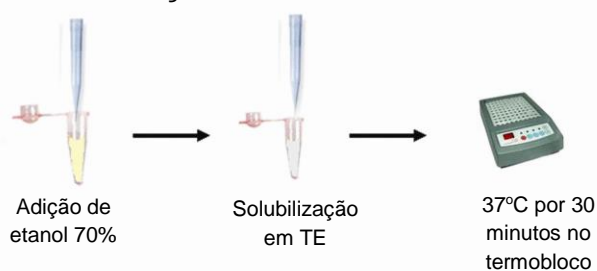


Figura 11 - Esquema reproduzindo a extração de DNA utilizada nesse estudo.

3.3.2. QUANTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA QUALIDADE DO DNA

Primeiramente, a qualidade do DNA extraído foi determinada através da corrida em gel de agarose (0.8%). Posteriormente, a concentração de DNA das amostras foi obtida através da leitura por absorvância no comprimento de onda de 260nm utilizando o espectrofotômetro *Nanodrop* (ThermoFisher Scientific). No comprimento de onda de 260nm, uma unidade de densidade ótica corresponde a 50µg de RNA por µL (Sambrook & Russell, 2001). De cada amostra, 1µL do concentrado total do DNA foi utilizado para a quantificação. Para confirmar a qualidade do DNA obtido, foi realizada uma nova leitura utilizando o comprimento de onda de 280nm. Essa nova leitura foi, então, utilizada para o cálculo da razão 260/280. Os valores ideais de pureza do DNA estão compreendidos entre 1,8 e 2,0.

3.3.3. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA AMPLIFICAÇÃO DOS EXONS 12, 14 E 18 DO GENE *PDGFRA*

Os exons 12, 14 e 18 do gene *PDGFRA* foram analisados porque neles se encontram todas as mutações descritas até o momento para esse gene.

A sequência dos iniciadores, tamanho do amplicon obtido e a localização dos iniciadores para amplificação de cada exon do gene *PDGFRA* estão especificados na tabela 4. As reações de PCR foram realizadas no termociclador *Applied Biosystems* (Applied Biosystems, Austin, CA, EUA). As seguintes condições foram utilizadas para as reações de amplificação dos exons 12 e 18: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento dos iniciadores a 60°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos. Para a amplificação do exon 14, as seguintes condições foram utilizadas: desnaturação inicial a 95°C por 4 minutos, seguido por 45 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento dos iniciadores a 56°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1

minuto. Os reagentes, bem como as concentrações utilizadas para a amplificação dos exons 12, 14 e 18 podem ser encontradas na tabela 5.

Tabela 4 – Características dos iniciadores utilizados para amplificar os exons 12, 14 e 18 do gene *PDGFRA* [Corless e colaboradores, 2005; Gomes e colaboradores, 2007]

| Exon | Anelamento dos iniciadores | Sequência (5' → 3') | Tamanho do amplicon amplificado |
|-------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--|
| 12 | Intron 11 | Senso: CTCTGGTGCACCTGGGACTTT | 225pb |
| | Intron 13 | Anti-senso: AAAGGGAGTCTTGGGAGGTT | |
| 14 | Intron 13 | Senso: TGGTAGCTCAGCTGGACTGAT | 280pb |
| | Intron 15 | Anti-senso: GGGATGGAGAGTGGAGGATT | |
| 18 | Intron 17 | Senso: ACCATGGATCAGCCAGTCTT | 220 pb |
| | Intron 19 | Anti-senso: TGAAGGAGGATGAGCCTGACC | |

Tabela 5 – Reagentes, concentrações e volumes utilizados para a amplificação dos exons 12, 14 e 18 do gene *PDGFRA* por PCR

| Reagentes e concentrações | Amplicons 12, 14 e 18 |
|--|-----------------------|
| Tampão 10X | 5,0 µL |
| dNTP 2mM | 5,0 µL |
| MgCl ₂ 50mM | 1,5 µL |
| Iniciador senso 10mM | 3,0 µL |
| Iniciador anti-senso 10mM | 3,0 µL |
| Taq DNA polymerase <i>platinum</i> ® 5U/µL | 0,4 µL |
| DNA | 4 µL |
| Água Mili-Q | Suficiente para 50 µL |

3.3.4. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA AMPLIFICAÇÃO DOS EXONS 9, 11, 13 E 17 DO GENE *KIT*

Assim como para o gene *PDGFRA*, apenas alguns exons foram analisados no gene *KIT* (éxons 9, 11, 13, e 17), por terem sido encontradas neles praticamente todas as mutações descritas previamente na literatura e implicadas na carcinogênese dos GISTs.

Na tabela 6, podem ser encontrados a sequência dos iniciadores, tamanho do amplicon obtido e a localização dos iniciadores para amplificação de cada exon do gene *KIT*. As reações de PCR foram realizadas no termociclador *Veriti* (Applied Biosystems), utilizando as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguido por 40 ciclos de

desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento dos iniciadores a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos. Os reagentes e todas as concentrações utilizadas para a amplificação dos exons 9, 11, 13 e 17 do gene *KIT* podem ser encontradas na tabela 7.

Tabela 6 – Características dos iniciadores utilizados para amplificação dos éxons 9, 11, 13 e 17 do gene *KIT* [Hirota e colaboradores, 1998]

| Exon | Anelamento dos iniciadores | Sequência (5' → 3') | Tamanho do amplicon amplificado |
|------|----------------------------|------------------------------------|---------------------------------|
| 9 | Intron 8 | Senso: TTCCTAGAGTAAGCCAGGGC | 283pb |
| | Intron 10 | Anti-senso: ACAGAGCCTAAACATCCCCT | |
| 11 | Intron 10 | Senso: GTGATGATTCTGACCTACAAAT | 296pb |
| | Intron 12 | Anti-senso: TGTACCCAAAAAGGTGACATG | |
| 13 | Intron 12 | Senso: CTGCATGCGCTTGACATCAG | 261 pb |
| | Intron 14 | Anti-senso: CTAGCATTGCCAAAATCATATT | |
| 17 | Intron 16 | Senso: GTTTTCTTTTCTCCTCCAACCT | 189 pb |
| | Intron 18 | Anti-senso: CCTTTGCAGGACTGTCAAGC | |

Tabela 7 – Reagentes, concentrações e volumes utilizados para amplificar os éxons 9, 11, 13 e 17 do gene *KIT* por PCR.

| Reagentes e concentrações | Amplicons 9, 11, 13 e 17 |
|--|--------------------------|
| Tampão 10X | 5,0 µL |
| dNTP 2mM | 6,25 µL |
| MgCl ₂ 50mM | 3,0 µL |
| Iniciador senso 10mM | 3,0 µL |
| Iniciador anti-senso 10mM | 3,0 µL |
| Taq DNA polymerase <i>platinum</i> ® 5U/µL | 0,4 µL |
| DNA | 4 µL |
| Água Mili-Q | Suficiente para 50 µL |

Todos os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo. Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados através da luz ultravioleta e fotografados utilizando um equipamento de fotodocumentação *Geldoc* (BioRad, Richmond, CA, EUA). Após a confirmação da amplificação dos *amplicons* desejados, os produtos foram armazenados a 4°C até o seu uso.

3.3.5. PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DE PCR

Para eliminar qualquer substância que pudesse inibir a reação de sequenciamento, os produtos de PCR foram purificados através da utilização do *kit illustra GFX™ PCR DNA and GEL Band Purification* (Ge Healthcare,

Chalfont St. Giles, UK) seguindo o protocolo do fabricante. Um volume de 500 μL do tampão de captura foi colocado em colunas que contém uma matriz de vidro que é capaz de reter o DNA, e, então, o produto de PCR era adicionado a esse tampão de captura e o microtubo contendo o tampão de captura e o produto de PCR submetidos à centrifugação a 13.000 rpm por 30 segundos. O eluído foi descartado e foi adicionado um volume de 500 μL do tampão de lavagem. Essa solução foi submetida a uma nova centrifugação a 13.000 rpm por 30 segundos e após a centrifugação, as colunas foram transferidas para microtubos de 1,5 mL de volume. Foi adicionado, então, um volume 15-25 μL do tampão de eluição no centro de cada coluna. Após o tempo de espera de 1 minuto, recomendado pelo kit, os microtubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 1 minuto, e, então, as colunas foram descartadas e a eluição contendo o produto de PCR purificado foi armazenado a -20°C até o seu uso.

3.3.6. SEQUENCIAMENTO AUTOMÁTICO

O sequenciamento foi feito em colaboração com o Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática da FIOCRUZ, no sequenciador automático *3730 DNA Analyzer* (Applied Biosystems). A reação utilizando o *kit Big-Dye Terminator* foi realizada no sentido senso e anti-senso de acordo com as condições padronizadas previamente [Otto e colaboradores, 2008].

Inicialmente, as soluções contendo o DNA, os iniciadores (senso ou anti-senso a 5mM) e água DEPC (Sigma Chemical CO) foram distribuídas em placas de 96 poços, totalizando um volume de 7,5 μL por poço. A cada poço foi adicionado 1 μL da solução de Big Dye contendo ddNTPs (dNTPs marcados com corantes fluorescentes que vão ser incorporados às fitas de DNA e poderão ser lidos pelo sequenciador) e 1,5 μL do tampão de sequenciamento 5X. A reação do sequenciamento foi realizada no termociclador *Applied Biosystems* (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 94°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos, com 40 repetições desse ciclo.

Os produtos de reação de sequenciamento foram, então, precipitados para retirada de ddNTPS livres que poderiam interferir na leitura da sequência de DNA. Para isso, a placa foi centrifugada brevemente e foram adicionados 30 µL de isopropanol a 75% em cada poço, seguido por homogeneização manual por 10 segundos e por uma incubação sob abrigo da luz por 15 minutos. Após a incubação, as amostras foram submetidas a uma centrifugação a 4.000 rpm por 45 minutos, o sobrenadante foi descartado e, então, 50 µL de etanol a 75% foram adicionados em cada poço. Para eliminar o máximo possível de etanol, a placa foi submetida a uma centrifugação invertida, onde a centrífuga chegou até 600 rpm e a centrifugação foi interrompida, seguida por uma incubação a 60°C por 10 minutos sob abrigo da luz.

Após o processo de precipitação, os produtos da reação de sequenciamento foram submetidos à eletroforese no sequenciador através da desnaturação, adicionando 10 µL de formamida, fator altamente desnaturante que permite a separação das duas fitas de DNA. A placa foi, então, colocada a 95°C por 3 minutos sob abrigo da luz, seguido por uma incubação a 4°C por 5 minutos.

A placa contendo as amostras foi, então, colocada no sequenciador automático *3730 DNA Analyzer* (Applied Biosystems), que utiliza capilares. No sequenciador, as amostras de DNA marcadas com ddNTPs foram aplicadas a um gel de capilar e submetidas à eletroforese. A migração do DNA foi detectada e o resultado foi gerado pelo programa, como mostra a figura 12.

3.3.7. ANÁLISE NAS ALTERAÇÕES NAS SEQUÊNCIAS DOS GENES *PDGFRA* E *KIT*

As sequências genéticas foram analisadas através do uso do programa Sequencher™ versão 4.1.1 (Gene Codes Corporation, <http://www.genecodes.com>). Como sequências referências para os genes *PDGFRA* e *KIT* foram utilizadas as sequências selvagens obtidas pelo genoma humano presente no banco de dados do NCBI (NG_009250.1 e NG_007456.1,

respectivamente). A descrição das mutações encontradas foi feita de acordo com a numeração do *códon* obtido utilizando o banco de dados do Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org>).

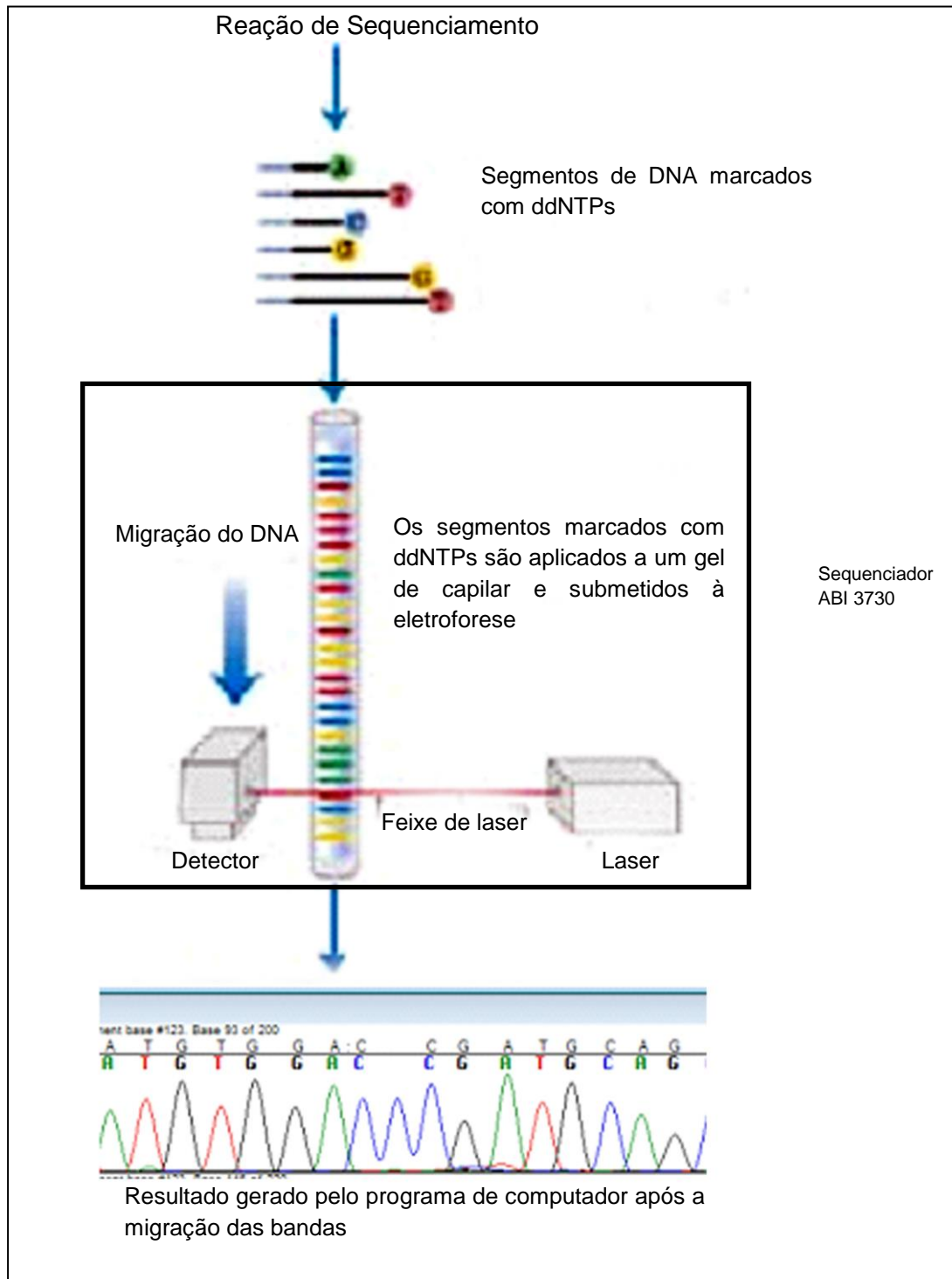


Figura 12 - Esquema reproduzindo a leitura do sequenciador automático utilizado nesse estudo (adaptado de <http://www.papociencia.ufsc.br/bio5.htm>).

3.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para garantir a qualidade da informação, os dados clínicos e moleculares foram armazenados, organizados, codificados e extraídos utilizando uma metodologia baseada no Microsoft Access 2000, que foi desenvolvida pela Área de Gerência e Análise de Dados do INCA. As análises estatísticas desse estudo foram feitas através do programa SPSS versão 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) em colaboração de Isabele Ávila Small.

Para testar a associação entre a frequência de positividade das proteínas PKC θ , fosfo-PKC θ , DOG1 e IGF1R e os tumores GISTs, com foco nos GISTs KIT-negativo, foi utilizado o teste χ^2 de Pearson. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar os *scores* de expressão dessas proteínas e os grupos tumorais inclusos. No teste de χ^2 de Pearson foram associadas as frequências de positividade das proteínas em questão nos GISTs com aquelas nos grupos de tumores mesenquimais não-GIST e tumores não-mesenquimais KIT-positivo. No teste de Mann-Whitney foram comparados, entre os grupos estudados, os *scores* de expressão das proteínas PKC θ , fosfo-PKC θ , DOG1 e IGF1R. Considerou-se como significativo um valor p menor do que 0.05.

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERÍSTICAS CLINICO-PATOLÓGICAS DOS PACIENTES INCLUÍDOS

Com o objetivo de entender e caracterizar melhor o grupo dos GISTs, principal alvo desse estudo, as características clinico-patológicas foram coletadas no prontuário eletrônico e descritas aqui.

Dentre os 68 GISTs incluídos, 42 pacientes são do gênero feminino e 26 pacientes do gênero masculino. A mediana de idade dos pacientes incluídos foi 59 anos (variação de 8 a 78 anos). O sítio primário mais frequente dentre os tumores incluídos foi o estômago (62,7%), seguido pelo intestino delgado (13,2%). Todos os casos constituem de tumores primários, exceto por 4 casos que constituem metástases hepáticas.

4.2. EXPRESSÃO DE CD34, S100 E DESMINA NOS GISTs E NOS TUMORES MESENQUIMAIS NÃO-GIST

A próxima etapa desse estudo foi caracterizar imuno-fenotipicamente o grupo dos tumores mesenquimais com o objetivo de confirmar o diagnóstico morfológico e estratificar adequadamente os grupos histopatológicos para as análises de associação.

Para isso, foi feita a análise da expressão, por imuno-histoquímica, de um painel de marcadores recomendados para o diagnóstico diferencial dos tumores mesenquimais, que são as proteínas CD34, S100 e desmina. Os resultados para a marcação da imuno-histoquímica para CD34, S100 e desmina estão sumarizados na tabela 8 e as fotos da imuno-histoquímica de casos representativos podem ser vistas na figura 13.

CD34 foi encontrado expresso na maioria dos casos de GISTs (77,9%). Dentro do grupo dos GISTs, 59,1% dos tumores KIT-negativo e 87,0% dos tumores KIT-positivo expressaram CD34. No grupo dos tumores mesenquimais

não-GIST, a frequência encontrada para CD34 (19,4%) foi menor do que para os GISTs. Dentro deste grupo a proteína CD34 foi detectada em 42,9% dos leiomiomas e em 25,0% dos leiomiossarcomas. Não foi encontrada expressão de CD34 em nenhum schwannoma.

Tabela 8 – Expressão de CD34, S100 e desmina nos GISTs e nos tumores mesenquimais não-GIST

| Marcadores | GISTs | | | Mesenquimal não-GIST | | |
|------------|-----------------|------------------|------------------|----------------------|---------------|-----------------|
| | Todos (%) | KIT-negativo (%) | KIT-positivo (%) | Leiomiossarcoma (%) | Leiomioma (%) | Schwannoma (%) |
| CD34 | 53/68 (77,9) | 13/22 (59,1) | 40/46 (87,0) | 3/12 (25,0) | 3/7 (42,9) | 0/12 (0,0) |
| S100 | 2/68 (2,9) | 0/22 (0,0) | 2/46 (4,4) | 0/12 (0,0) | 0/7 (0,0) | 10/12 (83,3) |
| Desmina | 10/68 (14,7) | 2/22 (13,6) | 8/46 (17,8) | 11/12 (91,7) | 4/7 (57,1) | 0/12 (0,0) |

A expressão da desmina foi maior nos tumores mesenquimais não-GIST do que nos GISTs. A proteína desmina foi observada em 14,7% (10/68) dos GISTs. Neste grupo a proteína estava expressa em 8/45 (17,8%) dos GISTs KIT-positivo e 3/22 (13,6%) dos GISTs KIT-negativo. Os leiomiossarcomas apresentaram uma imunoreatividade intensa e difusa para desmina em 91,7% dos casos. Nos leiomiomas, a expressão de desmina foi encontrada em 57,1% dos casos. Novamente, como ocorrido com CD34, nenhuma expressão de

desmina foi encontrada nos schwannomas. Apesar da frequência de 14,7% nos GISTs ser discretamente acima da esperada, todos os GISTs apresentaram uma expressão fraca e focal para desmina e em menor frequência do que nos leiomiossarcomas, o tipo histológico que representa o diagnóstico diferencial mais comum com GISTs.

A proteína S100 foi observada em 2/68 (2,9%) GISTs. Todos os casos que apresentaram positividade para a proteína S100 são GISTs KIT-positivo (2/46; 4,4%). Dentre os tumores mesenquimais não-GIST, a expressão da proteína S100 foi encontrada em 83,3% dos Schwannomas, que é o seu principal marcador diagnóstico. Como esperado, não foi detectada a expressão dessa proteína nos leiomiossarcomas e nos leiomiomas.

Os resultados de frequências de positividade dos marcadores corroboram os dados de literatura e confirmam o diagnóstico morfológico, e dessa maneira, distinguem os GISTs dos tumores mesenquimais não-GIST permitindo a inclusão de grupos distintos nas análises de associação.

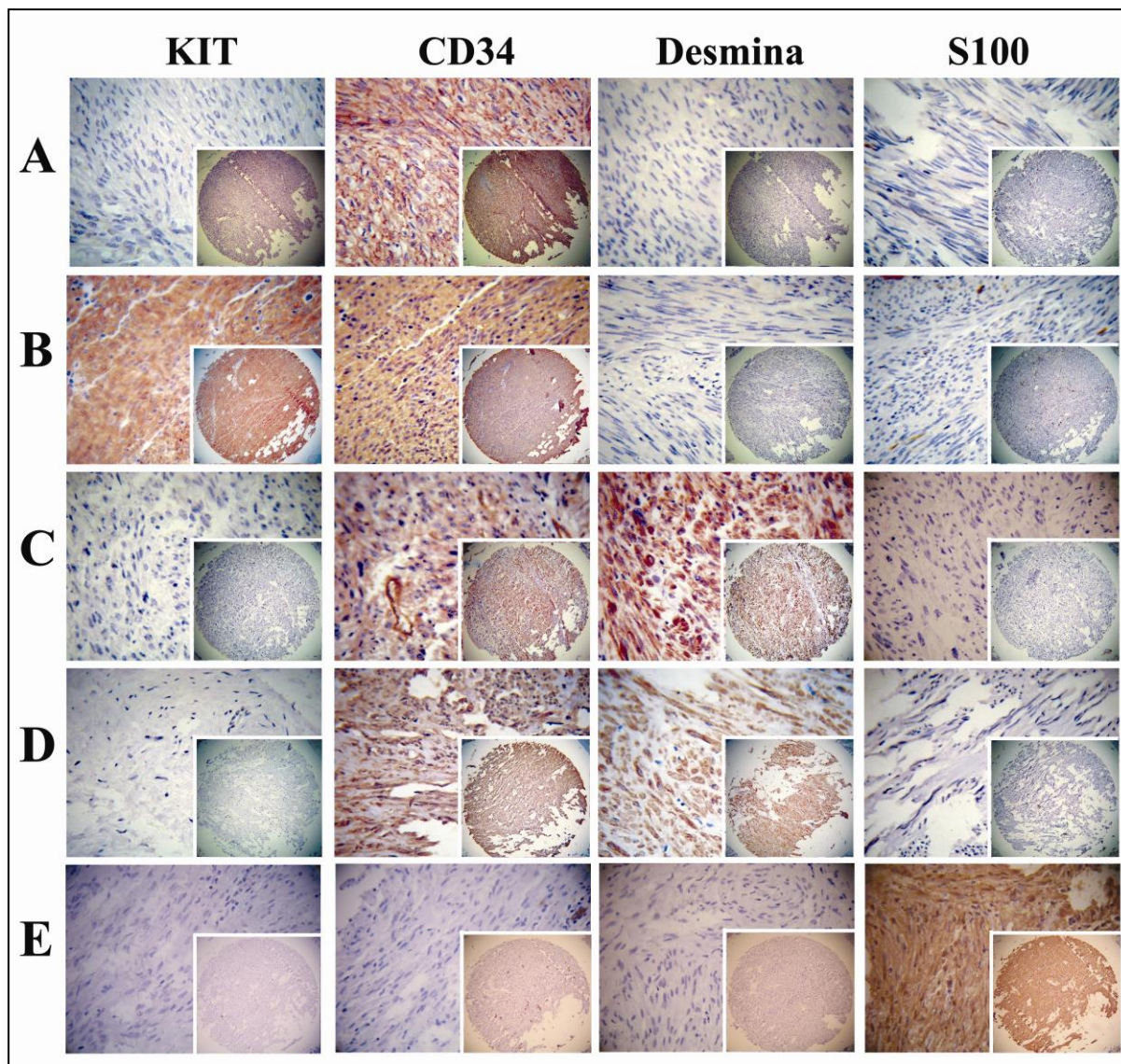


Figura 13 – Expressão das proteínas KIT, CD34, desmina e S100 nos GISTs e nos tumores mesenquimais não-GIST (40X). (A) GIST KIT-negativo; (B) GIST KIT-positivo; (C) Leiomiossarcoma; (D) Leiomioma; (E) Schwannoma. Em cada quadrado pode ser observado o aumento de 10X.

4.3. EXPRESSÃO DE PKC θ , fosfo-PKC θ , DOG1 e IGF1R NOS GISTs E NOS TUMORES NÃO-GIST

Uma vez definidos os grupos histopatológicos através da morfologia e imuno-fenotipagem, a próxima etapa desse estudo foi avaliar o padrão de expressão dos marcadores PKC θ , fosfo-PKC θ , DOG1 e IGF1R nos grupos de estudo (GISTs, tumores mesenquimais não-GIST e tumores não-mesenquimais KIT-positivo) e testar a significância de associação desses marcadores com os tumores GISTs, através da comparação entre as frequências de positividade e entre as medianas de *score* de expressão dos diferentes grupos.

Para alcançar esses objetivos, a expressão das proteínas PKC θ , fosfo-PKC θ , DOG1 e IGF1R foi analisada por imuno-histoquímica em lâmina de TMA em todos os casos incluídos. Os resultados da positividade da imuno-histoquímica estão resumidos na tabela 9.

Alguns casos não puderam ser avaliados devido ao desprendimento da amostra tumoral da lâmina de TMA. Os resultados para cada marcador serão descritos, separadamente, a seguir.

a. Expressão da proteína PKC θ

No grupo dos 68 GISTs, 65 tumores foram analisados, dentre eles 22 KIT-negativo e 43 KIT-positivo. No grupo dos 31 tumores mesenquimais não-GIST, 27 tumores foram analisados. Quanto ao grupo dos 32 tumores não-mesenquimais KIT-positivo, todos os 32 tumores puderam ser analisados.

A proteína PKC θ apresentou-se expressa de forma difusa no citoplasma das células tumorais, independentemente do tipo histológico. Casos representativos do padrão de expressão dessa proteína podem ser observados na figura 14. A expressão de PKC θ foi positiva em 76,9% dos GISTs, dos quais a positividade foi detectada em 63,6% dos GISTs KIT-negativo e em 83,7% dos

GISTs KIT-positivo. Em relação ao grupo dos tumores mesenquimais não-GIST, PKC θ foi encontrada positiva em 3 (10,7%) casos incluídos, dos quais, 1 leiomioma, 1 leiomiossarcoma e 1 schwannoma. Dentre os tumores não-mesenquimais KIT-positivo, PKC θ foi observada em 34,4% dos tumores incluídos (tabela 8).

Comparando estatisticamente as diferenças encontradas, foi observado que a frequência de positividade de PKC θ nos GISTs foi significativamente maior do que nos tumores mesenquimais não-GIST ($P<0,001$) (gráfico 1A) e do que nos tumores não-mesenquimais KIT-positivo ($P<0,001$) (gráfico 1B).

Para avaliar se PKC θ poderia vir a ser um potencial marcador de diagnóstico para os GISTs KIT-negativo, a frequência de expressão de PKC θ nos tumores GISTs KIT-negativo foi comparada com aquela dos grupos de comparação. Como ocorreu nos GISTs como um todo, a frequência de expressão de PKC θ foi significativamente maior nos GISTs KIT-negativo quando comparada com a do grupo de tumores mesenquimais não-GIST ($P<0,001$) (tabela 8; gráfico 1C) e com a dos tumores não-mesequimais KIT-positivo ($P<0,034$) (gráfico 1D). Não foi encontrada diferença significativa entre a expressão de PKC θ nos GISTs KIT-negativo e GISTs KIT-positivo ($P=0,069$) (gráfico não mostrado).

Para avaliar se, além da positividade, a intensidade da expressão de PKC θ também diferia entre os grupos tumorais incluídos nesse estudo, a mediana dos *scores* de marcação da imuno-histoquímica para PKC θ foi comparada entre os diferentes grupos.

Uma diferença significativa foi encontrada quando comparado o *score* da marcação de PKC θ nos GISTs com o dos tumores mesenquimais não-GIST (100 versus 0; $P<0,001$) (gráfico 2A) e com a dos tumores não-mesenquimais KIT-positivo (100 versus 0; $P<0,001$) (gráfico 2B). Em relação os GISTs KIT-negativo, o *score* de marcação para PKC θ também foi significativamente maior do que o dos tumores mesenquimais não-GIST (70 versus 0, $P=0,004$) (gráfico 2C) e do que o dos tumores não-mesenquimais KIT-positivo (70 versus 0; $P=0,031$) (gráfico 2D).

Nossos resultados sugerem que a proteína PKC θ seria capaz de distinguir os GISTs, incluindo os KIT-negativo, dos tumores não-GIST e, dessa forma, poderia ser um potencial marcador de diagnóstico para esse tumor.

Tabela 9 – Frequência de positividade de expressão das proteínas PKC θ , fosfo-PKC θ , DOG1 e IGF1R nos GISTs e nos tumores não-GIST

| Tumores (N) | PKCθ (%) | Fosfo-PKCθ (%) | DOG1 (%) | IGF1R (%) |
|-------------------------------|-----------------------------------|---|-----------------|------------------|
| GIST | 50/65 (76,9) | 50/66 (75,8) | 60/67 (89,6) | 54/59 (91,5) |
| GISTs KIT-negativo | 14/22 (63,6) | 14/22 (63,6) | 18/22 (81,8) | 16/19 (84,2) |
| GISTs KIT-positivo | 36/43 (83,7) | 36/44 (81,8) | 42/45 (93,3) | 38/40 (95,0) |
| Tumores não-GIST | 14/60 (23,3) | 14/60 (23,3) | 9/62 (14,5) | 48/55 (87,3) |
| Tumores Mesenquimais | 2/27 (7,4) | 3/28 (10,7) | 3/30 (10,0) | 22/29 (75,9) |
| Leiomiossarcoma | 1/12 (8,3) | 1/12 (8,3) | 0/12 (0,0) | 8/12 (66,7) |
| Leiomiomas | 1/6 (16,7) | 1/6 (16,7) | 2/7 (28,6) | 6/7 (85,7) |
| Schwannoma | 1/10 (10,0) | 1/10 (10,0) | 1/11 (9,1) | 8/10 (80,0) |
| Não-mesenquimais KIT-positivo | 11/32 (34,4) | 11/32 (34,4) | 6/32 (18,8) | 26/26 (100,0) |
| Melanoma | 4/9 (44,4) | 4/9 (44,4) | 4/9 (44,4) | 8/8 (100,0) |
| Carcinoma de grandes células | 3/9 (33,3) | 3/9 (33,3) | 0/9 (0,0) | 7/7 (100,0) |
| Carcinoma neuroendócrino | 0/4 (0,0) | 0/4 (0,0) | 0/4 (0,0) | 3/3 (100,0) |
| Seminoma | 4/10 (40,0) | 4/10 (40,0) | 2/10 (20,0) | 8/8 (100,0) |

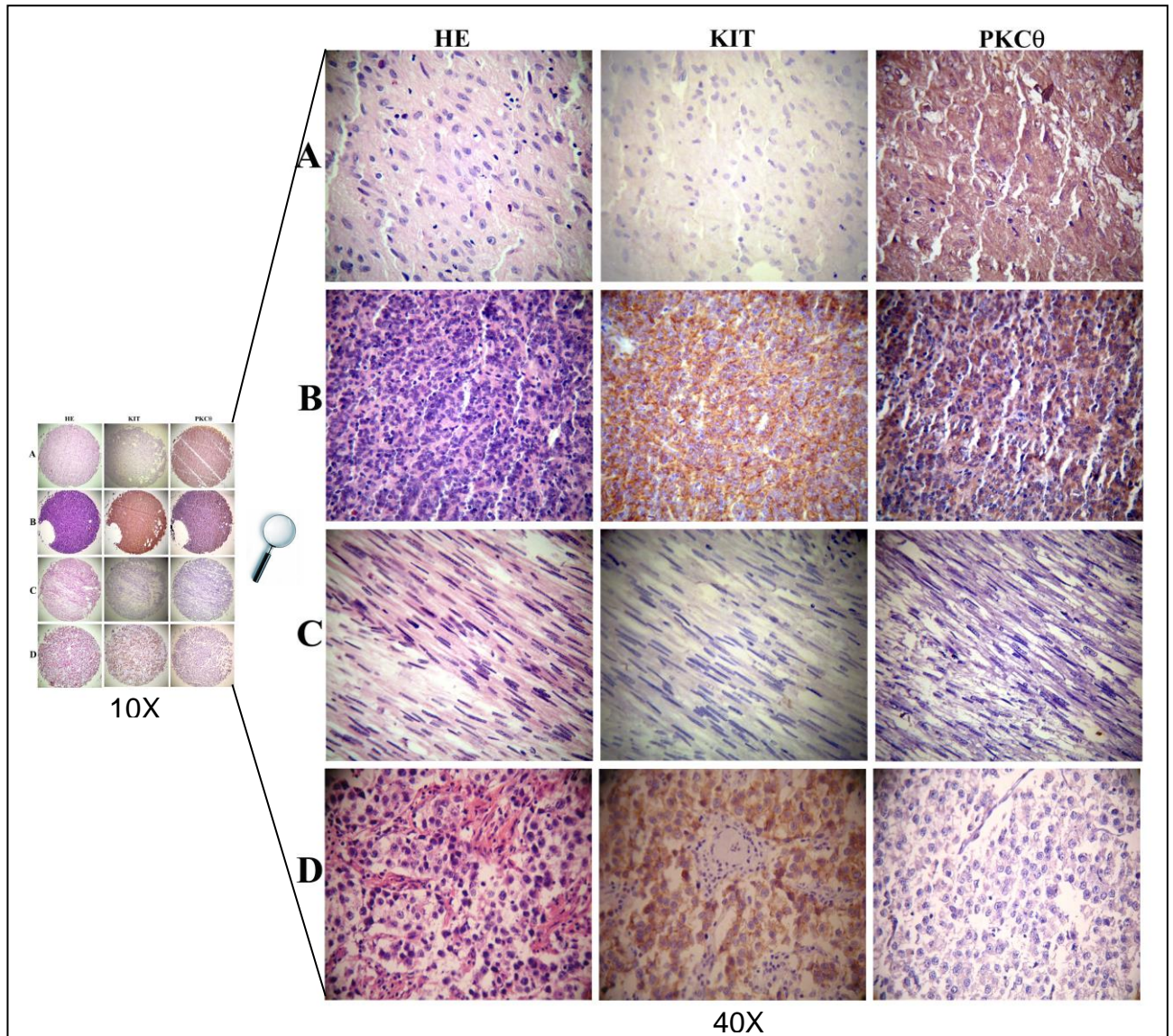


Figura 14 – Expressão de KIT e PKCθ em casos representativos de GISTs e tumores não-GIST. (A) GIST KIT-negativo; (B) GIST KIT-positivo; (C) Leiomiossarcoma e (D) Melanoma.

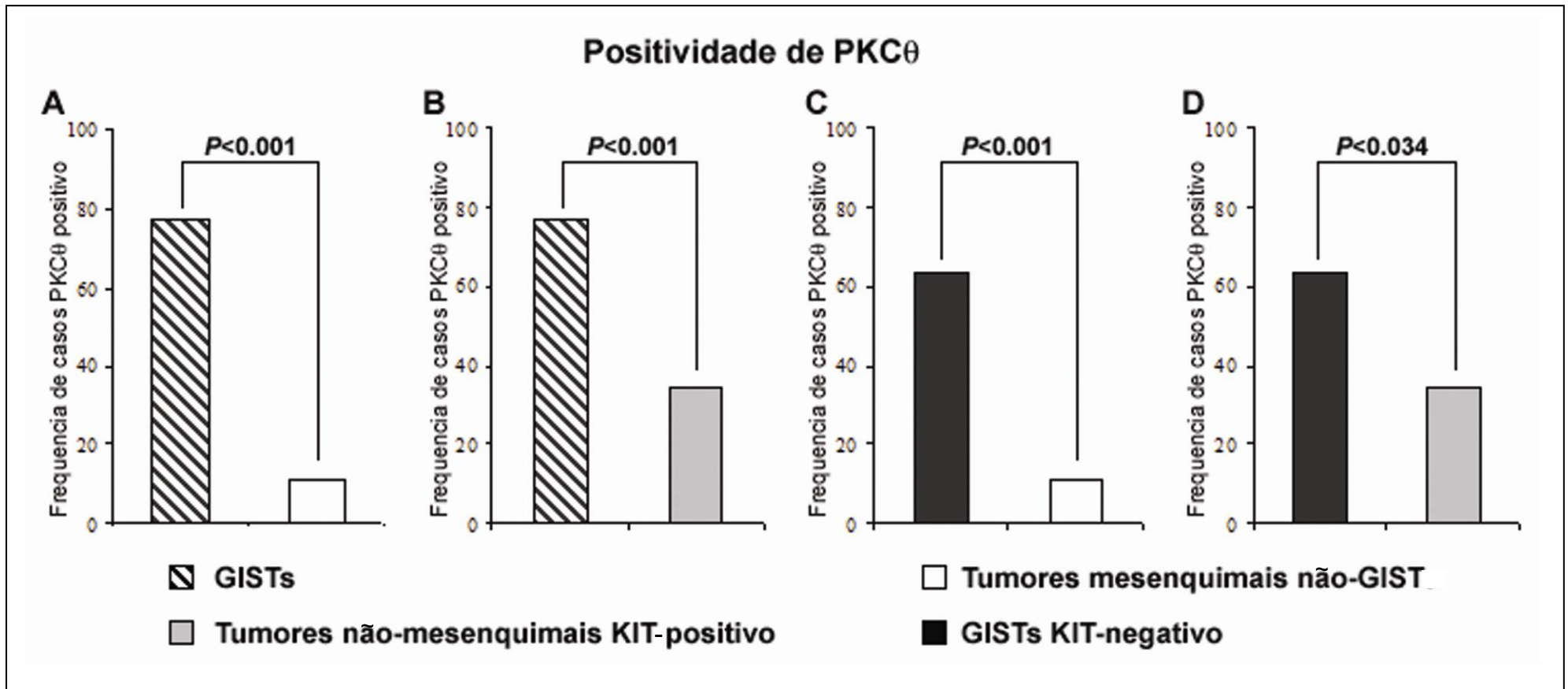


Gráfico 1 – Comparação entre as frequências de positividade da proteína PKCθ dos grupos de GISTs e GISTs KIT-negativo com aquelas dos grupos tumorais mesenquimais não-GIST e não-mesenquimais KIT-positivo.

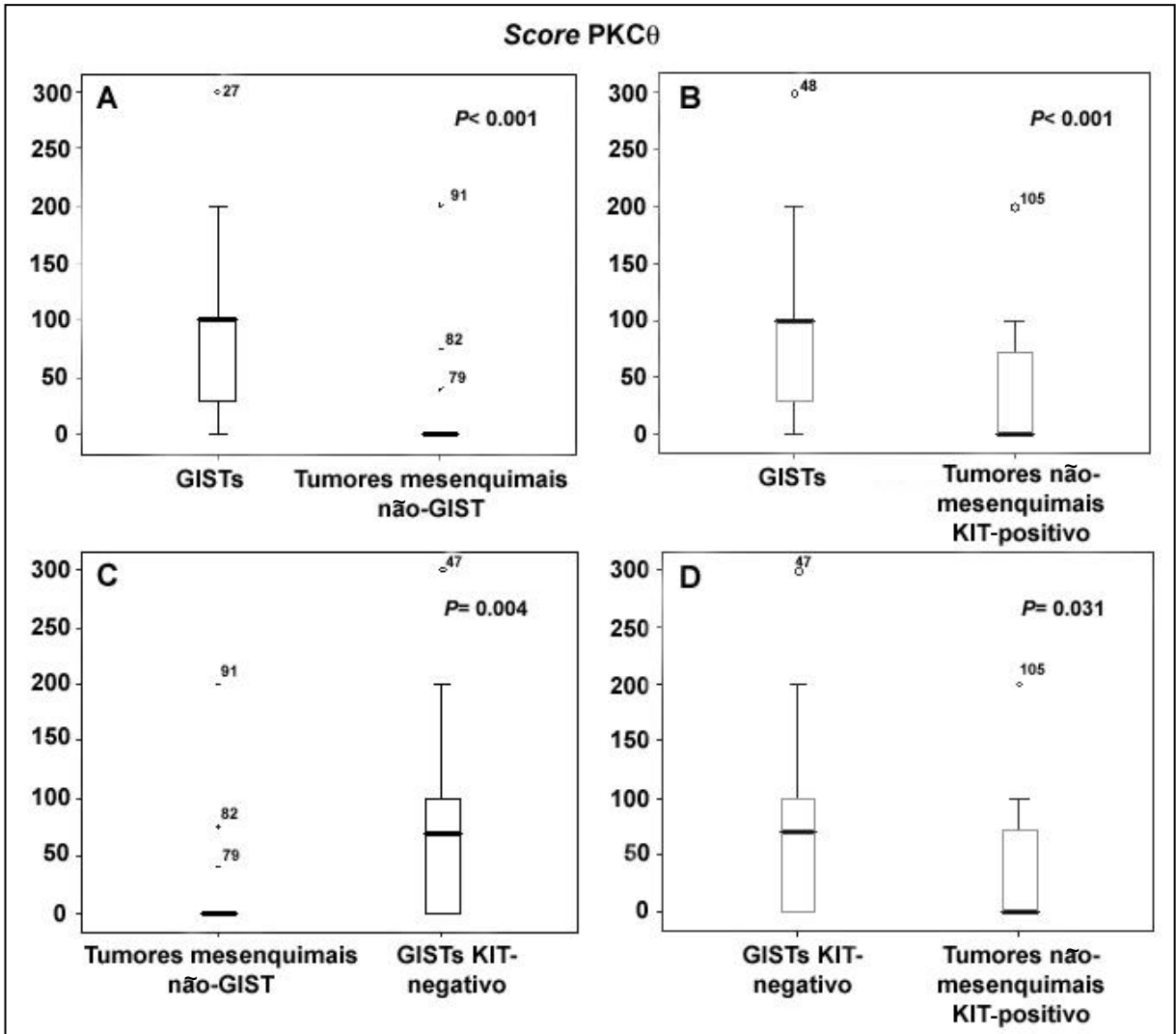


Gráfico 2 – Gráfico *box-plot* com os valores da mediana da expressão de PKC θ nos diferentes grupos tumorais incluídos.

b. Expressão da proteína fosfo-PKC θ

Da mesma maneira como foi feito para PKC θ total, com o objetivo de analisar se a forma fosforilada de PKC θ também distinguiria os grupos dos GISTs dos tumores mesenquimais não-GIST e não-mesenquimais KIT-positivo, uma imuno-histoquímica foi feita para analisar a expressão da fosforilação do resíduo 538 de PKC θ (fosfo-PKC θ) nesses tumores.

A análise da proteína fosfo-PKC θ foi possível em 67 GISTs dentre os 68 tumores incluídos, sendo 22 KIT-negativo e 45 KIT-positivo, em 28 dos 31 tumores mesenquimais não-GIST e 32 dentre os 32 tumores não-mesenquimais KIT-positivo.

O padrão de expressão da proteína fosfo-PKC θ acompanhou aquele da proteína PKC θ total. A proteína fosfo-PKC θ apresentou-se expressa de forma difusa no citoplasma dos tumores, independentemente do tipo histopatológico. Casos representativos da marcação de KIT e fosfo-PKC θ em cada grupo de tumores podem ser observados na figura 15.

Fosfo-PKC θ foi detectada positiva em 76,1% dos GISTs, dos quais sua positividade foi observada em 63,6% dos GISTs KIT-negativo e em 81,8% dos GISTs KIT-positivo. Da mesma forma que PKC θ , fosfo-PKC θ foi encontrada expressa em 3 (10,7%) casos de tumores mesenquimais não-GIST incluídos, sendo encontrada em 1 leiomioma, 1 leiomiossarcoma e 1 schwannoma. Em relação aos tumores não-mesenquimais KIT-positivo, fosfo-PKC θ foi observada em 34,4% dos tumores incluídos. Ao ser comparada, a frequência da expressão de fosfo-PKC θ dentre os GISTs mostrou-se significativamente maior do que a dos tumores mesenquimais não-GIST ($P < 0.001$) (gráfico 3A) e do que a dos tumores não-mesenquimais KIT-positivo ($P < 0.001$) (gráfico 3B).

Para avaliar se fosfo-PKC θ poderia detectar mais casos GISTs KIT-negativo e, assim como PKC θ , ser potencialmente útil como um marcador de diagnóstico para os GISTs KIT-negativo, a frequência de expressão de fosfo-

PKC θ foi comparada entre os GISTs KIT-negativo e os demais grupos tumorais incluídos nesse estudo.

A frequência de expressão de fosfo-PKC θ também foi significativamente maior nos GISTs KIT-negativo quando comparada com a dos tumores mesenquimais não-GIST ($P < 0.001$) (gráfico 3C) e com a dos tumores não-mesenquimais KIT-positivo ($P = 0.034$) (gráfico 3D). Não foi encontrada diferença significativa na expressão de PKC θ nos GISTs KIT-negativo quando comparado com os GISTs KIT-positivo ($P = 0.104$) (gráfico não mostrado).

Para avaliar se, como ocorrido com PKC θ total, a intensidade da expressão de fosfo-PKC θ também diferia entre os grupos tumorais incluídos nesse estudo, a mediana dos *scores* de marcação da imuno-histoquímica para fosfo-PKC θ foi comparada entre os grupos. Uma diferença significativa entre o *score* da marcação para fosfo-PKC θ nos GISTs foi encontrada quando comparado com o dos tumores mesenquimais não-GIST (85 versus 0; $P < 0,001$) (gráfico 4A) e com o dos tumores não-mesenquimais KIT-positivo (85 versus 0; $P < 0.001$) (gráfico 4B). Em relação aos GISTs KIT-negativo, o *score* de marcação para fosfo-PKC θ também foi significativamente maior do que o dos tumores mesenquimais não-GIST (60 versus 0, $P = 0.004$) (gráfico 4C) e do que o dos tumores não-mesenquimais KIT-positivo (60 versus 0; $P = 0.010$) (gráfico 4D).

Nossos resultados sugerem que a proteína fosfo-PKC θ também seria capaz de distinguir os GISTs dos tumores não-GISTs, com a mesma capacidade que PKC θ total.

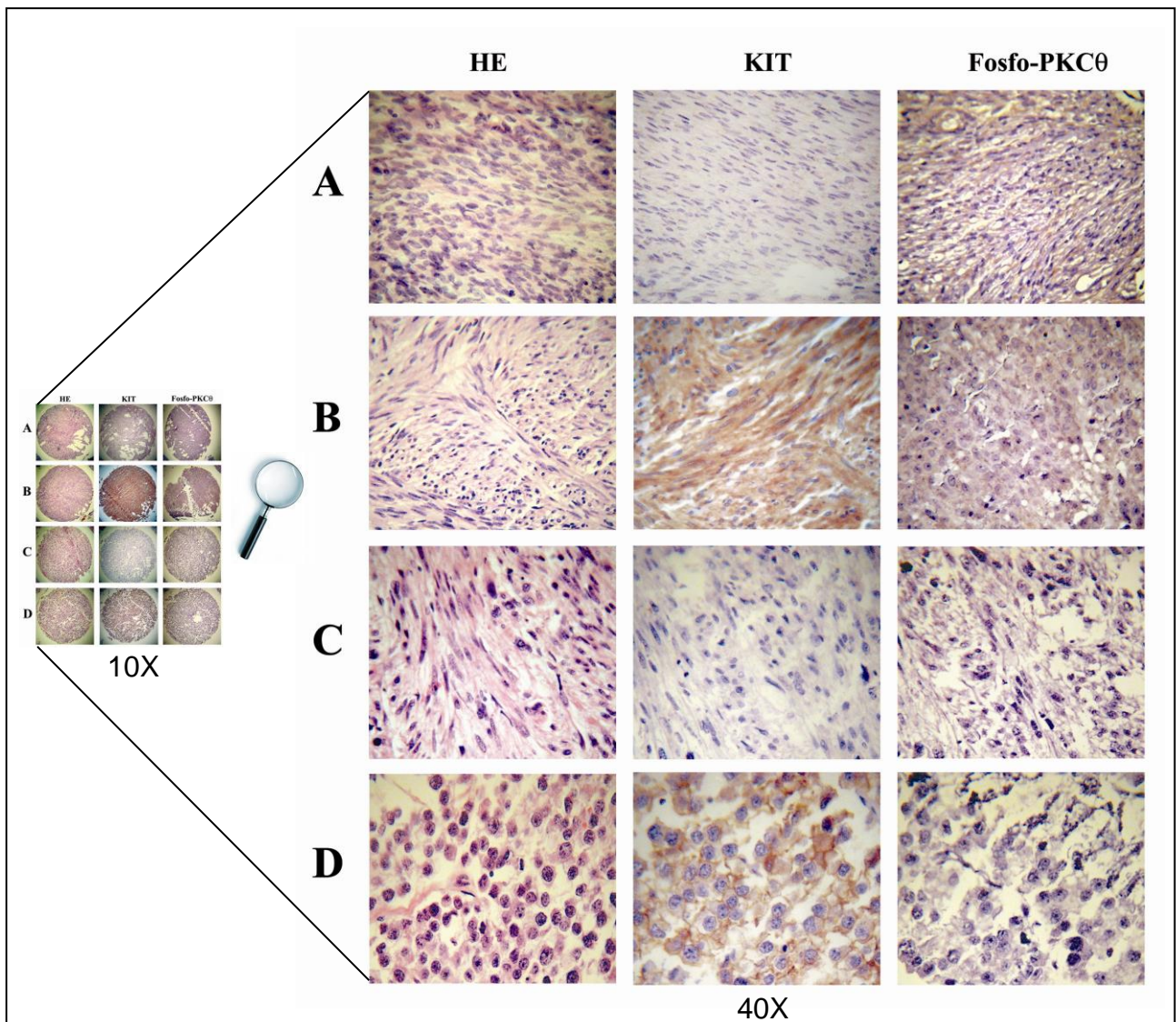


Figura 15 – Expressão de KIT e fosfo-PKC θ em casos representativos de GISTs e tumores não-GISTs. (A) GIST KIT-negativo; (B) GIST KIT-positivo; (C) Leiomiossarcoma e (D) Seminoma.

Positividade de fosfo-PKC θ

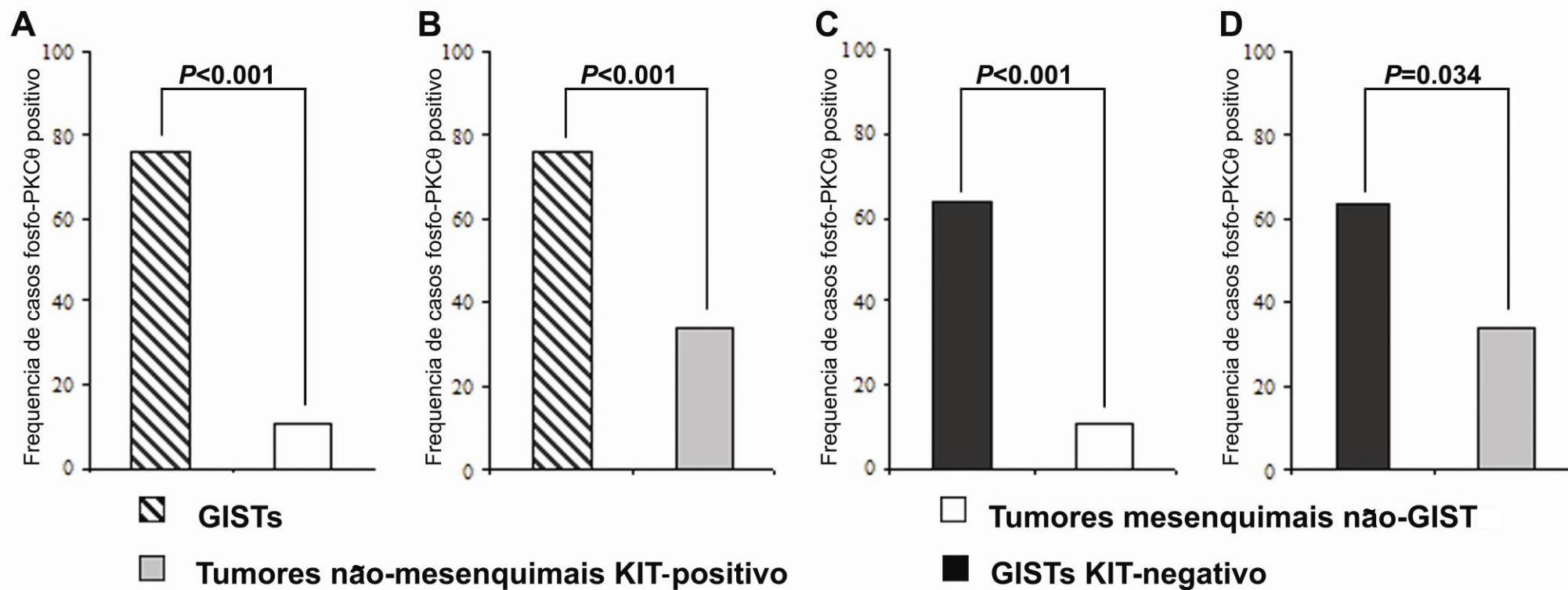


Gráfico 3 – Associação da frequência de positividade da proteína fosfo-PKC θ nos grupos tumorais incluídos.

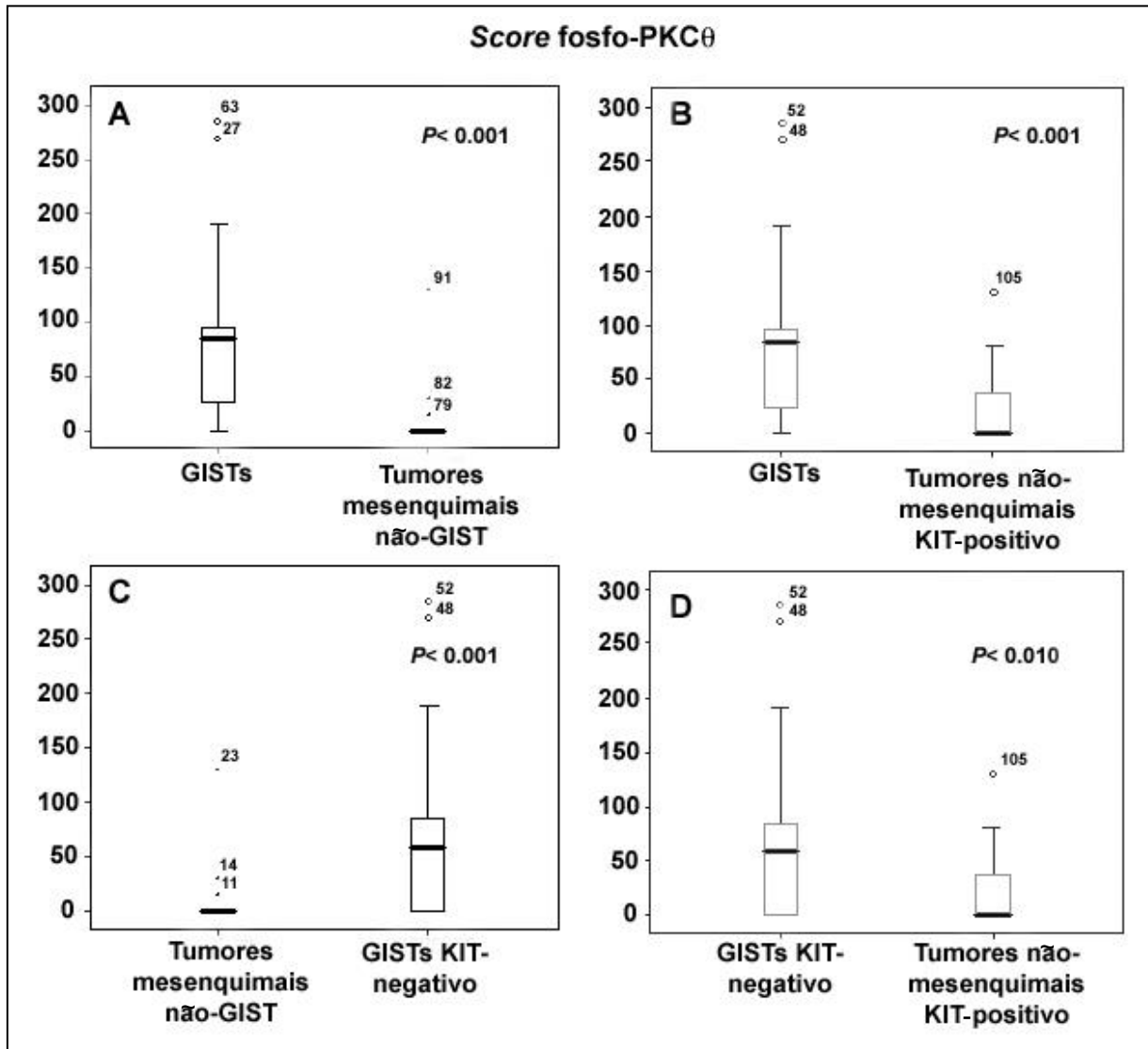


Gráfico 4 – Gráfico *box-plot* com os valores da mediana da expressão de fosfo-PKC θ nos diferentes grupos tumorais incluídos.

c. Expressão da proteína DOG1

Recentemente, estudos mostraram que a proteína com função desconhecida DOG1 está altamente expressa nos GISTs [Espinosa e colaboradores, 2008; Liegl e colaboradores, 2009; Miettinen e colaboradores, 2009; West e colaboradores, 2004]. Com o objetivo de analisar o padrão de expressão da proteína DOG1 nos GISTs da população brasileira e comparar com aquele dos tumores mesenquimais não-GIST e não-mesenquimais KIT-positivo, uma imuno-histoquímica para essa proteína foi realizada na lâmina de TMA construída para esse estudo.

Na análise da proteína DOG1 foram incluídos 67/68 GISTs (22 KIT-negativo e 45 KIT-positivo), 30/31 tumores mesenquimais não-GIST e 32/32 tumores não-mesenquimais KIT-positivo. A proteína DOG1 foi encontrada expressa de forma difusa na membrana plasmática e no citoplasma das células tumorais, independentemente do grupo tumoral analisado. Casos representativos da expressão de DOG1 em cada grupo tumoral podem ser observados na figura 16.

Os resultados de frequência e de comparação da expressão de DOG1 entre os grupos tumorais são similares aos encontrados para as análises de PKC θ e fosfo-PKC θ . No grupo dos GISTs, DOG1 se apresentou expresso em 89,6% dos tumores. Nesse grupo, 81,8% dos GISTs KIT-negativo e 93,3% dos GISTs KIT-positivo expressaram a proteína DOG1. Em relação ao grupo dos tumores mesenquimais não-GIST, a expressão de DOG1 foi detectada em apenas 10% dos tumores incluídos. É importante ressaltar que DOG1 não foi detectado em nenhum caso de leiomiossarcoma, o tipo histológico tumoral que tem o diagnóstico diferencial mais comum com GIST. No grupo dos tumores não-mesenquimais KIT-positivo, DOG1 foi encontrado expresso em 18,8% dos casos incluídos.

Comparando as diferenças encontradas, foi observada uma frequência de expressão de DOG1 significativamente mais alta nos GISTs, quando comparado com a dos tumores mesenquimais não-GIST ($P < 0.001$) (gráfico 5A)

e com a dos tumores não-mesenquimais KIT-positivo ($P<0.001$) (gráfico 5B). De maneira similar, os GISTs KIT-negativo também apresentaram uma significativa alta frequência de expressão de DOG1 quando comparados com a dos tumores mesenquimais não-GIST ($P<0.001$) (gráfico 5C) e com a dos tumores não-mesenquimais KIT-positivo ($P<0.001$) (gráfico 5D). Não foi encontrada uma diferença significativa quando a frequência de expressão de DOG1 foi comparada entre os GISTs KIT-negativo e os GISTs KIT-positivo ($P=0.148$) (gráfico não mostrado).

Assim como ocorreu para a frequência de positividade de DOG1, quando a mediana do *score* de expressão de DOG1 nos GISTs foi comparada com a dos tumores mesenquimais não-GIST, a diferença encontrada também foi significativa (100 versus 0; $P< 0.001$) (gráfico 6A). O mesmo aconteceu quando a mediana do *score* de expressão de DOG1 nos GISTs foi comparada com a dos tumores não-mesenquimais KIT-positivo (100 versus 0; $P<0.001$) (gráfico 6B). No grupo dos GISTs KIT-negativo a mediana do *score* da expressão de DOG1 também foi significativamente mais alta do que a no grupo dos tumores mesenquimais não-GIST (87,5 versus 0, $P<0.001$) (gráfico 6C) e do que a no grupo dos tumores não-mesenquimais KIT-positivo (87,5 versus 0, $P<0.001$) (gráfico 6D).

Esses resultados sugerem que, assim como PKC θ e fosfo-PKC θ , a proteína DOG1 também seria capaz de distinguir o grupo dos GISTs do grupo dos tumores não-GIST. Esses resultados sugerem que essa proteína teria um potencial como marcador de diagnóstico dos GISTs, incluindo os GISTs KIT-negativo.

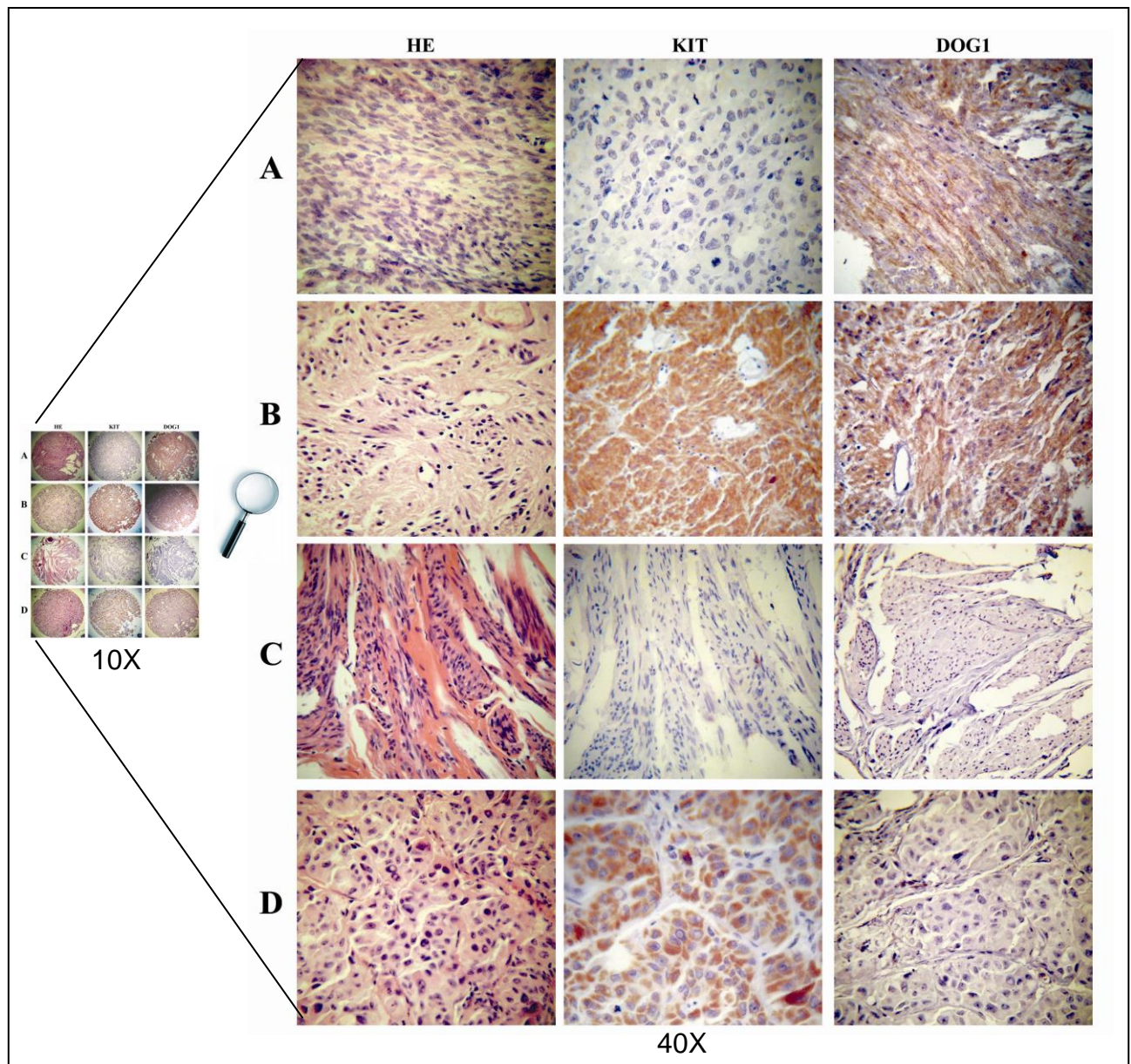


Figura 16 – Casos representativos da imuno-histoquímica para DOG1 nos grupos estudados. (A) GIST KIT-negativo, (B) GIST KIT-positivo, (C) leiomioma e (D) melanoma, mostrando o padrão de expressão de KIT e DOG1.

Positividade de DOG1

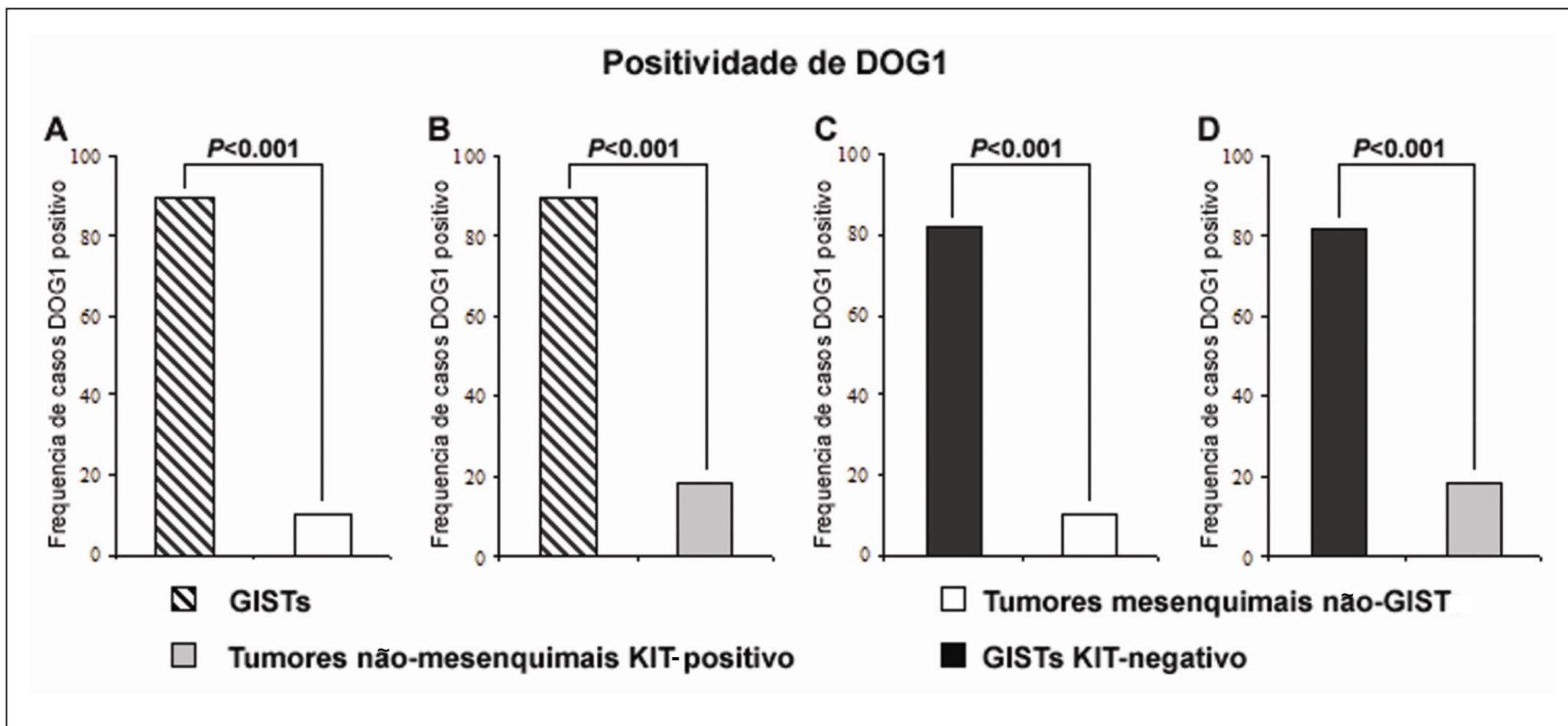


Gráfico 5 – Comparação entre as frequências de positivities da proteína DOG1 nos grupos tumorais incluídos.

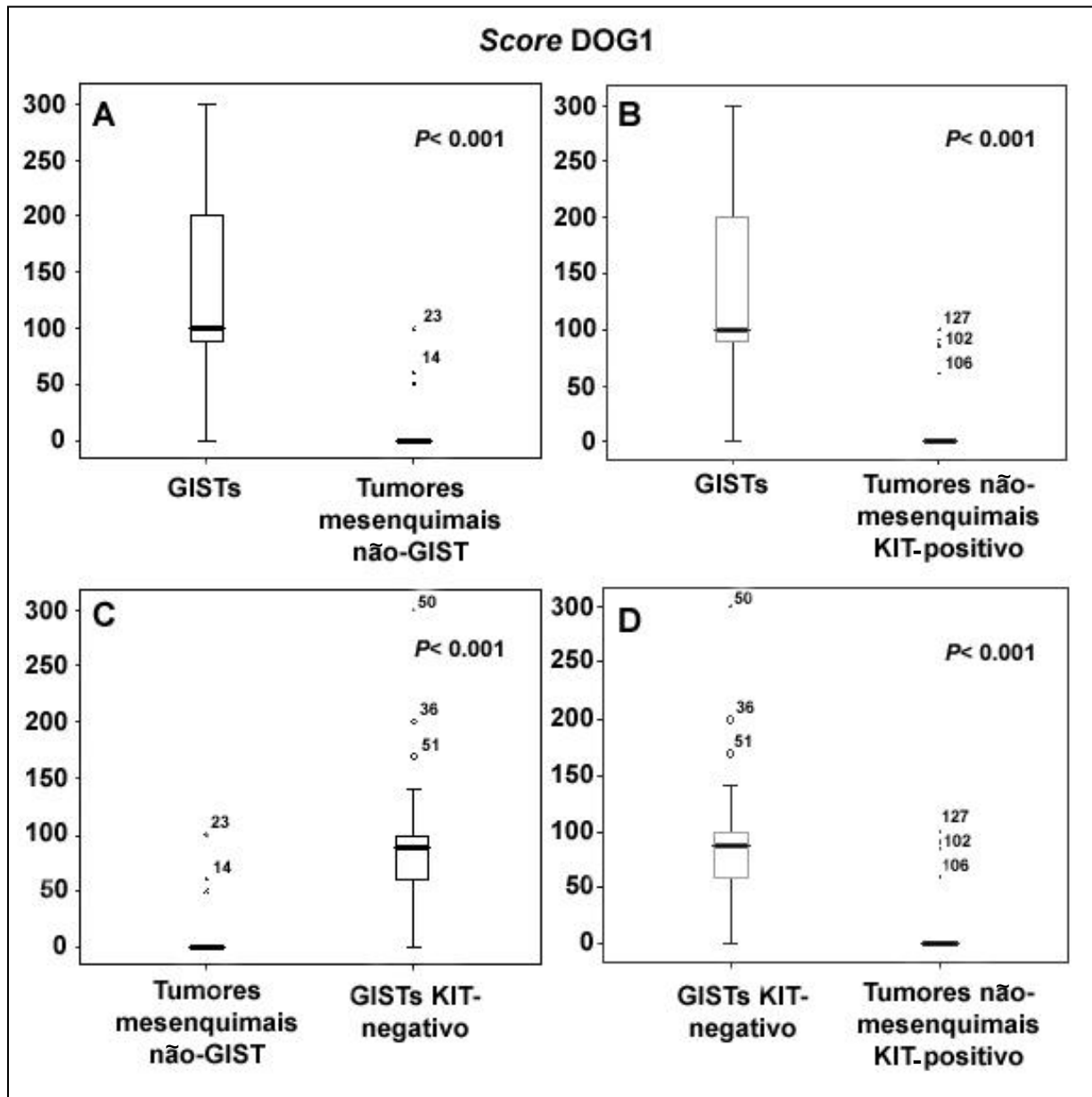


Gráfico 6 – Gráfico *box-plot* mostrando a diferença do *score* da mediana da expressão de DOG1 nos diferentes grupos tumorais incluídos.

d. Expressão da proteína IGF1R

A proteína IGF1R foi recentemente identificada como expressa nos tumores GISTs [Braconi e colaboradores, 2008; Tarn e colaboradores, 2008], contudo, nenhum trabalho até o momento investigou a expressão dessa proteína nos tumores GISTs KIT-negativo e o possível papel de biomarcador de GISTs. Portanto, com esse objetivo em mente, o padrão da expressão de IGF1R foi analisado e comparado entre os tumores incluídos nesse estudo.

Para a investigação da expressão da proteína IGF1R, foram analisados 59/68 GISTs (19 KIT-negativo e 40 KIT-positivo), 29/31 tumores mesenquimais não-GIST e 26/32 tumores não-mesenquimais KIT-positivo.

A proteína IGF1R foi encontrada expressa de forma difusa na membrana plasmática e no citoplasma das células tumorais, independentemente do grupo tumoral analisado. Casos representativos da imuno-histoquímica para IGF1R nos grupos tumorais estudados podem ser vistos na figura 17.

A expressão de IGF1R foi encontrada em 91,5% do grupo dos GISTs. Ao estratificar esse grupo, foi observada uma expressão de 84,2% nos GISTs KIT-negativo e 95,0% nos GISTs KIT-positivo. No grupo dos tumores mesenquimais não-GISTs, a proteína IGF1R estava expressa em 75,9% dos casos incluídos. Já em relação ao grupo dos tumores não-mesenquimais KIT-positivo, foi detectado uma expressão de 100% da proteína IGF1R.

Ao comparar as frequências de expressão entre os grupos tumorais, foi observada apenas uma pequena diferença, mas significativa, entre a frequência de expressão de IGF1R no grupo dos GISTs quando comparada a do grupo dos tumores mesenquimais não-GIST (91,5% versus 75,9% ($P=0.044$)) (gráfico 7A). Porém, não foi encontrada diferença significativa entre a frequência de expressão de IGF1R dos GISTs e a do grupo dos tumores não-mesenquimais KIT-positivo (91,5% versus 100%; $P=0.113$) (gráfico 7B). A frequência de expressão da proteína IGF1R no grupo dos GISTs KIT-negativo foi apenas modestamente maior do que aquela dos tumores mesenquimais não-GIST mas essa diferença não foi significativa. (84,2% versus 75,9%;

$P=0.486$) (gráfico 7C). De forma surpreendente, a frequência de expressão de IGF1R se encontrou tão elevada nos tumores não-mesenquimais KIT-positivo que quando essa frequência foi comparada com a encontrada nos GISTs KIT-negativo, a diferença foi significativa, mas dessa vez mostrando a associação do IGF1R com os tumores não-mesenquimais KIT-positivo (100 versus 84,2%, respectivamente; $P=0.030$) (gráfico 7D). Não foi encontrada diferença significativa entre as frequências de positividade de IGF1R nos GISTs KIT-negativo e nos GISTs KIT-positivo (84,2% versus 95,0%; $P=0.164$) (gráfico não mostrado).

Em relação à mediana do *score* de expressão de IGF1R, os resultados seguiram o da frequência. Foi encontrada uma diferença significativa entre o *score* dos GISTs e o dos tumores mesenquimais não-GIST, sendo maior nos GISTs (200 versus 100, respectivamente; $P=0.023$) (gráfico 8A). A mediana de *score* dos GISTs foi estatisticamente semelhante a dos tumores não-mesenquimais KIT-positivo (200 versus 200; $P=0.031$) (gráfico 8B). A mediana do *score* da expressão de IGF1R no grupo dos GISTs KIT-negativo foi igual a dos tumores mesenquimais não-GIST (100 versus 100; $P=0.930$) (gráfico 8C). E, seguindo o resultado encontrado para a frequência, a mediana do *score* da expressão de IGF1R também foi significativamente menor nos GISTs KIT-negativo do que aquela dos tumores não-mesenquimais KIT-positivo (100 versus 200; $P=0.005$) (gráfico 8D).

O resultados obtidos da expressão da proteína IGF1R corroboraram os dados recentes que mostraram uma alta expressão dessa proteína nos GISTs. Ainda, nossos resultados mostraram uma elevada expressão de IGF1R nos GISTs KIT-negativo. Entretanto, nossos resultados, mostrando que a expressão de IGF1R foi menor nos GISTs KIT-negativo ou igual a dos tumores não-GIST, indicam que IGF1R não parece ser um marcador específico e não ajudaria no diagnóstico dos GISTs KIT-negativo.

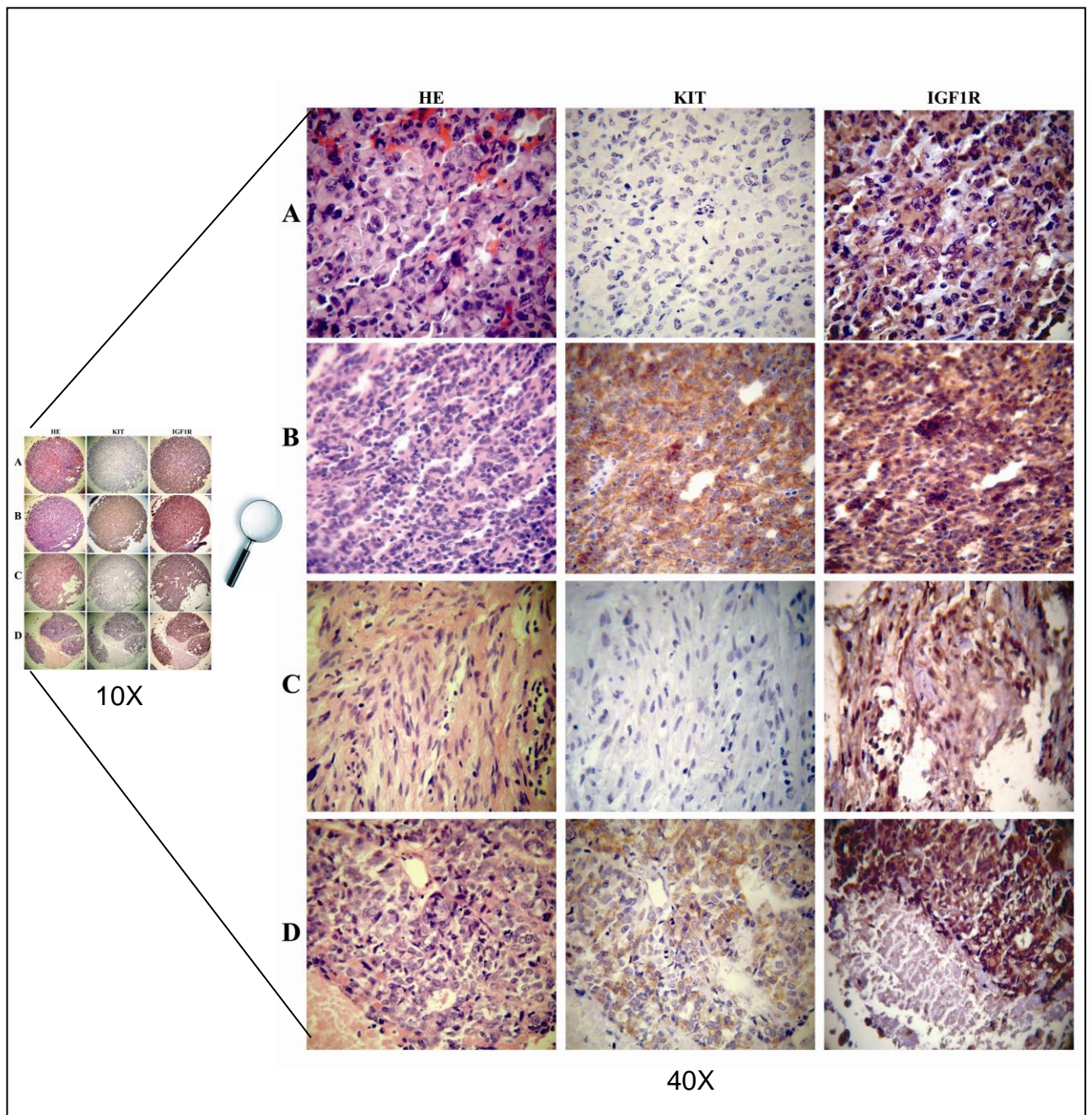


Figura 17 – Imuno-histoquímica de casos representativos, mostrando o padrão de expressão de KIT e IGF1R. (A) GIST KIT-negativo, (B) GIST KIT-positivo, (C) schwannoma e (D) carcinoma de grandes células.

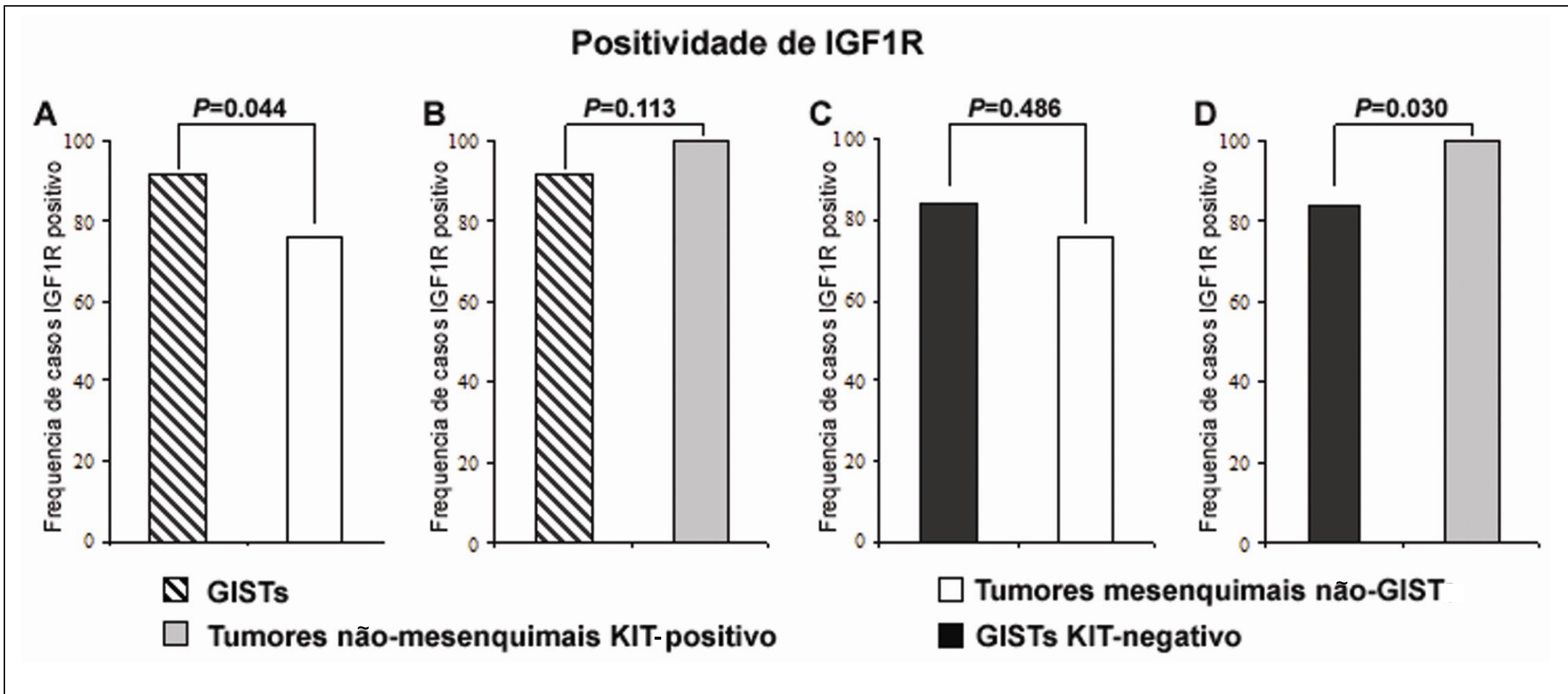


Gráfico 7 – Análise da associação da diferença na frequência de positividade da proteína IGF1R nos grupos tumorais incluídos.

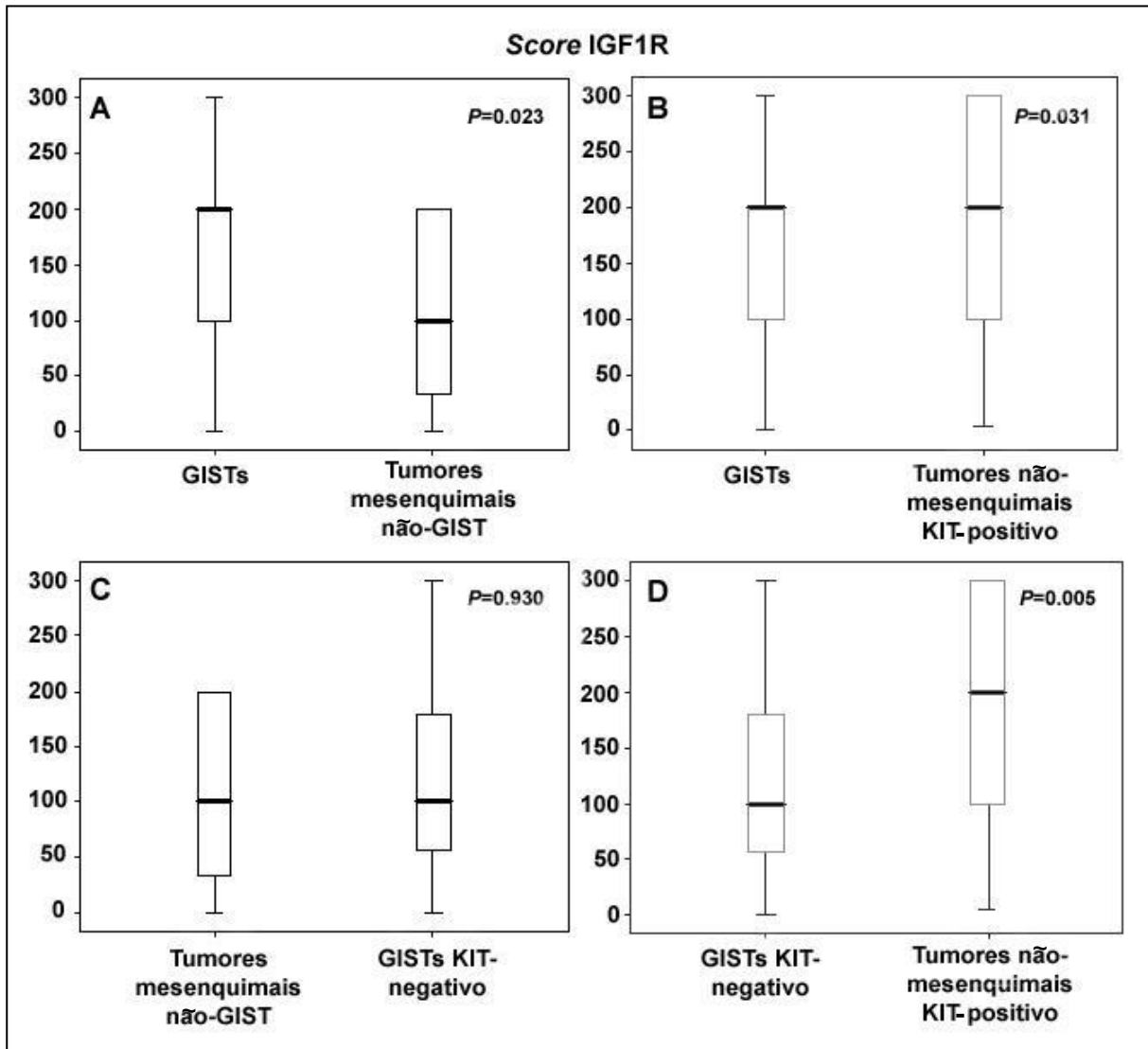


Gráfico 8 – Gráfico *box-plot* mostrando a diferença do *score* da mediana da expressão de IGF1R entre os diferentes grupos tumorais incluídos.

4.4. ANÁLISE MUTACIONAL

Os exons 12, 14 e 18 do gene *PDGFRA* e os exons 9, 11, 13 e 17 do gene *KIT* foram analisados nesse estudo. Como dito anteriormente, esses exons foram escolhidos, pois neles se concentra a grande maioria das mutações descritas até o momento para esses genes.

A análise mutacional foi realizada em 22 dos 22 casos GISTs KIT-negativo. Um cromatograma representativo de um caso mutado pode ser observado na figura 18. Além disso, as mutações encontradas, assim como as características clinico-patológicas do grupo dos GISTs KIT-negativo, estão descritas na tabela 10.

Em 8 de 22 (36,4%) casos GISTs KIT-negativo foram encontradas mutações. A maioria das mutações (7/8; 87,5%) foi detectada no gene *PDGFRA*. Cada tumor apresentou uma única mutação. Foi encontrada uma frequência de 13,6% (3/17) de mutações no exon 18 do gene *PDGFRA*. A mesma frequência de mutação foi detectada no exon 12 do gene *PDGFRA* (3/17; 13,6%). Além desses exons, foi encontrada uma mutação no exon 14 do gene *PDGFRA* (4,5%). Todas as mutações encontradas no exon 18 constituíram uma substituição única de base localizada no códon 842, resultando na mudança de um ácido aspártico para uma valina (D842V). Todos os GISTs KIT-negativo portadores da mutação D842V se localizaram no estômago. Em relação ao exon 12 do gene *PDGFRA*, a maior parte das mutações (2/3; 66,7%) era do tipo deleção que afetava entre os códons 583 e 587 (D583_W586del; D583_E587del). A outra mutação encontrada no exon 12 constituiu uma substituição única de base localizada no códon 576, resultando na mudança de um ácido aspártico para uma glicina (D576G). Os GISTs KIT-negativo portadores da mutação D583_W586del e D576G estavam localizados no estômago, enquanto o GIST KIT-negativo portador da mutação D583_E587del estava localizado no colon. A única mutação encontrada no exon 14 do gene *PDGFRA* resultou em uma mudança única de base, onde o aminoácido arginina foi trocado pelo aminoácido lisina no códon 634 (R634K). Essa mutação foi encontrada em um tumor localizado no íleo.

Em relação ao gene *KIT*, somente uma mutação foi encontrada, que se localizava no exon 9 (1/8; 12,5%). Essa mutação também resultou em uma mudança única de base no códon 457, o que resultou em uma troca do aminoácido valina pelo aminoácido metionina (V457M). O GIST KIT-negativo portador dessa mutação foi localizado no jejuno. Dos 17 casos de GISTs KIT-negativo avaliados, 63,6% (14/22) dos tumores incluídos eram selvagens.

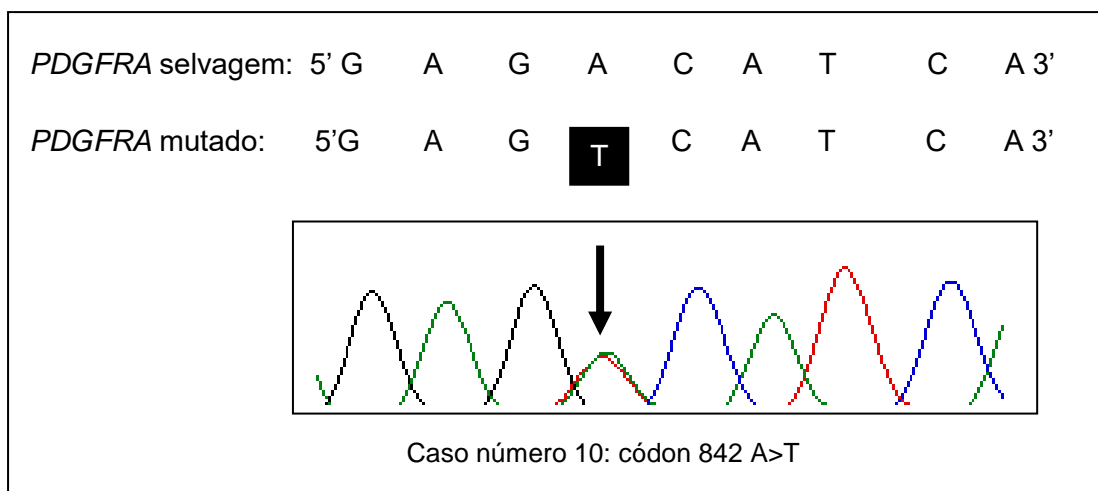


Figura 18 – Exemplo de cromatograma resultante do sequenciamento do DNA de um GIST KIT-negativo, mostrando um tumor mutado para o gene *PDGFRA*. A mutação resultou em uma substituição de A para T no códon 842 e a base mutada se encontrada destacada.

Tabela 10 – Características clínica, histológica, de imuno-fenotipagem e mutacional dos GISTs KIT-negativo

| Caso (Nº) | Sítio | CD34 | Desmina | S100 | PKCθ | Fosfo-PKCθ | DOG1 | Status Mutacional (Gene/ Exon / Nomenclatura) |
|------------------|--------------|-------------|----------------|-------------|-------------|-------------------|-------------|--|
| 01 | Jejuno | - | - | - | - | - | + | KIT / Ex 9 / V457M |
| 02 | Esôfago | - | + | - | - | - | + | WT |
| 03 | Colorectal | + | - | - | + | + | + | PDGFRA / Ex 12 / D583_E587del |
| 04 | Estômago | + | - | - | + | + | + | PDGFRA / Ex 12 / D583_W586del |
| 05 | Fígado | + | - | - | - | - | + | WT |
| 06 | Estômago | - | - | - | - | - | - | WT |
| 07 | Íleo | - | - | - | - | - | - | PDGFRA / Ex 14 / R634K |
| 08 | Estômago | + | - | - | + | + | + | WT |
| 09 | Fígado | - | - | - | + | + | + | WT |
| 10 | Estômago | + | + | - | + | + | + | PDGFRA / Ex 18 / D842V |
| 11 | Estômago | + | - | - | + | + | + | PDGFRA / Ex 18 / D842V |
| 12 | Estômago | + | + | - | + | + | + | WT |
| 13 | Estômago | + | - | - | + | + | + | WT |
| 14 | Fígado | + | - | - | + | + | + | WT |
| 15 | Estômago | + | - | - | + | + | + | WT |
| 16 | Jejuno | - | - | - | + | + | + | WT |
| 17 | Estômago | - | - | - | - | - | + | PDGFRA / Ex 12 / D576G |
| 18 | Estômago | - | - | - | + | + | + | WT |
| 19 | Estômago | + | - | - | + | + | + | PDGFRA / Ex 18 / D842V |
| 20 | Fígado | + | - | - | - | - | + | WT |
| 21 | Colorectal | + | - | - | - | - | + | WT |
| 22 | Estômago | - | - | - | + | + | + | WT |

4.5. COMBINAÇÃO DE MARCADORES (CD34, PKC θ , DOG1 E STATUS MUTACIONAL) ENTRE OS GISTs KIT-NEGATIVO

Diante dos resultados obtidos para cada marcador separadamente, mostrando uma associação significativa entre a expressão de PKC θ e DOG1 e os GISTs, incluindo os GISTs KIT-negativo, o último passo desse estudo foi, apesar do número pequeno, avaliar se diferentes combinações entre os marcadores conseguiriam detectar um maior número de casos GISTs KIT-negativo, e dessa forma, analisar um possível potencial diagnóstico dessas combinações. Para isso, incluímos os marcadores que mostraram significativa associação com o GIST KIT-negativo quando comparados com os tumores mesenquimais não-GIST, principal grupo de diagnóstico diferencial: PKC θ e DOG1. Incluímos ainda o *status* mutacional e a análise de CD34, este último porque é um dos marcadores de diagnóstico de GIST. As frequências de casos com diferentes combinações são descritas na tabela 11.

Dos 22 GISTs KIT-negativo, 13 (59,1%) foram CD34(+) e 10 (45,5%) foram CD34(+)PKC θ (+)DOG1(+). No grupo do CD34(-) (9/22; 40,9%), 4 tumores foram PKC θ (+)DOG(+), e 3 foram PKC θ (-)DOG1(+). Dentre esses últimos 3 casos, foi detectada mutação em 2 tumores (CD34(-)PKC θ (-)DOG1(+)*PDGFRA*(+); CD34(-)PKC θ (-)DOG1(+)*KIT*(+)). Em 2 casos CD34(-) os marcadores foram negativos (CD34(-)PKC θ (-)DOG1(-)). Nesse grupo, em um caso foi detectada uma mutação no gene *PDGFRA* e no outro caso não foi encontrada qualquer mutação.

Nossos resultados mostram que 19 dos 22 (86,4%) GISTs KIT-negativo foram positivos para pelo menos 2 marcadores: 5 são CD34(+)DOG1(+), PKC θ (+)mutação(+), 5 são CD34(+)DOG1(+), PKC θ (+), 4 casos são DOG1(+), PKC θ (+), 3 casos são CD34(+)DOG1(+), 2 casos são DOG1(+), mutação(+) (tabela 10).

Dessa maneira, esses resultados sugerem um possível potencial para o uso da combinação de pelo menos 2 marcadores no diagnóstico dos GISTs KIT-negativo, e, de acordo com a frequência de casos positivos para cada

marcador, os mesmos seriam pesquisados durante o diagnóstico de KIT-negativo na seguinte ordem: CD34, DOG1, PKC θ e *status* mutacional, respectivamente.

Tabela 11 - Combinações de marcadores para o diagnóstico dos GISTs KIT-negativo.

| Status Mutacional | C34(+) n=13 | | CD34(-) n=9 | | |
|-------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | PKC θ (+) | PKC θ (-) | PKC θ (+) | PKC θ (-) | PKC θ (-) |
| | DOG1(+) | DOG1(+) | DOG1(+) | DOG1(+) | DOG1(-) |
| Selvagem | 5 | 3 | 4 | 1 | 1 |
| <i>PDGFRA</i> | | | | | |
| exon 18 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>PDGFRA</i> | | | | | |
| exon 12 | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| <i>PDGFRA</i> | | | | | |
| exon 14 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| <i>KIT</i> | | | | | |
| exon 9 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Total | 10 | 3 | 4 | 3 | 2 |

5. DISCUSSÃO

Os GISTs são tumores raros, porém, dentre os tumores de origem mesenquimais, eles são os mais frequentemente encontrados no trato gastrointestinal [Rubin, 2006]. Atualmente, os GISTs são diferenciados de outras neoplasias mesenquimais baseados nas suas características morfológicas e na detecção por imuno-histoquímica da proteína KIT [Hornick e colaboradores, 2002; Miettinen e colaboradores, 2000; Miettinen e colaboradores, 2001]. Entretanto, sabe-se que aproximadamente 5% dos tumores com características clínico-patológicas de GISTs não expressam a proteína KIT (GIST KIT-negativo) [Medeiros e colaboradores, 2004].

Os GISTs KIT-negativo são um desafio na prática clínica brasileira, pois, além de apresentarem um difícil diagnóstico, os pacientes do Sistema Único de Saúde (SUS) portadores de GISTs KIT-negativo não possuem acesso ao mesilato de imatinibe para o seu tratamento. De acordo com o Diário Oficial da União Nº182 - Seção 1, portaria Nº 1.655 de 17 de Setembro de 2002 (Anexo I) a utilização do mesilato de imatinibe no tratamento dos pacientes do SUS portadores de GIST exige como condição *sine qua non* o resultado positivo do exame anti-CD117 (anti-KIT), realizado pela técnica de imuno-histoquímica. Dessa forma, GISTs KIT-negativo não apresentam possibilidade de tratamento uma vez que eles, assim como os KIT-positivo, são resistentes à quimioterapia e à radioterapia [Rubin e colaboradores, 2007; Suster, 1996].

A eficácia do tratamento com os inibidores de tirosina quinase nos GISTs KIT-negativo foi demonstrada por Bauer e colaboradores [Bauer e colaboradores, 2003], tornando, dessa forma, a busca por novos marcadores de GISTs crucial.

Nesse contexto, esta dissertação teve como objetivo geral investigar possíveis biomarcadores de diagnóstico dos GISTs, com foco nos GISTs KIT-negativo. Este trabalho teve três objetivos específicos. O primeiro objetivo específico foi, através da técnica de imuno-histoquímica, investigar o padrão de expressão (frequência de positividade e intensidade) das proteínas PKC θ , fosfo-PKC θ , DOG1 e IGF1R nos tumores GISTs. Os resultados obtidos nessa etapa corroboraram os dados da literatura de expressão destas proteínas nos

GISTs e demonstraram a presença das proteínas fosfo-PKC θ e IGF1R nos GISTs KIT-negativo, dado ainda inédito na literatura.

Baseado nos resultados alcançados de expressão, o segundo objetivo específico foi investigar o valor das mesmas proteínas como possíveis marcadores de diagnóstico nos GISTs através da comparação do padrão de expressão das proteínas PKC θ , fosfo-PKC θ , DOG1 e IGF1R nos GISTs com aquele nos tumores mesenquimais não-GIST e tumores não-mesenquimais KIT-positivo. Foi demonstrado aqui que as frequências e intensidades de expressão das proteínas PKC θ , fosfo-PKC θ e DOG1 foram significativamente maiores nos GISTs e nos GISTs KIT-negativo do que nos tumores mesenquimais não-GIST e tumores não-mesenquimais KIT-positivo. Por outro lado, em contraste com os outros marcadores, a expressão e a intensidade da proteína IGF1R não foram capazes de distinguir os GISTs KIT-negativo dos tumores mesenquimais não-GIST e do tumores não-mesenquimais KIT-positivo, sugerindo um possível papel das proteínas PKC θ , fosfo-PKC θ e DOG1, e não da IGF1R como possíveis biomarcadores de diagnóstico dos GISTs.

O terceiro objetivo específico foi caracterizar o *status* mutacional dos receptores tirosina quinase (KIT e PDGFRA) nos GISTs KIT-negativo. Nesta etapa, foi demonstrado que 36,3% dos tumores apresentaram mutação e que a maior parte das mutações encontradas se localizaram no gene *PDGFRA*, sugerindo que o *status* mutacional dos receptores tirosina quinase (KIT e PDGFRA) poderia ajudar o diagnóstico dos GIST KIT-negativo.

Os resultados obtidos nessa dissertação foram, na sua maioria, originados de estudos por imuno-histoquímica. Apesar das constantes críticas ao uso exclusivo da técnica de imuno-histoquímica nas análises de expressão de proteínas, devido, sobretudo, à presença de um grande número de variáveis como anticorpos de diferentes origens, utilização de um ou mais cromógenos, variações referentes a diluições dos anticorpos, tempo e temperatura de incubação com o anticorpo primário, esta vem sendo usada na rotina clínica desse tumor e de vários outros, uma vez que é uma técnica prática, rápida e com relativo baixo custo, comparado as outras técnicas de detecção de

proteína existentes no momento [Hanna e colaboradores, 2010; Hornick e colaboradores, 2007; Kindblom e colaboradores, 1998; Takei e colaboradores, 2010].

Apesar dos resultados apresentados aqui serem animadores e extremamente positivos, alguns dos resultados encontrados nesta dissertação diferem dos previamente demonstrados na literatura e serão então discutidos a seguir.

5.1. PERFIL DOS PACIENTES COM GISTs INCLUÍDOS NESSE ESTUDO EM COMPARAÇÃO COM O PERFIL DE PACIENTES INCLUIDOS NOS OUTROS ESTUDOS DE BIOMARCADORES EM GISTs

Através da análise do prontuário eletrônico, todos os 68 GISTs estudados aqui tiveram suas características clínicas e patológicas avaliadas.

Em concordância com os outros estudos [Espinosa e colaboradores, 2008; Kim e colaboradores, 2006; Lee e colaboradores, 2008; Liegl e colaboradores, 2009; Miettinen e colaboradores, 2009], a maioria dos GISTs, nesse estudo, de uma população brasileira, estava localizada no estômago. As populações estudadas anteriormente, nos estudos citados, compreenderam indivíduos provenientes da Coreia, Japão, Espanha e dos Estados Unidos. O segundo sítio mais freqüente encontrado nesse estudo foi o intestino delgado (13,2%), o que também está em acordo com a maior parte da literatura, que o indica como segundo sítio primário mais frequente [Espinosa e colaboradores, 2008; Lee e colaboradores, 2008; Liegl e colaboradores, 2009; Medeiros e colaboradores, 2004; Miettinen e colaboradores, 2009].

Nesse estudo a idade mediana, no momento do diagnóstico, dos pacientes incluídos foi de 59 anos, o que também se encontra em concordância com a mediana de 58 anos relatada por DeMatteo e colaboradores [DeMatteo e colaboradores, 2000]. Entretanto, em relação ao gênero, a maioria dos

pacientes incluídos foi do gênero feminino. Nos estudos publicados anteriormente, predomina o número de pacientes portadores de GISTs do gênero masculino [Liegler e colaboradores, 2009; Medeiros e colaboradores, 2004]. Entretanto, em um trabalho anterior do nosso grupo (Braggio e colaboradores, submetido) e no trabalho de Lopes e colaboradores, que também estudou uma população brasileira de GIST, o gênero feminino também foi predominante, o que nos leva a crer que pode ser uma característica da população brasileira [Lopes e colaboradores, 2008].

5.2. GRUPOS DE ESTUDO ESTRATIFICADOS PELA MORFOLOGIA E IMUNO-FENOTIPAGEM

Inicialmente, a expressão dos marcadores CD34, S100 e desmina, usualmente utilizados no diagnóstico diferencial dos tumores mesenquimais, foi analisada. Os achados dessa análise foram importantes para confirmar o diagnóstico morfológico e, dessa maneira, estratificar adequadamente os grupos de estudo, permitindo a confiabilidade dos achados referentes às proteínas-alvo de investigação desse trabalho. Esses marcadores são atualmente utilizados na rotina clínica do DIPAT para os tumores mesenquimais e, portanto, as condições utilizadas nesse trabalho foram as que já estavam padronizadas e integradas na rotina desse Serviço.

Durante a investigação da expressão de CD34, S100 e desmina foi utilizada a técnica de imuno-histoquímica em lâmina de *tissue microarray* (TMA). Recentemente, Kwon e colaboradores analisaram a positividade dessas proteínas em GISTs utilizando lâminas de TMA e compararam essa expressão com as encontradas em lâminas convencionais. Os resultados deste estudo mostram que a taxa de concordância para a expressão dessas proteínas em lâmina de TMA e em lâminas convencionais é muito alta (em torno de 95%) sugerindo que os “pequenos” cilindros tumorais inseridos em lâmina de TMA poderiam representar significativamente todo o tumor [Kwon e colaboradores, 2009], facilitando o diagnóstico e a investigação.

No nosso estudo, a frequência de positividade encontrada nos GISTs KIT-positivo para CD34 foi de 87,0%. Essa frequência está dentro de um variação de frequências encontradas por outros autores, entre 70% e 100% [Corless e colaboradores, 2004; Fletcher e colaboradores, 2002; Gomes e colaboradores, 2008; Lee e colaboradores, 2008; Liegl e colaboradores, 2009; Medeiros e colaboradores, 2004; Sarlomo-Rikala e colaboradores, 1998]. Diferentemente dos GISTs KIT-positivo, ainda são poucos os estudos que avaliaram CD34 em GISTs KIT-negativo. Nesses poucos estudos foram encontradas frequências que variaram de 35% a 60% de positividade para CD34 nos GISTs KIT-negativo [Lee e colaboradores, 2008; Liegl e colaboradores, 2009; Motegi e colaboradores, 2005]. Uma frequência de 59,1%, encontrada no presente estudo, também está dentro dessa variação. Nos tumores mesenquimais não-GIST, a frequência de positividade encontrada para CD34, nesse estudo, de 19,3%, é próxima às frequências de 10 a 15% observadas na literatura [Fletcher e colaboradores, 2002]. Dessa forma, nossos dados da proteína CD34, corroborando os dados de literatura, mostram que a mesma está frequentemente expressa nos GISTs, e, em menor frequência, nos tumores mesenquimais não-GIST.

A expressão da proteína desmina, outro marcador importante no diagnóstico diferencial dos GISTs, foi observada em 17,8% dentre os casos GISTs KIT-positivo e em 13,6% nos casos GISTs KIT-negativo. Esta frequência é maior do que a relatada nos estudos anteriores que demonstraram que a expressão de desmina nos GISTs KIT-positivo é rara, podendo alcançar até 8% dos casos [Fletcher e colaboradores, 2002; Medeiros e colaboradores, 2004; Miettinen e colaboradores, 2006], com exceção de um única publicação que mostra que essa expressão pode chegar até 32% [Liegl e colaboradores, 2009]. É importante ressaltar que atualmente a maioria desses estudos, apesar de utilizar o mesmo clone utilizado pelo nosso estudo, não faz a recuperação antigênica para analisar a expressão de desmina. Entretanto, na rotina do DIPAT, a imuno-histoquímica para desmina foi padronizada utilizando a recuperação antigênica na panela a vapor e assim continua sendo feita até os dias de hoje. Essa diferença na técnica poderia explicar a maior frequência de expressão de desmina encontrada no nosso grupo de GIST KIT-positivo,

considerando que a expressão da desmina nos GISTs pode ser intensificada com o uso da recuperação antigênica. Liegl e colaboradores tentam explicar a alta frequência de desmina encontrada nos GISTs KIT-negativo analisados no seu estudo através da frequência (28%) de GISTs epitelióides [Liegl e colaboradores, 2009]. Entretanto, como no nosso estudo os GISTs não foram divididos por subtipo histológico, a comparação não pôde ser feita. É importante ressaltar que, assim como nos estudos citados anteriormente, em todos os casos GISTs que foram positivos para desmina, a expressão dessa proteína foi fraca e focal. Em relação aos tumores mesenquimais não-GIST, a frequência de desmina encontrada nos leiomiomas e nos leiomiomas também foi maior do que a encontrada por outros autores (79%), os quais mostram uma frequência entre 60-70%, o que mais uma vez poderia ser explicado pela recuperação antigênica [Fletcher e colaboradores, 2002]. Em concordância com a literatura, em nenhum caso de schwannoma foi detectada a expressão de desmina [Corless e colaboradores, 2004; Fletcher e colaboradores, 2002].

A proteína S100 foi detectada em 4,4% dos GISTs KIT-positivo, o que está de acordo com as frequências encontradas em outros estudos que variam de 5% a 10% [Corless e colaboradores, 2004; Fletcher e colaboradores, 2002; Lee e colaboradores, 2008; Medeiros e colaboradores, 2004; Motegi e colaboradores, 2005]. Da mesma maneira, a ausência de expressão de S100 nos GISTs KIT-negativo também é confirmada por relatos da literatura [Liegl e colaboradores, 2009; Motegi e colaboradores, 2005], o que corrobora a baixa expressão dessa proteína nos GISTs. Dentre os tumores mesenquimais não-GIST, a expressão da proteína S100 foi encontrada em 83,3% dos schwannomas, que é o seu principal marcador diagnóstico. Como esperado, não foi detectada a expressão dessa proteína nos leiomiomas e nos leiomiomas. Esses resultados estão de acordo com a literatura [Fletcher e colaboradores, 2002].

Esse grupo de resultados permitiu estratificar os grupos tumorais desse estudo.

5.3. PKC θ EXPRESSA EM ELEVADA FREQUÊNCIA NOS GISTS

Uma vez que os grupos de estudo foram estratificados morfológicamente e por imuno-fenotipagem, foi investigada como um potencial biomarcador, a proteína PKC θ , que é uma serina/treonina quinase que controla a proliferação, diferenciação, a mobilidade celular [Nishizuka, 1992] e parece estar envolvida na ativação de células T [Altman e colaboradores, 2003], transdução de sinal do músculo esquelético [Hilgenberg e colaboradores, 1995] e na diferenciação neuronal [Sparatore e colaboradores, 2000].

O interesse em PKC θ cresceu devido aos estudos de microarranjo de cDNA que revelaram que o gene codificante da proteína PKC θ estava superexpresso nos GISTS [Allander e colaboradores, 2001; Nielsen e colaboradores, 2002]. Por conta desses estudos, através da imuno-histoquímica, a superexpressão de PKC θ nos GISTS foi estudada em diferentes estudos [Blay e colaboradores, 2004; Duensing e colaboradores, 2004; Kim e colaboradores, 2006; Lee e colaboradores, 2008; Motegi e colaboradores, 2005]. Na tabela 12 estão detalhados os estudos que investigaram PKC θ nos GISTS, incluindo o presente. Estes trabalhos descrevem a expressão de PKC θ em GISTS em frequências que variam entre 72% a 100%. A frequência de positividade de PKC θ encontrada nos GISTS incluídos em nosso estudo (76,9%) está nos limites inferiores dessa variação, assim como aquela encontrada por Duensing e colaboradores (20/27; 74,1%) [Duensing e colaboradores, 2004]. Motegi e colaboradores encontraram 85,0% (41/48), Blay e colaboradores 100% (26/26), Kim e colaboradores 96% (212/220) e Lee e colaboradores 93,9% (231/246) [Blay e colaboradores, 2004; Kim e colaboradores, 2006; Lee e colaboradores, 2008; Motegi e colaboradores, 2005]. Essas variações poderiam ser explicadas pelas diferenças no tamanho das amostras analisadas por cada estudo. Kim e colaboradores e Lee e colaboradores analisaram em torno de 200 casos de GISTS encontrando frequências superiores a 90% [Kim e colaboradores, 2006; Lee e colaboradores, 2008]. Outra variável entre os estudos é referente à técnica de imuno-histoquímica, como por exemplo, as diferentes técnicas de recuperação

antigênica utilizadas por cada estudo. Alguns autores utilizaram o autoclave [Blay e colaboradores, 2004; Lee e colaboradores, 2008] e outros utilizaram o microondas [Duensing e colaboradores, 2004; Kim e colaboradores, 2006; Motegi e colaboradores, 2005]. Segundo a literatura a eficiência de recuperação antigênica utilizando o microondas é menor do que a recuperação utilizando o autoclave [Taylor e colaboradores, 1996] e semelhante à da panela a vapor [Cuevas e colaboradores, 1994], que foi o método utilizado pelo nosso estudo, e poderia explicar porque a frequência de positividade de PKC θ nos grupos que utilizaram o microondas foi mais próxima da encontrada pelo nosso grupo.

Tabela 12 – Estudos que analisaram PKC θ em GISTs

| Referência | Nº de casos incluídos | Clone/ Fabricante do anticorpo | Outras variáveis do estudo | Frequência de positividade de PKC θ nos GISTs |
|-------------|-----------------------|--------------------------------------|---|--|
| Esse estudo | 65 | Clone 27 (BD Biosciences) | Recuperação antigênica na panela a vapor, sistema de detecção Novolink (Novocastra Ltd.) | 76,9% |
| Motegi | 41 | Clone 27 (BD Biosciences) | Recuperação antigênica no microondas, sistema de detecção vectastain (Vector Labs, Burlingame, CA, EUA) | 85,0% |
| Blay | 46 | Clone 27 (BD Biosciences) | Recuperação antigênica no autoclave, sistema de detecção EnVision™+ (DAKO Corp.) | 100,0% |
| Kim | 212 | Clone 27 (BD Biosciences) | Recuperação antigênica no microondas, sistema de detecção EnVision™+ (DAKO Corp.) | 96,0% |
| Lee | 231 | Clone 27 (BD Biosciences) | Recuperação antigênica no autoclave com tampão “ <i>Borg Decloaking Chamber</i> ” (Biocare Medical, Walnut Creek, CA, EUA), sistema de detecção Vectastain (Vector Labs, Burlingame, CA, EUA) | 93,9% |
| Duensing | 20 | Clone 27 (BD Biosciences) | Recuperação antigênica no microondas, sistema de detecção EnVision™+ (DAKO Corp.) | 74,1% |

Diferentemente dos GISTs como um todo, os estudos em GISTs KIT-negativo, pela sua raridade (em torno de 250 casos por ano nos EUA), são sempre com tamanho amostral pequeno, variando entre 4 e 27 casos analisados, indicando mais uma vez que a contínua investigação nesse tumores é fundamental. Na tabela 13 estão detalhados os estudos que já existem, incluindo o nosso, que estudou 22 casos de GIST KIT-negativo. Nossos resultados da frequência de positividade de PKC θ para os GISTs KIT-negativo (66,7%) são semelhantes aos observados por Motegi e colaboradores (4/6; 66,7%), Duensing e colaboradores (20/27; 72,0%) e Lee e colaboradores (15/20; 75,0%) [Duensing e colaboradores, 2004; Lee e colaboradores, 2008; Motegi e colaboradores, 2005]. Em contraste, Kim e colaboradores encontraram uma frequência de 100%, mas estudando apenas quatro casos (4/4; 100%) [Kim e colaboradores, 2006]. Mais uma vez, essas variações podem ser explicadas pela grande diferença no tamanho das amostras analisadas. Possivelmente, como a frequência de expressão de PKC θ é elevada nos GISTs, inclusive nos GISTs KIT-negativo, um menor tamanho amostral poderia significar maior probabilidade de serem encontrados GISTs KIT-negativo com expressão de PKC θ , o que poderia explicar a frequência de expressão de PKC θ de 100% em GISTs KIT-negativo encontrada por Kim e colaboradores, os quais analisaram somente 4 casos [Kim e colaboradores, 2006]. Entretanto, considerando que Motegi e colaboradores analisaram somente 6 GISTs KIT-negativo e encontraram uma frequência igual a frequência encontrada pelo nosso grupo, somente o tamanho amostral não seria suficiente para explicar as diferenças encontradas [Motegi e colaboradores, 2005]. O grupo de Motegi e colaboradores utilizaram um sistema de detecção diferente (Vectastain; Vector Labs, Burlingame, CA, EUA) de todos os outros grupos, inclusive do nosso, e que não é usualmente utilizado para PKC θ , o que poderia resultar em um menor grau de detecção do anticorpo primário e, dessa forma, poderia explicar porque a frequência não foi tão elevada como a encontrada por Kim e colaboradores, mesmo com o pequeno número amostral [Kim e colaboradores, 2006; Motegi e colaboradores, 2005]. Vosse e colaboradores já demonstraram que a detecção

pelo sistema Envision+ (DAKO Corp.), além de diminuir as ligações inespecíficas, em alguns anticorpos tem uma eficiência de detecção melhor do que a do Vectastain (Vector Labs.) [Vosse e colaboradores, 2007].

Tabela 13 – Estudos que analisaram PKC θ nos GISTs KIT-negativo

| Referência | Nº de casos incluídos | Clone/ Fabricante do anticorpo | Outras variáveis do estudo | Frequência de positividade de PKC θ nos GISTs KIT-negativos |
|-------------|-----------------------|-----------------------------------|---|--|
| Esse estudo | 22 | Clone 27 (BD Biosciences) | Recuperação antigênica na panela a vapor, sistema de detecção Novolink (Novocastra Ltd.) | 66,7% |
| Motegi | 6 | Clone 27 (BD Biosciences) | Recuperação antigênica no microondas, sistema de detecção vectastain (Vector Labs, Burlingame, CA, EUA) | 66,7% |
| Kim | 4 | Clone 27 (BD Biosciences) | Recuperação antigênica no microondas, sistema de detecção EnVision™+ (DAKO Corp.) | 100,0% |
| Lee | 20 | Clone 27 (BD Biosciences) | Recuperação antigênica no autoclave com tampão “ <i>Borg Decloaking Chamber</i> ” (Biocare Medical, Walnut Creek, CA, EUA), sistema de detecção Vectastain (Vector Labs, Burlingame, CA, EUA) | 75,0% |
| Duensing | 27 | Clone 27 (BD Biosciences) | Recuperação antigênica no microondas, sistema de detecção EnVision™+ (DAKO Corp.) | 72,0% |

As frequências de expressão de PKC θ nos GISTs KIT-negativo encontradas nos trabalhos que analisaram em torno de 20-30 casos foram muito semelhantes à frequência encontrada pelo nosso grupo. Além de o

número amostral ser similar, a técnica de imuno-histoquímica utilizada também foi muito similar. Duensing e colaboradores utilizaram o microondas para a recuperação antigênica [Duensing e colaboradores, 2004], que resulta na recuperação antigênica com a mesma eficácia da feita na panela a vapor [Cuevas e colaboradores, 1994], utilizada pelo nosso grupo. Já o grupo de Lee e colaboradores utilizaram o autoclave [Lee e colaboradores, 2008], que, segundo a literatura, é responsável por uma recuperação antigênica mais eficiente do que a panela a vapor e o microondas [Taylor e colaboradores, 1996]. Entretanto, como sistema de detecção, esse grupo utilizou o Vectastain (Vector Labs), o que poderia explicar porque a frequência de expressão de PKC θ encontrada não foi tão diferente da encontrada pelo nosso grupo e por Duensing e colaboradores [Duensing e colaboradores, 2004].

5.4. PKC θ DISTINGUIU OS GISTS DOS TUMORES MESENQUIMAIS NÃO-GIST E DOS TUMORES NÃO-MESENQUIMAIS KIT-POSITIVO

Nossos resultados sugerem que a proteína PKC θ seria capaz de distinguir os GISTs, incluindo os KIT-negativo, dos tumores não-GIST, podendo ser um potencial marcador diagnóstico para esse tumor. É importante ressaltar que, apesar de outros autores terem também estudado PKC θ em outros tumores além dos GISTs, eles limitaram-se a relatar apenas as frequências encontradas e não usaram métodos de análise de associação entre a expressão e o tipo de tumor, como foi feito aqui.

Em relação aos tumores mesenquimais não-GIST, nossos resultados mostraram uma frequência de positividade para PKC θ de 10,7% nesses tumores. Essa frequência está em concordância com a encontrada por Duensing e colaboradores (3/30; 10,0%) [Duensing e colaboradores, 2004], é um pouco maior do que a encontrada por Motegi e colaboradores (3/39; 7,7%) e Kim e colaboradores (4/57; 7,0%) e muito acima da frequência encontrada por Blay e colaboradores (0/12; 0,0%) [Blay e colaboradores, 2004; Kim e colaboradores, 2006; Motegi e colaboradores, 2005]. Como a frequência de

PKC θ é baixa nos tumores mesenquimais não-GIST, provavelmente a chance de encontrar um tumor mesenquimal não-GIST PKC θ -positivo diminui proporcionalmente com a diminuição do tamanho amostral, o que poderia explicar o resultado encontrado por Blay e colaboradores, que analisou o menor número de casos de tumores mesenquimais não-GIST dentre os estudos citados [Blay e colaboradores, 2004]. Além disso, exceto pelo trabalho de Duensing e colaboradores, que observaram a positividade de PKC θ em 2/20 leiomiossarcomas [Duensing e colaboradores, 2004], todos os outros estudos detectaram a expressão de PKC θ apenas em schwannomas dentre os tumores mesenquimais não-GIST, enquanto nosso estudo observou a expressão dessa proteína, em 1 caso de leiomiossarcoma, 1 caso de leiomioma e 1 caso de schwannoma. Nosso estudo detectou a expressão de PKC θ em 34,4% dos tumores não-mesenquimais KIT-positivo, resultados acima do encontrado por Kim e colaboradores (4/41; 9,8%), por Blay e colaboradores (0/12; 0,0%) e por Motegi e colaboradores (0/24; 0,0%) [Blay e colaboradores, 2004; Kim e colaboradores, 2006; Motegi e colaboradores, 2005]. É importante ressaltar que, apesar dos tumores expressarem a proteína KIT, o grupo tumoral não-mesenquimal KIT-positivo incluído em cada estudo não foi o mesmo, dificultando a comparação entre os resultados. Além disso, a presença de KIT e de PKC θ nestes tumores e o significado mecanístico e de carcinogênese dessa expressão ainda precisam ser melhor entendidos, já que ainda são poucos os estudos analisando o papel dessas proteínas nesses tumores [Ou e colaboradores, 2008]. Ainda, como os estudos que analisaram a expressão de PKC θ nos tumores mesenquimais não-GIST e nos tumores não-mesenquimais KIT-positivo foram os mesmos que analisaram a expressão da proteína em questão nos GISTs e GISTs KIT-negativo, as explicações para as diferenças encontradas podem ser as mesmas já discutidas anteriormente, incluindo a técnica e tamanho amostral.

Além da frequência de positividade, neste trabalho nós avaliamos se a intensidade da expressão de PKC θ também diferia entre os grupos tumorais incluídos nesse estudo, através da comparação dos scores de marcação da imuno-histoquímica para PKC θ entre os diferentes grupos. Esse dado é inédito na literatura. Assim como foi observado para a frequência de positividade, uma

diferença significativa entre o *score* da marcação para PKC θ foi encontrada nos GISTs quando comparado aos tumores mesenquimais não-GIST e aos tumores não-mesenquimais KIT-positivo. Os *scores* de expressão de PKC θ nos GISTs KIT-negativo se comportaram de forma similar, apresentando uma diferença significativa quando comparados aos tumores mesenquimais não-GIST e aos tumores não-mesenquimais KIT-positivo.

Esses resultados, corroborados com os de descrição de frequência encontrados pelos grupos acima citados, apesar das pequenas variações, indicam o potencial de PKC θ como biomarcador de diagnóstico dos GISTs, incluindo dos GISTs KIT-negativo.

5.5. PROTEÍNA QUINASE C θ FOSFORILADA (FOSFO-PKC θ) ACOMPANHOU OS RESULTADOS DA PROTEÍNA TOTAL

Demonstrada a elevada expressão de PKC θ nos GISTs, o próximo passo desse trabalho foi analisar se essa proteína se encontrava ativa nos GISTs e também se a forma ativa poderia ser um marcador de diagnóstico para os GISTs, com foco nos GISTs KIT-negativo. Para isso, a proteína fosfo-PKC θ no resíduo T538 foi analisada. Até o presente momento, nenhum estudo havia analisado a expressão da proteína fosfo-PKC θ em GISTs por imunohistoquímica.

A fosforilação de PKC θ nos resíduos T538 e S676 é necessária para a ativação de PKC θ . Uma alta expressão das proteínas fosfo-PKC θ nos resíduos T538 e S676 já foi demonstrada na linhagem celular Jurkat (leucemia de células T) por estudo anteriores [Ghaffari-Tabrizi e colaboradores, 1999]. Ou e colaboradores analisaram a expressão e a fosforilação de PKC θ nos resíduos T538 e S676 em três linhagens celulares de GISTs KIT-positivo (GIST882, GIST48 e GIST430) e em duas linhagens celulares de GISTs KIT-negativo (GIST62 e GIST522) e demonstraram que nas linhagens celulares provenientes de GISTs KIT-positivo a expressão da proteína fosfo-PKC θ nos

resíduos T538 e S676 foi comparável à linhagem celular Jurkat. Em contraste, nas duas linhagens celulares provenientes de GISTs KIT-negativo a fosforilação de PKC θ no resíduo T538 apresentou uma expressão baixa e a fosforilação no resíduo S676 foi praticamente indetectável, e, por isso, a fosforilação no resíduo S676 não foi analisada no nosso estudo [Ou e colaboradores, 2008].

A fosforilação de PKC θ nos GISTs acompanhou a expressão de PKC θ total, o que está de acordo com o resultado encontrado por Ou e colaboradores [Ou e colaboradores, 2008]. Entretanto, no nosso estudo foi possível detectar uma elevada frequência de expressão de fosfo-PKC θ no resíduo T538 nos GISTs KIT-negativo.

Da mesma maneira como observado para PKC θ total, fosfo-PKC θ também foi capaz de distinguir os GISTs dos tumores não-GIST. As frequências de positividade para fosfo-PKC θ nos GISTs foram estatisticamente maiores quando comparadas às encontradas para os tumores mesenquimais não-GIST ($P < 0.001$) e para os tumores não-mesenquimais KIT-positivo ($P < 0.001$). As diferenças também foram significativas quando foram comparadas entre os GISTs KIT-negativo, tumores mesenquimais não-GIST ($P < 0.001$) e tumores não-mesenquimais KIT-positivo ($P = 0.034$). Este resultado é inédito e acompanha os da proteína PKC θ total. Os resultados do *score* da intensidade de expressão também acompanharam os resultados encontrados para PKC θ total. Outro resultado inédito dessa parte do estudo, mas esperado, uma vez que supõe-se que a forma ativa da proteína PKC θ esteja participando da carcinogênese dos GISTs, mas não na carcinogênese dos tumores mesenquimais não-GIST e tumores não-mesenquimais KIT-positivo. Acompanhando os resultados da frequência de positividade para fosfo-PKC θ , o *score* da expressão da proteína em questão também foi significativamente maior nos GISTs quando comparado aos tumores mesenquimais não-GIST e aos tumores não-mesenquimais KIT-positivo. O mesmo aconteceu em relação os GISTs KIT-negativo.

Nosso estudo foi o primeiro a analisar fosfo-PKC θ como marcador de diagnóstico de GISTs e a demonstrar que essa proteína é capaz de distinguir

os GISTs dos tumores mesenquimais não-GIST e dos tumores não-mesenquimais KIT-positivo, podendo ser potencialmente útil como biomarcador de diagnóstico dos GISTs. Para a confirmação desses resultados, outros estudos são ainda necessários.

5.6. A FREQUÊNCIA DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA DOG1 FOI ALTAMENTE DETECTADA NOS GISTs

Outra proteína de interesse nesse trabalho foi a proteína DOG1. Recentemente, o gene *FLJ10261* (*DOG1*) foi descoberto como codificante da proteína DOG1 e seu cDNA se mostrou como suprexpresso nos GISTs [West e colaboradores, 2004]. DOG1 é uma proteína com 8 domínios transmembranares que foi recentemente identificada como um canal proteico de cloreto regulado por cálcio [Caputo e colaboradores, 2008; Yang e colaboradores, 2008]. O papel dessa proteína na carcinogênese dos GISTs ainda é desconhecido. Tentando explicar a suprexpressão dessa proteína nos GISTs, Miwa e colaboradores analisaram todos os 26 exons correspondentes ao gene *DOG1* em 10 GISTs, mas não detectaram nenhuma mutação [Miwa e colaboradores, 2008].

Ainda existem poucos trabalhos analisando a expressão de DOG1 em GISTs, mas todos os trabalhos apresentam altas frequências de expressão de DOG1 nos GISTs [Espinosa e colaboradores, 2008; Liegl e colaboradores, 2009; Miettinen e colaboradores, 2009; Miwa e colaboradores, 2008; West e colaboradores, 2004]. Para melhor ilustrar as frequências de positividade para DOG1 encontradas, bem como as variáveis de técnica e tamanho amostral de cada trabalho, os dados foram agrupados na tabela 14.

Nossos resultados mostrando uma frequência de 89,6% de DOG1 nos GISTs está em concordância com a frequência encontrada por Espinosa e colaboradores (370/425; 87,0%) [Espinosa e colaboradores, 2008], porém foi menor do que a frequência encontrada por Miettinen e colaboradores (986/1040; 94,8%), Miwa e colaboradores (10/10; 100%) e West e

colaboradores (136/139; 97.8%), e maior do que a encontrada por Liegl e colaboradores (36/54; 66,7%) [Liegl e colaboradores, 2009; Miettinen e colaboradores, 2009; Miwa e colaboradores, 2008; West e colaboradores, 2004].

Tabela 14 – Estudos que analisaram DOG1 nos GISTs

| Referência | Nº de casos incluídos | Clone/ Fabricante do anticorpo | Outras variáveis do estudo | Frequência de positividade de DOG1 nos GISTs |
|-------------|-----------------------|------------------------------------|---|--|
| Este estudo | 67 | Clone K9 (Novocastra Ltd.) | Recuperação antigênica na panela a vapor, sistema de detecção Novolink (Novocastra Ltd.) | 89,6% |
| Espinosa | 425 | Clone DOG1.1 (Stanford University) | Recuperação antigênica no microondas | 87% |
| Miettinen | 1040 | Clone K9 (Novocastra Ltd.) | Recuperação antigênica em EDTA pH 8.0 | 94,8% |
| Miwa | 10 | Fabricante JBioS | Tampão de recuperação antigênica TRS, no microondas | 100% |
| West | 139 | Clone S284 (Applied Genomics Inc.) | Sistema de detecção Envision Plus (Dako Corp.) | 97,8% |
| Liegl | 54 | Clone DOG1.1 (Stanford University) | Recuperação antigênica na panela de pressão, sistema de detecção Envision Plus (Dako Corp.) | 66,7% |

Essas divergências encontradas podem ser explicadas, mais uma vez, pela diferença no tamanho amostral e, principalmente, possivelmente, pelos diferentes anticorpos utilizados nos diferentes estudos. Alguns trabalhos

utilizaram o clone DOG1.1 (produzido por Matt van de Rijn, da universidade de Stanford) [Espinosa e colaboradores, 2008; Liegl e colaboradores, 2009], outros, incluindo o nosso, utilizaram o clone K9 (Novocastra) [Miettinen e colaboradores, 2009]. West e colaboradores utilizaram o clone S284 (Applied Genomics Inc) [West e colaboradores, 2004] e Miwa e colaboradores utilizaram um anticorpo anti-DOG1 produzido por JbioS (JbioS) [Miwa e colaboradores, 2008]. Além disso, a recuperação antigênica e o tampão de recuperação utilizados em cada estudo foram muito diferentes. Mais uma vez, a frequência mais parecida com a encontrada pelo nosso estudo foi a do grupo que utilizou o mesmo tampão de recuperação antigênica utilizada pelo nosso estudo (tampão citrato) e fez a recuperação no microondas [Espinosa e colaboradores, 2008]. Os outros estudos utilizaram o tampão EDTA na panela de pressão [Miettinen e colaboradores, 2009], o tampão citrato na panela de pressão [Liegl e colaboradores, 2009; West e colaboradores, 2004] e o tampão TRS no microondas [Miwa e colaboradores, 2008].

De todos esses autores, somente Liegl e colaboradores estratificaram o grupo dos GISTs em KIT-negativo e KIT-positivo para as análises [Liegl e colaboradores, 2009]. A frequência de positividade de DOG1 encontrada no nosso estudo para os GISTs KIT-negativo (81,8%) foi maior do que a encontrada por Liegl e colaboradores (10/28; 35.7%). A frequência encontrada para os GISTs KIT-positivo (93,3%) foi mais similar à observada no estudo de Liegl e colaboradores (26/26; 100%) [Liegl e colaboradores, 2009]. Nossos resultados de *scores* mostraram que a intensidade da expressão de DOG1 nos GISTs KIT-negativo é menor que a dos GISTs KIT-positivo. Dessa forma, a utilização de diferentes clones e de uma recuperação antigênica diferente poderia interferir no resultado dos GISTs KIT-negativo, já que nesse grupo a intensidade da expressão de DOG1 é menor. Assim, um caso GIST KIT-negativo com intensidade fraca para DOG1, quando testado com uma técnica onde a eficiência de detecção é menor, poderia ser considerado, erroneamente, como negativo.

Como Liegl e colaboradores utilizaram o clone DOG1.1 (Stanford university), fizeram a recuperação antigênica na panela de pressão e utilizaram como sistema de detecção o Envision+ (DAKO Corp.) [Liegl e colaboradores,

2009], enquanto o nosso grupo utilizou o anticorpo K9 (Novocastra Ltd.), a recuperação antigênica na panela a vapor e o sistema de detecção Novolink (Novocastra Ltd.), a maior frequência de positividade encontrada aqui pode ser um reflexo da maior eficiência de detecção pelas técnicas usadas nesse estudo.

5.7. A PROTEÍNA DOG1 FOI CAPAZ DE DISTINGUIR OS GISTS DOS TUMORES NÃO-GIST

Nossos resultados sugerem que a proteína DOG1 também foi capaz de distinguir o grupo dos GISTs do grupo dos tumores não-GIST.

Com relação ao grupo dos tumores mesenquimais não-GIST, a expressão de DOG1 foi detectada em apenas 10% dos tumores incluídos. Essa frequência foi mais alta do que a observada por Miettinen e colaboradores (9/212; 4,3%) [Miettinen e colaboradores, 2009], que apesar de utilizarem o mesmo clone, fizeram a recuperação antigênica em EDTA pH 8.0, enquanto no nosso trabalho foi utilizado o tampão citrato pH 6.0. Nossa frequência também foi maior do que a encontrada por West e colaboradores (4/76; 5,3%), que utilizaram um clone diferente do utilizado pelo nosso estudo e por Espinosa e colaboradores (3/746; 0,4%), que também utilizaram um clone diferente do nosso estudo [Espinosa e colaboradores, 2008; West e colaboradores, 2004]. É importante ressaltar que em nenhum estudo, incluindo o nosso, DOG1 foi detectado em casos de leiomiossarcoma, o tipo histológico tumoral que tem o diagnóstico diferencial mais comum com GIST, sugerindo uma especificidade desse marcador aos GISTs.

No grupo dos tumores não-mesenquimais KIT-positivo, DOG1 foi encontrado expresso em 18,8% dos casos incluídos. Além do nosso grupo, somente Espinosa e colaboradores analisaram a frequência de positividade de DOG1 em tumores não-mesenquimais KIT-positivo e a frequência encontrada por esse grupo (88/432; 20,3%) foi muito similar à frequência encontrada no nosso estudo [Espinosa e colaboradores, 2008].

West e colaboradores e Espinosa e colaboradores também avaliaram a intensidade da expressão de DOG1 através de *scores*, porém esses grupos só avaliaram os *scores* dos GISTs, não comparando com os dos outros grupos tumorais [Espinosa e colaboradores, 2008; West e colaboradores, 2004]. No nosso estudo, além da análise dos *scores* dos GISTs, os outros grupos tumorais também tiveram seus *scores* avaliados. Da mesma forma que ocorreu para a frequência de positividade, os *scores* da expressão de DOG1 nos GISTs e, especificamente nos GISTs KIT-negativo, foram significativamente maiores do que os *scores* encontrados nos tumores mesenquimais não-GIST e nos tumores não-mesenquimais KIT-positivo.

Assim como para PKC θ , as diferenças encontradas para DOG1 entre os grupos tumorais corroboram o potencial de DOG1 como marcador de diagnóstico dos GISTs. Além disso, os estudos que analisaram a expressão de DOG1, incluindo o nosso estudo, mostraram que DOG1 conseguiu detectar um número maior de casos GISTs KIT-negativo do que PKC θ , o que justifica sua adição a um futuro painel de marcadores diferenciais de tumores GISTs, juntamente com KIT, CD34 e PKC θ .

5.8. IGF1R ESTÁ ALTAMENTE EXPRESSA NOS GISTs, INCLUSIVE NOS GISTs KIT-NEGATIVO

A próxima etapa do nosso estudo foi analisar o papel da proteína IGF1R como biomarcador de GISTs, inclusive dos GISTs KIT-negativo, pois, apesar de existirem dois estudos associando a expressão de IGF1R em GISTs [Braconi e colaboradores, 2008; Tarn e colaboradores, 2008], até o momento, nenhum estudo analisou a expressão dessa proteína nos tumores GISTs KIT-negativo e o potencial papel de IGF1R como biomarcador de diagnóstico de GISTs.

Apesar da alta expressão de IGF1R detectada em diferentes tipos tumorais, pouco se sabe sobre o mecanismo molecular envolvido nessa superexpressão. Armengol e colaboradores observaram que o cromossomo

15q26, onde se localiza o gene *IGF1R*, se apresentou amplificado em 10% dos tumores de mama [Armengol e colaboradores, 2000]. Recentemente, dois estudos analisaram a expressão de IGF1R nos GISTs e observaram que essa proteína se encontrava superexpressa principalmente nos GISTs selvagens para mutação em *KIT* e *PDGFRA* e nos GISTs pediátricos [Belinsky e colaboradores, 2008; Tarn e colaboradores, 2008]. Além do receptor IGF1R, Braconi e colaboradores analisaram os ligantes IGF1 e IGF2 e detectaram que a expressão desses dois ligantes parece predizer recorrência nos pacientes portadores de GISTs [Braconi e colaboradores, 2008].

As frequências de positividade e as variáveis dos estudos que analisaram a expressão de IGF1R nos GISTs podem ser observadas na tabela 15. No nosso estudo, a expressão de IGF1R foi encontrada em 91,5% do grupo dos GISTs, porém, esse resultado não pode ser comparado com os estudos anteriores, uma vez que IGF1R só foi analisada em GISTs KIT-positivo. No nosso estudo, foi observada uma expressão de 95,0% de IGF1R nos GISTs KIT-positivo. Resultados muito semelhantes para os GISTs KIT-positivo foram encontrados por Tarn e colaboradores (24/24; 100%) e por Braconi e colaboradores (94/94; 100%) [Braconi e colaboradores, 2008; Tarn e colaboradores, 2008]. Essa semelhança nos valores de frequência pode ter sido encontrada porque os dois estudos em questão utilizaram o mesmo clone que foi utilizado no nosso estudo e a recuperação antigênica no microondas com tampão citrato. Essa recuperação é muito similar à recuperação na panela a vapor com tampão citrato que foi utilizada pelo nosso grupo [Cuevas e colaboradores, 1994; Taylor e colaboradores, 1996].

Tabela 15 – Estudos que analisaram a expressão de IGF1R nos GISTs KIT-positivo

| Referência | Nº de casos incluídos | Clone/ Fabricante do anticorpo | Outras variáveis do estudo | Frequência de positividade de IGF1R nos GISTs |
|--------------------|-----------------------|-----------------------------------|--|---|
| Esse estudo | 59 | Clone 111A9 (Cell Signaling) | Recuperação antigênica na panela a vapor, sistema de detecção Novolink (Novocastra Ltd.) | 95,0% |
| Braconi | 94 | Clone 111A9 (Cell Signaling) | Recuperação antigênica no microondas com tampão citrato | 100% |
| Tarn | 24 | Clone 111A9 (Cell Signaling) | Recuperação antigênica no microondas com tampão citrato | 100% |

5.9. IGF1R NÃO FOI CAPAZ DE DISTINGUIR OS GISTs DOS TUMORES NÃO-GIST

Assim como para as outras proteínas, o padrão da expressão de IGF1R foi analisado e comparado entre os tumores incluídos nesse estudo. No nosso estudo foi encontrada uma expressão de 84,2% de IGF1R nos GISTs KIT-negativo.

No grupo dos tumores mesenquimais não-GISTs, a proteína IGFR1 estava expressa em 75,9% dos casos incluídos. Já em relação ao grupo dos tumores não-mesenquimais KIT-positivo, foi detectada uma expressão de 100% da proteína IGF1R. Essas diferenças nas frequências de positividade para IGF1R se mostraram significativas quando GISTs foram comparados com tumores mesenquimais não-GIST, porém o mesmo não ocorreu quando GISTs foram comparados aos tumores não-mesenquimais KIT-positivo. Da mesma

forma, não foi encontrada diferença significativa quando a frequência de positividade de IGF1R nos GISTs KIT-negativo foi comparada com a dos tumores mesenquimais não-GIST. De forma surpreendente, a frequência de expressão de IGF1R se encontrou tão elevada nos tumores não-mesenquimais KIT-positivo, que quando essa frequência foi comparada com a encontrada nos GISTs KIT-negativo, a diferença foi significativa, mas dessa vez mostrando a associação do IGF1R com os tumores não-mesenquimais KIT-positivo e não com os GISTs.

Outro dado inédito dessa parte do estudo foi a comparação dos *scores* da expressão de IGF1R nos diferentes tipos tumorais incluídos. Os resultados encontrados com a comparação dos *scores* acompanharam os encontrados para a frequência. Da mesma forma como foi observado para a frequência de positividade de IGF1R, a comparação entre os *scores* de expressão de IGF1R nos GISTs KIT-negativo com os tumores não-mesenquimais KIT-positivo demonstrou a associação do IGF1R com este último grupo tumoral e não com os GISTs.

Nossos resultados corroboraram os dados recentes que mostraram a alta expressão dessa proteína nos GISTs [Braconi e colaboradores, 2008; Tarn e colaboradores, 2008]. Além disso, esses resultados mostraram a expressão de IGF1R nos GISTs KIT-negativo, inclusive. Entretanto, nossos resultados mostraram que a expressão de IGF1R não conseguiu distinguir os GISTs dos tumores não-GIST, não sendo específico para esses tumores, e, assim, não contribuiria no diagnóstico dos GISTs KIT-negativo. Portanto, sua utilização em um futuro painel de marcadores de diagnóstico diferencial de tumores mesenquimais não seria lógica. Entretanto, como esse foi o primeiro estudo que analisou a expressão da proteína IGF1R como marcador de GISTs, faz-se necessário a realização de mais estudos, analisando IGF1R nos GISTs KIT-negativo, para que os resultados encontrados pelo nosso grupos sejam confirmados.

5.10. ANÁLISES DE ALTERAÇÕES EM *PDGFRA* E *KIT*

Em 36,6% dos 22 casos de GISTs KIT-negativos analisados foram encontradas mutações. Essa porcentagem está em concordância com Kim e colaboradores [Kim e colaboradores, 2006], porém essa porcentagem é menor do que a encontrada por Miettinen e colaboradores (57,7%), Liegl e colaboradores (76,5%), Miwa e colaboradores (90,0%) e Medeiros e colaboradores (88,0%) [Liegl e colaboradores, 2009; Medeiros e colaboradores, 2004; Miettinen e colaboradores, 2009; Miwa e colaboradores, 2008]. Curiosamente, essa porcentagem é maior do que a encontrada por Tzen e colaboradores (24,1%) [Tzen e colaboradores, 2005]. Kim e colaboradores e Miettinen e colaboradores analisaram as alterações nos genes *PDGFRA* e *KIT* através de PCR e sequenciamento automático [Kim e colaboradores, 2006; Miettinen e colaboradores, 2009], mesma técnica utilizada pelo nosso grupo, o que poderia explicar porque as frequências de mutação encontradas por esses autores são as mais parecidas com a frequência encontrada pelo nosso grupo. Já Liegl e colaboradores e Medeiros e colaboradores utilizaram uma combinação de PCR, cromatografia líquida desnaturante de alta performance (DHPLC) e sequenciamento [Liegl e colaboradores, 2009; Medeiros e colaboradores, 2004], o que poderia ter aumentado a eficiência de detecção de mutações. No trabalho de Miwa e colaboradores e Tzen e colaboradores só foram analisados 10 e 7 casos, respectivamente [Miwa e colaboradores, 2008; Tzen e colaboradores, 2005]. Esse pequeno número amostral pode ter sido responsável por essas divergências encontradas.

No nosso estudo, levando em consideração somente os casos mutados, 87,5% das mutações encontradas se localizavam no gene *PDGFRA*. Essa alta frequência de mutações no gene *PDGFRA* dos GISTs KIT-negativo também foi relatada por Miettinen e colaboradores (93,3%), Medeiros e colaboradores (81,8%), Liegl e colaboradores (84,6%) e por Kim e colaboradores (100%) [Kim e colaboradores, 2006; Lee e colaboradores, 2008; Liegl e colaboradores, 2009; Miettinen e colaboradores, 2009]. Entretanto, Miwa e colaboradores e Tzen e colaboradores relataram uma frequência de 100% das mutações

localizadas no gene *KIT* [Miwa e colaboradores, 2008; Tzen e colaboradores, 2005]. Essa frequência de 100% encontrada por Miwa e colaboradores e Tzen e colaboradores provavelmente foi causada pelo contexto da população estudada, uma vez que esses autores foram os únicos a estudar populações asiáticas. [Miwa e colaboradores, 2008; Tzen e colaboradores, 2005].

A análise de mutação demonstrou que as mutações, embora mais frequentes no gene *PDGFRA*, se encontraram distribuídas igualmente entre os exon 12 e 18 do gene *PDGFRA* (13,6%). Essa porcentagem similar não foi descrita por nenhum estudo até o momento. Em todos os estudos onde a porcentagem de mutações foi maior no gene *PDGFRA*, a maior parte das mutações encontradas se localizavam no exon 18 (Medeiros, Mietinen, Liegl). Essa diferença na frequência de mutações no gene *PDGFRA* poderia ser explicada pelo contexto da população brasileira, que é bastante mista. Resultado similar já havia sido descrito anteriormente pelo nosso grupo (Braggio, artigo submetido).

A mutação encontrada no exon 18 (D842V) em três GISTs KIT-negativo é bem descrita na literatura e reconhecida por sua resistência ao mesilato de imatinibe [Corless e colaboradores, 2005; Heinrich e colaboradores, 2003b]. As mutações encontradas no exon 12 do gene *PDGFRA* também já foram descritas, porém são encontradas em menor frequência do que as mutações no exon 18 [Daum e colaboradores, 2007; Lasota e colaboradores, 2008; Penzel e colaboradores, 2005]. No exon 14 do gene *PDGFRA* foi encontrada uma mutação (R634K), que, até o presente momento, nunca foi descrita na literatura.

Vale ainda ressaltar, que somente uma mutação foi encontrada no gene *KIT* (V457M), que também não foi descrita ainda por nenhum estudo.

5.11. POTENCIAL COMBINAÇÃO DE PAINEL DE MARCADORES (CD34, PKC θ , DOG1 E *STATUS* MUTACIONAL) PARA O DIAGNÓSTICO DOS GISTs KIT-NEGATIVO

A classificação dos GISTs tem sido um processo que evolui continuamente, refletindo o aumento do conhecimento da natureza biológica desse tumor. Avanços na biologia molecular e na genética foram responsáveis pelo conhecimento da importância do receptor KIT na carcinogênese dos GISTs [Hirota e colaboradores, 1998]. Hoje em dia, juntamente com a análise morfológica, a positividade por imuno-histoquímica para a proteína KIT vem sendo utilizado como marcador de diagnóstico dos GISTs, e, dessa forma, vem distinguindo os GISTs dos outros tumores mesenquimais não-GIST [Fletcher e colaboradores, 2002]. Entretanto, como dito anteriormente, um grupo tumoral apresenta os mesmos critérios clínicos e morfológicos para serem classificados como GISTs, porém não expressam a proteína KIT [Kontogianni-Katsarou e colaboradores, 2007; Medeiros e colaboradores, 2004] e não se beneficiam do tratamento com o mesilato de imatinibe. Dessa forma, a busca por novos biomarcadores que consigam diferenciar os GISTs dos outros tumores mesenquimais se tornou de grande importância. Nesse sentido, o último passo desse estudo teve como meta, apesar do número pequeno, avaliar qual das diferentes combinações, entre os marcadores que apresentaram uma associação significativa nos GISTs, conseguiria detectar um maior número de casos GISTs KIT-negativo, e dessa forma, analisar o potencial diagnóstico dessas combinações.

Para essa etapa, nós utilizamos as expressões das proteínas PKC θ e DOG1 e o *status* mutacional. A expressão da proteína fosfo-PKC θ não foi utilizada porque a proteína em questão detectou a mesma frequência de GISTs KIT-negativo do que a proteína PKC θ total, o que não justificaria sua utilização em um possível painel de marcadores de diagnóstico, integrado à KIT e CD34.

Nossos resultados mostraram que 19 dos 22 (86,4%) GISTs KIT-negativo foram positivos para pelo menos 2 marcadores: 5

CD34(+),DOG1(+),PKC θ (+),mutação(+), 5 são CD34(+),DOG1(+),PKC θ (+), 4 casos são DOG1(+),PKC θ (+), 3 casos são CD34(+),DOG1(+), 2 casos DOG1(+),mutação(+).

Dessa maneira, esses resultados sugerem um potencial para o uso da combinação de pelo menos 2 marcadores no diagnóstico dos GISTs KIT-negativo. Então, de maneira integrada com KIT e CD34, PKC θ , DOG1 e o *status* mutacional poderiam ser incluídos no painel de marcadores de diagnóstico para os GISTs.

A figura 19 esquematiza uma hipótese de como seria utilizada a combinação de marcadores de acordo com a frequência de casos positivos encontrados no nosso estudo.

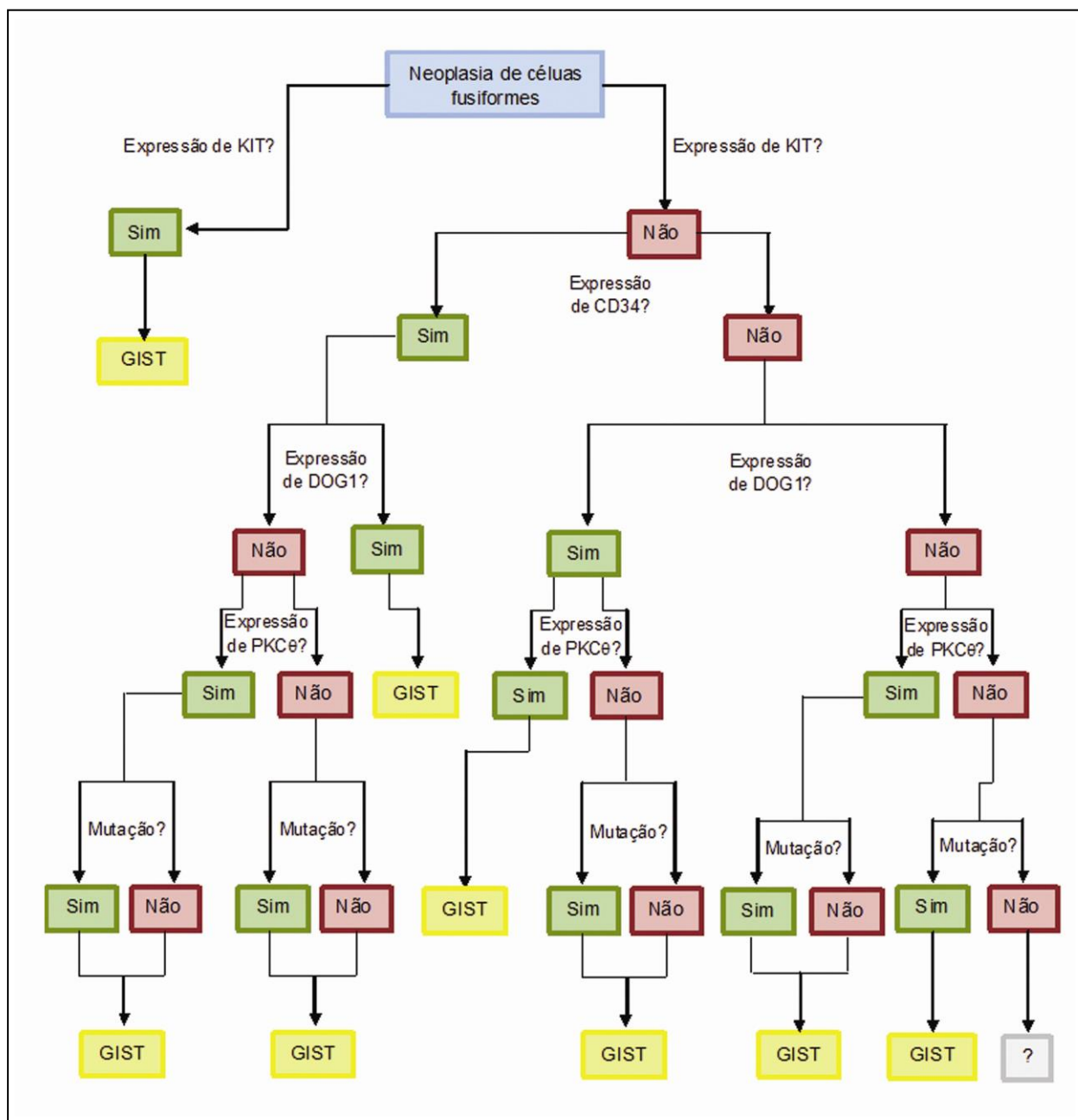


Figura 19 – Hipótese de como seria a sequência para a utilização do painel de marcadores contendo as proteínas KIT, CD34, DOG1, PKCθ e o *status* mutacional no diagnóstico dos GISTs.

6. CONCLUSÕES

Considerando os objetivos deste trabalho e os resultados alcançados, as conclusões dessa dissertação são:

- Foi observada uma alta expressão das proteínas PKC θ , fosfo-PKC θ , DOG1 e IGF1R na maioria dos GISTs, incluindo os GISTs KIT-negativo.
- Dentre os casos de GISTs, inclusive KIT-negativo, a frequência de positividade das proteínas PKC θ , fosfo-PKC θ e DOG1 foi significativamente maior do que nos tumores mesenquimais não-GIST e do que nos tumores não-mesenquimais KIT-positivo.
- Não houve diferença na frequência de positividade de IGF1R entre os diferentes grupos tumorais estudados.
- A análise de mutação mostrou que a maioria dos GISTs KIT-negativo foi selvagem para os genes *KIT* e *PDGFRA*. Nos tumores mutados, a mutação no gene *PDGFRA* predominou e se distribuiu igualmente entre os exons 12 e 18.
- Dentre os 22 GISTs KIT-negativo, 86,4% foram positivos para pelo menos 2 marcadores dentre aqueles que se encontraram significativamente associados aos GISTs quando comparados aos outros tumores estudados (CD34, PKC θ , DOG1 e *status* mutacional).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Agaram NP, LaQuaglia MP, Ustun B, Guo T, Wong GC, Socci ND, et al. Molecular characterization of pediatric gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 2008;14:3204-15.
- 2- Allander SV, Nupponen NN, Ringner M, Hostetter G, Maher GW, Goldberger N, et al. Gastrointestinal stromal tumors with KIT mutations exhibit a remarkably homogeneous gene expression profile. *Cancer Res* 2001;61:8624-8.
- 3- Allen NE, Key TJ, Appleby PN, Travis RC, Roddam AW, Rinaldi S, et al. Serum insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-3 concentrations and prostate cancer risk: results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16:1121-7.
- 4- Almeida A, Muleris M, Dutrillaux B, Malfoy B. The insulin-like growth factor I receptor gene is the target for the 15q26 amplicon in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 1994;11:63-5.
- 5- Altman A, Villalba M. Protein kinase C-theta (PKC theta): a key enzyme in T cell life and death. *J Biochem* 2002;132:841-6.
- 6- Altman A, Villalba M. Protein kinase C-theta (PKCtheta): it's all about location, location, location. *Immunol Rev* 2003;192:53-63.
- 7- Andersson J, Sjogren H, Meis-Kindblom JM, Stenman G, Aman P, Kindblom LG. The complexity of KIT gene mutations and chromosome rearrangements and their clinical correlation in gastrointestinal stromal (pacemaker cell) tumors. *Am J Pathol* 2002;160:15-22.
- 8- Antonescu CR, Besmer P, Guo T, Arkun K, Hom G, Koryotowski B, et al. Acquired resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumor occurs through secondary gene mutation. *Clin Cancer Res* 2005;11:4182-90.
- 9- Armengol G, Knuutila S, Lluís F, Capella G, Miro R, Caballin MR. DNA copy number changes and evaluation of MYC, IGF1R, and FES amplification in xenografts of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;116:133-41.

- 10- Baglietto L, English DR, Hopper JL, Morris HA, Tilley WD, Giles GG. Circulating insulin-like growth factor-I and binding protein-3 and the risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16:763-8.
- 11- Baier G, Telford D, Giampa L, Coggeshall KM, Baier-Bitterlich G, Isakov N, et al. Molecular cloning and characterization of PKC theta, a novel member of the protein kinase C (PKC) gene family expressed predominantly in hematopoietic cells. *J Biol Chem* 1993;268:4997-5004.
- 12- Bauer S, Corless CL, Heinrich MC, Dirsch O, Antoch G, Kanja J, et al. Response to imatinib mesylate of a gastrointestinal stromal tumor with very low expression of KIT. *Cancer Chemother Pharmacol* 2003;51:261-5.
- 13- Bauer S, Yu LK, Demetri GD, Fletcher JA. Heat shock protein 90 inhibition in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor. *Cancer Res* 2006;66:9153-61.
- 14- Belinsky MG, Rink L, Cai KQ, Ochs MF, Eisenberg B, Huang M, et al. The insulin-like growth factor system as a potential therapeutic target in gastrointestinal stromal tumors. *Cell Cycle* 2008;7:2949-55.
- 15- Bi K, Tanaka Y, Coudronniere N, Sugie K, Hong S, van Stipdonk MJ, et al. Antigen-induced translocation of PKC-theta to membrane rafts is required for T cell activation. *Nat Immunol* 2001;2:556-63.
- 16- Blanke CD, Rankin C, Demetri GD, Ryan CW, von MM, Benjamin RS, et al. Phase III randomized, intergroup trial assessing imatinib mesylate at two dose levels in patients with unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors expressing the kit receptor tyrosine kinase: S0033. *J Clin Oncol* 2008;26:626-32.
- 17- Blay P, Astudillo A, Buesa JM, Campo E, Abad M, Garcia-Garcia J, et al. Protein kinase C theta is highly expressed in gastrointestinal stromal tumors but not in other mesenchymal neoplasias. *Clin Cancer Res* 2004;10:4089-95.

- 18- Blume-Jensen P, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Zsebo KM, Westermarck B, Heldin CH. Activation of the human c-kit product by ligand-induced dimerization mediates circular actin reorganization and chemotaxis. *EMBO J* 1991;10:4121-8.
- 19- Braconi C, Bracci R, Bearzi I, Bianchi F, Sabato S, Mandolesi A, et al. Insulin-like growth factor (IGF) 1 and 2 help to predict disease outcome in GIST patients. *Ann Oncol* 2008;19:1293-8.
- 20- Buchdunger E, Cioffi CL, Law N, Stover D, Ohno-Jones S, Druker BJ, et al. Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;295:139-45.
- 21- Caputo A, Caci E, Ferrera L, Pedemonte N, Barsanti C, Sondo E, et al. TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity. *Science* 2008;322:590-4.
- 22- Chen LL, Trent JC, Wu EF, Fuller GN, Ramdas L, Zhang W, et al. A missense mutation in KIT kinase domain 1 correlates with imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 2004;64:5913-9.
- 23- Corless CL, Fletcher JA, Heinrich MC. Biology of gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* 2004;22:3813-25.
- 24- Corless CL, Schroeder A, Griffith D, Town A, McGreevey L, Harrell P, et al. PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors: frequency, spectrum and in vitro sensitivity to imatinib. *J Clin Oncol* 2005;23:5357-64.
- 25- Cuevas EC, Bateman AC, Wilkins BS, Johnson PA, Williams JH, Lee AH, et al. Microwave antigen retrieval in immunocytochemistry: a study of 80 antibodies. *J Clin Pathol* 1994;47:448-52.
- 26- Daum O, Grossmann P, Vanecek T, Sima R, Mukensnabl P, Michal M. Diagnostic morphological features of PDGFRA-mutated gastrointestinal stromal tumors: molecular genetic and histologic analysis of 60 cases

- of gastric gastrointestinal stromal tumors. *Ann Diagn Pathol* 2007;11:27-33.
- 27- Debiec-Rychter M, Cools J, Dumez H, Sciot R, Stul M, Mentens N, et al. Mechanisms of resistance to imatinib mesylate in gastrointestinal stromal tumors and activity of the PKC412 inhibitor against imatinib-resistant mutants. *Gastroenterology* 2005;128:270-9.
- 28- Debiec-Rychter M, Dumez H, Judson I, Wasag B, Verweij J, Brown M, et al. Use of c-KIT/PDGFRα mutational analysis to predict the clinical response to imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumours entered on phase I and II studies of the EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. *Eur J Cancer* 2004;40:689-95.
- 29- Deeds L, Teodorescu S, Chu M, Yu Q, Chen CY. A p53-independent G1 cell cycle checkpoint induced by the suppression of protein kinase C alpha and theta isoforms. *J Biol Chem* 2003;278:39782-93.
- 30- DeMatteo RP, Lewis JJ, Leung D, Mudan SS, Woodruff JM, Brennan MF. Two hundred gastrointestinal stromal tumors: recurrence patterns and prognostic factors for survival. *Ann Surg* 2000;231:51-8.
- 31- Demetri GD, Benjamin RS, Blanke CD, Blay JY, Casali P, Choi H, et al. NCCN Task Force report: management of patients with gastrointestinal stromal tumor (GIST)--update of the NCCN clinical practice guidelines. *J Natl Compr Canc Netw* 2007;5 Suppl 2:S1-29.
- 32- Demetri GD, van Oosterom AT, Garrett CR, Blackstein ME, Shah MH, Verweij J, et al. Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: a randomised controlled trial. *Lancet* 2006;368:1329-38.
- 33- Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, Van den Abbeele AD, Eisenberg B, Roberts PJ, et al. Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med* 2002;347:472-80.
- 34- Duensing A, Joseph NE, Medeiros F, Smith F, Hornick JL, Heinrich MC, et al. Protein Kinase C theta (PKCθ) expression and

- constitutive activation in gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *Cancer Res* 2004;64:5127-31.
- 35- Escobar GA, Robinson WA, Nydam TL, Heiple DC, Weiss GJ, Buckley L, et al. Severe paraneoplastic hypoglycemia in a patient with a gastrointestinal stromal tumor with an exon 9 mutation: a case report. *BMC Cancer* 2007;7:13.
- 36- Espinosa I, Lee CH, Kim MK, Rouse BT, Subramanian S, Montgomery K, et al. A novel monoclonal antibody against DOG1 is a sensitive and specific marker for gastrointestinal stromal tumors. *Am J Surg Pathol* 2008;32:210-8.
- 37- Fletcher CD, Berman JJ, Corless C, Gorstein F, Lasota J, Longley BJ, et al. Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: A consensus approach. *Hum Pathol* 2002;33:459-65.
- 38- Galindo BE, Vacquier VD. Phylogeny of the TMEM16 protein family: some members are overexpressed in cancer. *Int J Mol Med* 2005;16:919-24.
- 39- Garrouste F, Remacle-Bonnet M, Fauriat C, Marvaldi J, Luis J, Pommier G. Prevention of cytokine-induced apoptosis by insulin-like growth factor-I is independent of cell adhesion molecules in HT29-D4 colon carcinoma cells-evidence for a NF-kappaB-dependent survival mechanism. *Cell Death Differ* 2002;9:768-79.
- 40- Ghaffari-Tabrizi N, Bauer B, Villunger A, Baier-Bitterlich G, Altman A, Utermann G, et al. Protein kinase Ctheta, a selective upstream regulator of JNK/SAPK and IL-2 promoter activation in Jurkat T cells. *Eur J Immunol* 1999;29:132-42.
- 41- Gomes AL, Bardales RH, Milanezi F, Reis RM, Schmitt F. Molecular analysis of c-Kit and PDGFRA in GISTs diagnosed by EUS. *Am J Clin Pathol* 2007;127:89-96.
- 42- Gomes AL, Gouveia A, Capelinha AF, de la Cruz D, Silva P, Reis RM, et al. Molecular alterations of KIT and PDGFRA in GISTs: evaluation of a Portuguese series. *J Clin Pathol* 2008;61:203-8.

- 43- Gotlieb WH, Bruchim I, Gu J, Shi Y, Camirand A, Blouin MJ, et al. Insulin-like growth factor receptor I targeting in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2006;100:389-96.
- 44- Guimaraes DP, Oliveira IM, de ME, Paiva GR, Souza DM, Barnas C, et al. Interferon-inducible guanylate binding protein (GBP)-2: a novel p53-regulated tumor marker in esophageal squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2009;124:272-9.
- 45- Guiteau J, Fanucchi M, Folpe A, Staley CA, III, Kooby DA. Hypoglycemia in the setting of advanced gastrointestinal stromal tumor. *Am Surg* 2006;72:1225-30.
- 46- Hamberg P, de Jong FA, Boonstra JG, van Doorn J, Verweij J, Sleijfer S. Non-islet-cell tumor induced hypoglycemia in patients with advanced gastrointestinal stromal tumor possibly worsened by imatinib. *J Clin Oncol* 2006;24:e30-e31.
- 47- Hanna A, Pang Y, Bedrossian CW, Dejmeck A, Michael CW. Podoplanin is a useful marker for identifying mesothelioma in malignant effusions. *Diagn Cytopathol* 2010.
- 48- Heinrich MC, Corless CL, Blanke CD, Demetri GD, Joensuu H, Roberts PJ, et al. Molecular correlates of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* 2006;24:4764-74.
- 49- Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, Blanke CD, von Mehren M, Joensuu H, et al. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* 2003a;21:4342-9.
- 50- Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, McGreevey L, Chen CJ, Joseph N, et al. PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* 2003b;299:708-10.
- 51- Hilgenberg L, Miles K. Developmental regulation of a protein kinase C isoform localized in the neuromuscular junction. *J Cell Sci* 1995;108 (Pt 1):51-61.

- 52- Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S, et al. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 1998;279:577-80.
- 53- Hornick JL, Fletcher CD. Immunohistochemical staining for KIT (CD117) in soft tissue sarcomas is very limited in distribution. *Am J Clin Pathol* 2002;117:188-93.
- 54- Hornick JL, Fletcher CD. The role of KIT in the management of patients with gastrointestinal stromal tumors. *Hum Pathol* 2007;38:679-87.
- 55- Hsu FD, Nielsen TO, Alkushi A, Dupuis B, Huntsman D, Liu CL, et al. Tissue microarrays are an effective quality assurance tool for diagnostic immunohistochemistry. *Mod Pathol* 2002;15:1374-80.
- 56- Hubbard SR. Juxtamembrane autoinhibition in receptor tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:464-71.
- 57- Huizinga JD, Thuneberg L, Kluppel M, Malysz J, Mikkelsen HB, Bernstein A. W/*kit* gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature* 1995;373:347-9.
- 58- Ishaq M, Fan M, Wigmore K, Gaddam A, Natarajan V. Regulation of retinoid X receptor responsive element-dependent transcription in T lymphocytes by Ser/Thr phosphatases: functional divergence of protein kinase C (PKC) θ ; and PKC α in mediating calcineurin-induced transactivation. *J Immunol* 2002;169:732-8.
- 59- Isozaki K, Terris B, Belghiti J, Schiffmann S, Hirota S, Vanderwinden JM. Germline-activating mutation in the kinase domain of KIT gene in familial gastrointestinal stromal tumors. *Am J Pathol* 2000;157:1581-5.
- 60- Katoh M, Katoh M. FLJ10261 gene, located within the CCND1-EMS1 locus on human chromosome 11q13, encodes the eight-transmembrane protein homologous to C12orf3, C11orf25 and FLJ34272 gene products. *Int J Oncol* 2003;22:1375-81.
- 61- Khan J, Wei JS, Ringner M, Saal LH, Ladanyi M, Westermann F, et al. Classification and diagnostic prediction of cancers using gene

- expression profiling and artificial neural networks. *Nat Med* 2001;7:673-9.
- 62- Kim KM, Kang DW, Moon WS, Park JB, Park CK, Sohn JH, et al. PKC θ expression in gastrointestinal stromal tumor. *Mod Pathol* 2006;19:1480-6.
- 63- Kindblom LG, Remotti HE, Aldenborg F, Meis-Kindblom JM. Gastrointestinal pacemaker cell tumor (GIPACT): gastrointestinal stromal tumors show phenotypic characteristics of the interstitial cells of Cajal. *Am J Pathol* 1998;152:1259-69.
- 64- Kontogianni-Katsarou K, Lariou C, Tsompanaki E, Vourlakou C, Kairi-Vassilatou E, Mastoris C, et al. KIT-negative gastrointestinal stromal tumors with a long term follow-up: a new subgroup does exist. *World J Gastroenterol* 2007;13:1098-102.
- 65- Kwon MJ, Nam ES, Cho SJ, Park HR, Shin HS, Park JH, et al. Comparison of tissue microarray and full section in immunohistochemistry of gastrointestinal stromal tumors. *Pathol Int* 2009;59:851-6.
- 66- Lasota J, Miettinen M. Clinical significance of oncogenic KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumours. *Histopathology* 2008.
- 67- Lasota J, Wozniak A, Sarlomo-Rikala M, Rys J, Kordek R, Nassar A, et al. Mutations in exons 9 and 13 of KIT gene are rare events in gastrointestinal stromal tumors. A study of 200 cases. *Am J Pathol* 2000;157:1091-5.
- 68- Lee HE, Kim MA, Lee HS, Lee BL, Kim WH. Characteristics of KIT-negative gastrointestinal stromal tumours and diagnostic utility of protein kinase C θ immunostaining. *J Clin Pathol* 2008;61:722-9.
- 69- LeRoith D, Roberts CT, Jr. The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett* 2003;195:127-37.
- 70- Liegl B, Hornick JL, Corless CL, Fletcher CD. Monoclonal antibody DOG1.1 shows higher sensitivity than KIT in the diagnosis of

- gastrointestinal stromal tumors, including unusual subtypes. *Am J Surg Pathol* 2009;33:437-46.
- 71- Liu Y, Graham C, Parravicini V, Brown MJ, Rivera J, Shaw S. Protein kinase C theta is expressed in mast cells and is functionally involved in Fcepsilon receptor I signaling. *J Leukoc Biol* 2001;69:831-40.
- 72- Liu Y, Witte S, Liu YC, Doyle M, Elly C, Altman A. Regulation of protein kinase C theta function during T cell activation by Lck-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 2000;275:3603-9.
- 73- Lopes LF, Ojopi EB, Bacchi CE. Gastrointestinal stromal tumor in Brazil: clinicopathology, immunohistochemistry, and molecular genetics of 513 cases. *Pathol Int* 2008;58:344-52.
- 74- Lux ML, Rubin BP, Biase TL, Chen CJ, Maclure T, Demetri G, et al. KIT extracellular and kinase domain mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Am J Pathol* 2000;156:791-5.
- 75- Medeiros F, Corless CL, Duensing A, Hornick JL, Oliveira AM, Heinrich MC, et al. KIT-negative gastrointestinal stromal tumors: proof of concept and therapeutic implications. *Am J Surg Pathol* 2004;28:889-94.
- 76- Mengel M, von WR, Wiese B, Rudiger T, Muller-Hermelink HK, Kreipe H. Inter-laboratory and inter-observer reproducibility of immunohistochemical assessment of the Ki-67 labelling index in a large multi-centre trial. *J Pathol* 2002;198:292-9.
- 77- Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors--definition, clinical, histological, immunohistochemical, and molecular genetic features and differential diagnosis. *Virchows Arch* 2001;438:1-12.
- 78- Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: review on morphology, molecular pathology, prognosis, and differential diagnosis. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130:1466-78.
- 79- Miettinen M, Sobin LH, Sarlomo-Rikala M. Immunohistochemical spectrum of GISTs at different sites and their differential diagnosis with a reference to CD117 (KIT). *Mod Pathol* 2000;13:1134-42.

- 80- Miettinen M, Wang ZF, Lasota J. DOG1 antibody in the differential diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: a study of 1840 cases. *Am J Surg Pathol* 2009;33:1401-8.
- 81- Miwa S, Nakajima T, Murai Y, Takano Y, Sugiyama T. Mutation assay of the novel gene DOG1 in gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *J Gastroenterol* 2008;43:531-7.
- 82- Motegi A, Sakurai S, Nakayama H, Sano T, Oyama T, Nakajima T. PKC theta, a novel immunohistochemical marker for gastrointestinal stromal tumors (GIST), especially useful for identifying KIT-negative tumors. *Pathol Int* 2005;55:106-12.
- 83- Nielsen TO, West RB, Linn SC, Alter O, Knowling MA, O'Connell JX, et al. Molecular characterisation of soft tissue tumours: a gene expression study. *Lancet* 2002;359:1301-7.
- 84- Nishida T, Hirota S, Taniguchi M, Hashimoto K, Isozaki K, Nakamura H, et al. Familial gastrointestinal stromal tumours with germline mutation of the KIT gene. *Nat Genet* 1998;19:323-4.
- 85- Nishizuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 1992;258:607-14.
- 86- Otto TD, Vasconcellos EA, Gomes LH, Moreira AS, Degraive WM, Mendonca-Lima L, et al. ChromaPipe: a pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility. *Genet Mol Res* 2008;7:861-71.
- 87- Ou WB, Zhu MJ, Demetri GD, Fletcher CD, Fletcher JA. Protein kinase C-theta regulates KIT expression and proliferation in gastrointestinal stromal tumors. *Oncogene* 2008;27:5624-34.
- 88- Parker RL, Huntsman DG, Lesack DW, Cupples JB, Grant DR, Akbari M, et al. Assessment of interlaboratory variation in the immunohistochemical determination of estrogen receptor status using a breast cancer tissue microarray. *Am J Clin Pathol* 2002;117:723-8.
- 89- Pawson T. Regulation and targets of receptor tyrosine kinases. *Eur J Cancer* 2002;38 Suppl 5:S3-10.

- 90- Penzel R, Aulmann S, Moock M, Schwarzbach M, Rieker RJ, Mechtersheimer G. The location of KIT and PDGFRA gene mutations in gastrointestinal stromal tumours is site and phenotype associated. *J Clin Pathol* 2005;58:634-9.
- 91- Pithorecky I, Cheney RT, Kraybill WG, Gibbs JF. Gastrointestinal stromal tumors: current diagnosis, biologic behavior, and management. *Ann Surg Oncol* 2000;7:705-12.
- 92- Renehan AG, Zwahlen M, Minder C, O'Dwyer ST, Shalet SM, Egger M. Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk: systematic review and meta-regression analysis. *Lancet* 2004;363:1346-53.
- 93- Rikhof B, Van Den BG, Van Der Graaf WT. Non-islet cell tumour hypoglycaemia in a patient with a gastrointestinal stromal tumour. *Acta Oncol* 2005;44:764-6.
- 94- Rossi F, Ehlers I, Agosti V, Socci ND, Viale A, Sommer G, et al. Oncogenic Kit signaling and therapeutic intervention in a mouse model of gastrointestinal stromal tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:12843-8.
- 95- Rubin BP. Gastrointestinal stromal tumours: an update. *Histopathology* 2006;48:83-96.
- 96- Rubin BP, Heinrich MC, Corless CL. Gastrointestinal stromal tumour. *Lancet* 2007;369:1731-41.
- 97- Rubin BP, Singer S, Tsao C, Duensing A, Lux ML, Ruiz R, et al. KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 2001;61:8118-21.
- 98- Sambol EB, Ambrosini G, Geha RC, Kennealey PT, Decarolis P, O'connor R, et al. Flavopiridol targets c-KIT transcription and induces apoptosis in gastrointestinal stromal tumor cells. *Cancer Res* 2006;66:5858-66.

- 99- Sandberg AA, Bridge JA. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors. gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 2002;135:1-22.
- 100- Sarfstein R, Maor S, Reizner N, Abramovitch S, Werner H. Transcriptional regulation of the insulin-like growth factor-I receptor gene in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2006;252:241-6.
- 101- Sarlomo-Rikala M, Kovatich AJ, Barusevicius A, Miettinen M. CD117: a sensitive marker for gastrointestinal stromal tumors that is more specific than CD34. *Mod Pathol* 1998;11:728-34.
- 102- Severi G, Morris HA, MacInnis RJ, English DR, Tilley WD, Hopper JL, et al. Circulating insulin-like growth factor-I and binding protein-3 and risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:1137-41.
- 103- Singh R, Grey A, Miller M, Gresnigt MG, Hoogerbrugge CM, van Doorn J. Non-hyperinsulinemic hypoglycemia in a patient with a gastrointestinal stromal tumor. *Eur J Intern Med* 2006;17:127-9.
- 104- Sparatore B, Patrone M, Passalacqua M, Pedrazzi M, Pontremoli S, Melloni E. Neuronal differentiation of PC12 cells involves changes in protein kinase C-theta distribution and molecular properties. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;275:149-53.
- 105- Sun Z, Arendt CW, Ellmeier W, Schaeffer EM, Sunshine MJ, Gandhi L, et al. PKC-theta is required for TCR-induced NF-kappaB activation in mature but not immature T lymphocytes. *Nature* 2000;404:402-7.
- 106- Suster S. Gastrointestinal stromal tumors. *Semin Diagn Pathol* 1996;13:297-313.
- 107- Takei H, Powell SZ. Novel immunohistochemical markers in the diagnosis of nonglial tumors of nervous system. *Adv Anat Pathol* 2010;17:150-3.
- 108- Tarn C, Rink L, Merkel E, Flieder D, Pathak H, Koumbi D, et al. Insulin-like growth factor 1 receptor is a potential therapeutic target for

- gastrointestinal stromal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:8387-92.
- 109- Taylor CR, Shi SR, Chen C, Young L, Yang C, Cote RJ. Comparative study of antigen retrieval heating methods: microwave, microwave and pressure cooker, autoclave, and steamer. *Biotech Histochem* 1996;71:263-70.
- 110- Trent JC, Ramdas L, Dupart J, Hunt K, Macapinlac H, Taylor E, et al. Early effects of imatinib mesylate on the expression of insulin-like growth factor binding protein-3 and positron emission tomography in patients with gastrointestinal stromal tumor. *Cancer* 2006;107:1898-908.
- 111- Tzen CY, Mau BL. Analysis of CD117-negative gastrointestinal stromal tumors. *World J Gastroenterol* 2005;11:1052-5.
- 112- Valentinis B, Baserga R. IGF-I receptor signalling in transformation and differentiation. *Mol Pathol* 2001;54:133-7.
- 113- Verweij J, Casali PG, Zalcberg J, LeCesne A, Reichardt P, Blay JY, et al. Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumours with high-dose imatinib: randomised trial. *Lancet* 2004;364:1127-34.
- 114- Vosse BA, Seelentag W, Bachmann A, Bosman FT, Yan P. Background staining of visualization systems in immunohistochemistry: comparison of the Avidin-Biotin Complex system and the EnVision+ system. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2007;15:103-7.
- 115- Weiss JM, Huang WY, Rinaldi S, Fears TR, Chatterjee N, Chia D, et al. IGF-1 and IGFBP-3: Risk of prostate cancer among men in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial. *Int J Cancer* 2007;121:2267-73.
- 116- West RB, Corless CL, Chen X, Rubin BP, Subramanian S, Montgomery K, 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.

- 117- Wu JD, Haugk K, Woodke L, Nelson P, Coleman I, Plymate SR. Interaction of IGF signaling and the androgen receptor in prostate cancer progression. *J Cell Biochem* 2006;99:392-401.
- 118- Yang YD, Cho H, Koo JY, Tak MH, Cho Y, Shim WS, et al. TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature* 2008;455:1210-5.
- 119- Yanocho GM, Eckhart W. Type I insulin-like growth factor receptor over-expression induces proliferation and anti-apoptotic signaling in a three-dimensional culture model of breast epithelial cells. *Breast Cancer Res* 2006;8:R18.
- 120- Yu H, Rohan T. Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1472-89.
- 121- Zhu MJ, Ou WB, Fletcher CD, Cohen PS, Demetri GD, Fletcher JA. KIT oncoprotein interactions in gastrointestinal stromal tumors: therapeutic relevance. *Oncogene* 2007;26:6386-95.

8. ANEXOS

8.1. ANEXO I

Protocolo e diretrizes terapêuticas do tumor estromal gastrointestinal - Diário Oficial da União Nº182 - Seção 1, portaria Nº 1.655 de 17 de Setembro de 2002

SUS ONCO
Ano 7 Nº 7 - Novembro de 2002

PROTOCOLO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS DO TUMOR DO ESTROMA GASTROINTESTINAL

O Diário Oficial da União Nº182 - Seção 1, quinta-feira, 19 de setembro de 2002 - publicou a PORTARIA Nº 1.655, DE 17 DE SETEMBRO DE 2002 GABINETE DO MINISTRO, que aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas – Tumor do Estroma Gastrointestinal (GIST, sigla em Inglês); cria o procedimento 29.021.10-3 Tumor do Estroma Gastrointestinal - Doença gastrointestinal ou intra-abdominal irressecável (primária, metastática ou recidivada) - Obrigatório o exame com resultado positivo do anti-CD117/c-KIT ao exame de imuno-histoquímica, incluindo-o em 29.020.00-0 - SUBGRUPO 02 - QUIMIOTERAPIA PALIATIVA - ADULTO II; e o coloca e disponibiliza no rol dos procedimentos do Fundo de Ações Estratégicas e Compensação – FAEC. A leitura atenta desse documento é essencial para o exercício de uma boa solicitação e autorização.

Os seguintes aspectos são relevantes para a autorização deste procedimento, do âmbito do Sistema APAC-Onco, além da apresentação do Laudo Médico para Emissão de APAC devidamente preenchido:

* No laudo do exame anátomo-patológico, o diagnóstico deve ser de Tumor do estroma Gastrointestinal e estar feito com base nos achados histoquímicos dos marcadores CD117 ou KIT, CD34, Actina 1 a 4, Desmina, S-100 e Vimentina.

* É condição *sine qua non* para a indicação do Mesilato de Imatinibe, como tratamento medicamentoso do Tumor do Estroma Gastrointestinal, que seja positivo o resultado do exame do anti-CD117/c-KIT, realizado pela técnica de imuno-histoquímica.

* O novo procedimento é compatível com os seguintes códigos topográficos da 10ª Revisão da CID-10: C15 (esôfago), C16 (estômago), C17 (intestino delgado), C18 (côlon), C19 (junção reto-sigmóide), C20 (reto), C26.8 (neoplasia maligna de órgãos digestivos cuja localização inicial não possa ser classificada nas topografia anteriores), C47.4 (nervos periféricos do abdômen), C48.1 (mesentério, mesocôlon, omento ou peritônio parietal ou visceral) e C49.3 (diafragma).

* O doente deve ter idade igual ou maior de 18 anos e o diagnóstico confirmado de Tumor do Estroma Gastrointestinal, conforme a positividade dos marcadores acima mencionados.

Informações como capacidade funcional menor ou igual a 3, conforme estabelecido no seguinte sub-item 3.1 da Portaria GM/MS 1.655; e a orientação adequada do paciente, ou de seu responsável legal, dos potenciais riscos e efeitos colaterais relacionados ao uso do Mesilato de Imatinibe, formalizado por meio da assinatura de Termo de Consentimento Informado, de acordo com o modelo incluído no Anexo da Portaria, são dados de prontuário que devem ser pesquisados quando da necessidade de auditoria.

O principal tratamento do Tumor do Estroma Gastrointestinal é cirúrgico, independentemente da classificação do risco (sub-item 3.2.1-d da Portaria) e de ser a doença primária, metastática ou recidivada, e pode resultar em ressecção completa ou incompleta da(s) lesão(ões). O tratamento medicamentoso, com o Mesilato de Imatinibe, é reservado para doentes em estado funcional de 0 a 3 (ver o sub-item 3.1 da Portaria) com Tumor do Estroma Gastrointestinal irressecável, seja ele primário, metastático ou recidivado.

Como os resultados finais e a toxicidade a longo prazo do tratamento com o Mesilato de Imatinibe ainda são desconhecidos, este tratamento pode ser continuado, sob rigoroso controle médico, até que se observe progressão tumoral, como definida no item 7 da Portaria, na ausência dos outros critérios de suspensão do tratamento. Esses critérios são: Retenção hídrica com acometimento significativo de função, pronunciado ou intolerado, anasarca ou edema cerebral; graus de toxicidade 3 e 4, conforme especificado no sub-item 8 A da Portaria GM/MS 1.655; capacidade funcional do doente também mensurada como medida dos graus de toxicidade 3 e 4, conforme especificado no sub-item 8B dessa Portaria; progressão tumoral; e falta de aderência do doente ao tratamento.

8.2. ANEXO II

Aprovação do estudo original pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INCA



Dra. Denise Peixoto Guimarães
Coordenadora do Estudo

Ref.: Prot. 08/03 - Análise do espectro de mutações do gene KIT e correlação com os achados clinicopatológicos dos pacientes com tumores gastrointestinais

Prezada Doutora,

Vimos por meio desta informar que o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer analisou e **aprovou** sem restrições, o Protocolo intitulado: Análise do espectro de mutações do gene KIT e correlação com os achados clinicopatológicos dos pacientes com tumores gastrointestinais, em 27 de fevereiro de 2003.

Estamos encaminhando a documentação pertinente para o CONEP, com vistas a análise, registro e arquivamento. Por se tratar de pesquisa classificada em Área Temática Especial, o pesquisador deverá aguardar a sua aprovação final para que se inicie a execução.

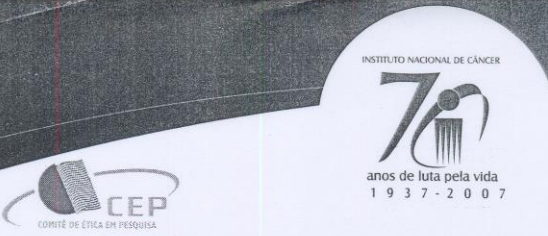
De acordo com o fluxograma de aprovação de estudos clínicos vigente, o protocolo lhe está sendo devolvido para que seja encaminhado, por V.S^a, a Fundação Ary Frauzino para providências quanto ao Contrato de Patrocínio.

Atenciosamente,

Dr. Luis Otávio Olivatto
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA

8.3. ANEXO III

Aprovação da emenda 4 ao protocolo CEP – 08/03 pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INCA



A(o):Dr(a). Denise P. Guimarães
Pesquisador(a) Principal

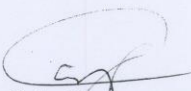
Rio de Janeiro, 12 de novembro de 2007

Registro CEP nº 08/03 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)
Registro CONEP nº 9169
Título do projeto: GIST – “Análise do espectro de mutações do gene KIT e correlação com os achados clinicopatológicos dos pacientes com tumores gastrointestinais”

Prezado(a) Pesquisador(a),


Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer **analisou e aprovou a Emenda nº 4** relacionada ao protocolo acima em sua reunião de 15/10/07.

Atenciosamente



Dr. Carlos Henrique D. Silva
Coordenador Substituto do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA

www.inca.gov.br



8.4. ANEXO IV

Aprovação da emenda 5 ao protocolo CEP – 08/03 pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INCA



A(o):Dr(a). Denise P. Guimarães
Pesquisador(a) Principal

Rio de Janeiro, 29 de julho de 2009

Registro CEP nº 08/03 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Registro CONEP nº 9169

Título do projeto: GIST – “Análise do espectro de mutações do gene KIT e correlação com os achados clinicopatológicos dos pacientes com tumores gastrointestinais”

Prezado(a) Pesquisador(a),

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer **analisou** e aprovou a **Emenda nº 5 datada de 07/07/09** e relacionada ao protocolo acima, em sua reunião de 27 de julho de 2009.

Atenciosamente

Dr. Carlos Henrique D Silva
Coordenador-Substituto
Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA