

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

**DENSIDADE MICROVASCULAR E EXPRESSÃO DO FATOR DE
CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR EM UMA SÉRIE DE 79
CASOS DE TUMORES ESTROMAIS GASTRINTESTINAIS.**

Luiz Eduardo Waengertner

Porto Alegre

Julho de 2011

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

**DENSIDADE MICROVASCULAR E EXPRESSÃO DO FATOR DE
CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR EM UMA SÉRIE DE 79
CASOS DE TUMORES ESTROMAIS GASTRINTESTINAIS.**

Luiz Eduardo Waengertner

Dissertação de Mestrado

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

Orientadora: Prof^a. Dra. Luise Meurer

CIP - Catalogação na Publicação

Waengertner, Luiz Eduardo

Densidade microvascular e expressão do fator de crescimento endotelial vascular em uma série de 79 casos de tumores estromais gastrintestinais / Luiz Eduardo Waengertner. -- 2011.

71 f.

Orientadora: Luise Meurer.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia, Porto Alegre, BR-RS, 2011.

1. GIST. 2. Angiogênese. 3. Densidade microvascular. 4. Método de Chalkley. I. Meurer, Luise, orient. II. Título.

Cada pessoa brilha com luz própria, entre todas as outras. Não existem duas fogueiras iguais. Existem fogueiras grandes e fogueiras pequenas e fogueiras de todas as cores. Existe gente de fogo sereno, que nem percebe o vento e gente de fogo louco que enche o ar de chispas. Alguns fogos, fogos bobos, não alumiam nem queimam; mas outros incendeiavam a vida com tamanha vontade que impossível olhar para eles sem pestanejar e quem chega perto pega fogo.

Eduardo Galeano

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus entes queridos e a todos que nele tiveram participação direta ou indireta.

AGRADECIMENTOS

À Professora orientadora Dra. Luise Meurer, por me possibilitar ser aluno de pós graduação e pelos diversos ensinamentos prestados sobre ciência.

À Professora Marcelle Reesink Cerski pela parceria científica firmada já há algum tempo e principalmente pela sua amizade, incentivo e tranquilidade.

À técnica Flávia Giusti do Centro de Pesquisa Experimental do HCPA pela confecção das lâminas.

À estatística Ceres Oliveira pelas horas dedicadas para esta dissertação.

À Mônica Pinheiro pela paciência, compreensão e incentivo.

Às chefias do Serviço de Patologia e Unidade de Necropsia do HCPA pelo apoio para elaboração dessa tese.

Às secretárias do curso, pela presteza.

Aos professores dos programas de pós graduação, por todos os ensinamentos.

A todos colegas do Programa de Pós Graduação: Ciências em Gastroenterologia da UFRGS.

Aos meus pais, eles são fundamentais em tudo.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	11
LISTA DE QUADROS.....	12
Resumo.....	13
Abstract.....	14
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Histórico.....	17
2.2 Epidemiologia.....	18
2.3 Localização.....	18
2.4 Aspectos clínicos.....	19
2.5 Diagnóstico.....	20
2.6 Mutações c-kit e PDGFRA.....	22
2.7 Categorias de risco.....	22
2.8 Marcadores angiogênicos.....	25
2.9 Tratamento.....	28
3 JUSTIFICATIVA.....	29
4 OBJETIVOS.....	29
4.1 Objetivo geral.....	29
4.2 Objetivos específicos.....	29
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
5.1 Amostra.....	30
5.2 Delineamento.....	30

5.3 Critérios de Inclusão.....	30
5.4 Critérios de exclusão.....	30
5.5 Procedimentos.....	30
5.5.1 Seleção de casos.....	30
5.5.2 Diagnóstico histológico.....	31
5.5.3 Dados clínicos do seguimento.....	31
5.5.4 Categorias de risco.....	32
5.5.5 Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).....	32
5.5.6 Avaliação da densidade microvascular (DMV).....	33
5.6 Análise Estatística.....	34
5.7 Considerações éticas.....	35
6 RESULTADOS.....	35
6.1 Características da amostra.....	35
6.2 Aspectos clínicos.....	36
6.3 Tipo histológico.....	37
6.4 Tamanho tumoral, índice mitótico e categorias de risco (NIH).....	37
6.5 Aspectos imunoistoquímicos.....	38
6.5.1 Marcadores imunoistoquímicos diagnósticos.....	38
6.5.2 Marcadores angiogênicos.....	39
6.6 Curva de sobrevida.....	41
7 DISCUSSÃO.....	42
8 CONCLUSÕES.....	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

ANEXO

Banco de dados

Artigo científico

LISTA DE ABREVIATURAS

alfa IFN – Interferon alfa

bFGF – Fator de crescimento fibroblástico básico

CD31 – *cluster* de diferenciação molecular 31

CD34 - *cluster* de diferenciação molecular 34

CD117 - *cluster* de diferenciação molecular 117

CIC – Células intersticiais de Cajal

CEP – Comitê de Ética e Pesquisa

CGA - Campos de grande aumento

DOG1.1 – Discovered On GISTSS

DMV – Densidade Microvascular

FIPE – Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos

GISTs – Tumores estromais gastrintestinais

GISTs- T1 - Linhagem tumoral T1 de GISTs

HE - Hematoxilina-eosina

HIF-1 – Fator 1 induzido por hipóxia.

IHQ – Imunoistoquímica.

IL 10 – Interleucina 10

MVD – Densidade Microvascular

NIH – National Institutes of Health

NCCN – National Comprehensive Cancer Network

PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas.

PDGFRA – Receptor alfa do fator de crescimento derivado de plaquetas.

PF 4 – Fator plaquetário 4

SAMIS - Serviço de Arquivo Médico Informação e Saúde

SCF – Fator de célula tronco.

SPSS – *Statistical Package for the Social Sciences*

TGF alfa – Fator alfa de transformação de crescimento

TGF beta – Fator beta de transformação de crescimento

TNF alfa – Fator alfa de necrose tumoral

TNF beta – Fator beta de necrose tumoral

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular.

VEGFR – Receptor do fator de crescimento endotelial vascular .

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma da seleção da amostra (página 36)

Figura 2 – GIST padrão fusocelular em HE aumento de 100X (página 37)

Figura 3 – VEGF aumento de 100X (página 40)

Figura 4 – CD31 aumento de 100X (página 41)

Figura 5 - Curva de sobrevida em relação à densidade microvascular (DMV)
(página 42)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – GIST: contagem mitótica, tamanho do tumor e categoria de risco (página 38)

Tabela 2 – Marcadores Imunoistoquímicos diagnósticos (página 39)

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Potencial de malignidade do tumor estromal (página 23)

Quadro 2 - Tamanho do tumor e atividade mitótica como indicadores de malignidade nos GISTs (página 23)

Quadro 3 - Risco de progressão da doença em GISTs de acordo com índice mitótico, tamanho e sítio primário da neoplasia (página 24)

Resumo:

Introdução: Tumores estromais gastrintestinais (GISTs) perfazem cerca de 70% dos tumores mesenquimais do trato gastrintestinal. Têm uma incidência de 1 a 2/100.000/ano sendo a forma esporádica observada em adultos, a mais comum. Para o diagnóstico definitivo de GIST é necessária a confirmação imunoistoquímica, sendo 90 a 95% dos casos positivos para o marcador CD117. Os GISTs apresentam comportamento biológico incerto e a classificação em categorias de risco (tamanho tumoral e índice mitótico – NIH) tem sido validada em inúmeras séries. Fatores angiogênicos como a DMV (densidade microvascular) e VEGF (fator de crescimento vascular endotelial) tem importância fundamental no crescimento e na progressão tumoral em algumas neoplasias e o seu significado nos GISTs ainda não está estabelecido.

Objetivo: relacionar a expressão da densidade microvascular (DMV) e do marcador angiogênico VEGF com a curva de sobrevida dos pacientes portadores de GISTs.

Material e Métodos: foram selecionados 79 casos diagnosticados como GIST, do Serviço de Patologia do Hospital de Clínica de Porto Alegre, no período de janeiro de 1.993 a dezembro de 2.009. Realizada a técnica da imunoistoquímica para avaliação do VEGF e do CD31 para avaliação da DMV. Os “hot spots” foram identificados em cada caso e a DMV avaliada através do método Chalkley computadorizado.

Resultados: dos 79 casos, 14 foram obtidos através de biópsias e 65 de peças cirúrgicas. Todos os casos foram diagnosticados como GISTs esporádicos sendo 42 casos do sexo masculino e 37 do sexo feminino, com uma média de idade de 58,9 anos. A localização gástrica foi a mais frequente (45,6%) seguida pelo intestino delgado (38,0%). O tipo histológico predominante foi o fusocelular presente em 72,2% dos casos. GISTs classificados na categoria de risco muito baixo foram 15,4%, baixo risco 13,8%, risco intermediário 23,1% e alto risco 47,7%. Todos os casos apresentaram positividade para o VEGF, sendo que 27,8% foram considerados fracos positivos e 72,2% forte positivos. Na avaliação da DMV, 67 casos 84,8% apresentaram uma média de menos de 6 vasos marcados com CD31 e 15,2% apresentaram uma média de mais de seis vasos marcados. Houve diferença estatisticamente significativa na sobrevida de pacientes com DMV \leq 6 vasos (média=11,2; IC 95%: 10,1 a 12,4) com os DMV \geq 6 vasos (média=2,4, IC 95%: 1,67 a 3,17), com P=0,001.

Conclusões: 79 casos de GISTs diagnosticados no HCPA foram caracterizados do ponto de vista angiogênico. Houve associação da DMV com a sobrevida dos pacientes. O VEGF e a DMV não apresenta associação significativa com sexo, faixa etária, tipo histológico, categoria de risco, localização e metástases.

Abstract:

Introduction: Gastrointestinal stromal tumors (GISTs) are the most common mesenchymal tumors of the gastrointestinal tract, representing 70% of these neoplasias, having an annual incidence of 1 to 2/100.000. They are mostly sporadic and occurring mainly in adults. GISTs are tumors of relative unknown behavior and a score of risk stratification was developed based on two criteria: maximum tumor size and mitotic index according to the National Institutes of Health (NIH) consensus, validated by several authors. Angiogenic factors such as the MVD (microvessel density) and VEGF (vascular endothelial growth factor) may play an important role in growth and tumor progression, and its significance in GISTs remains unclear.

Objective: to study the MVD and VEGF expression in GISTs and its correlation with the survival rate of these patients.

Material and Methods: 79 cases of GISTs were diagnosed by the Pathology Service at the HCPA (Hospital de Clínicas de Porto Alegre) from January 1993 to December 2009 and submitted to immunohistochemical analysis for VEGF and CD31. For the MVD study, "hot spots" (CD31 positive vessels) were initially identified and the MVD evaluated by computational Chalkley method.

Results: out of 79 GISTs, 14 cases were achieved from biopsies and 65 from surgical resections. All cases were diagnosed as sporadic GISTs, 42 male and 37 female with an average age of 58,9 years. GISTs were predominately located in the stomach (45,6%) followed by the small intestine (38,0%). Spindle cell morphology was present in 72, 2% of these tumors. According to the NIH classification, 15,4% GIST were classified as very low risk category, 13,8% low risk category, 23,1% intermediate risk category and 47,7% belonged to the high risk category. VEGF expression was seen all cases, 27, 8% were considered weakly positive and 72, 2% strongly positive. 67(84, 8%) GISTs showed an average of less than six vessels stained by CD31 (MVD) and 15, 2% GISTs an average of more than six vessels stained by CD31. A statistically significant difference was observed between the survival rate of patients having GISTs and the MVD: ≤ 6 vessels (mean=2,4, CI 95%: 1,67 a 3,17) and ≥ 6 vessels (mean=2,4, CI 95%: 1,67 a 3,17), $p=0,001$.

Conclusions: 79 cases of GISTs diagnosed at the HCPA were studied for angiogenic factors. There was a statistically significant difference between MVD and the survival rate for these patients. No association for VEGF and MVD was seen when related to sex, age, histological type, risk category, location and metastasis.

1 INTRODUÇÃO

Tumores estromais do trato gastrointestinal (GISTs) são tumores conhecidos por diferentes terminologias e agrupados, mais recentemente, sob esta denominação. Cerca de 80% das neoplasias mesenquimais do trato gastrintestinal são GISTs, e estes representam de 1% a 4% de todos os tumores gástricos, 14% dos tumores de intestino delgado e 0,1% dos tumores colônicos(1,10-13).

Estudos recentes sugerem que a sua origem está relacionada à célula de Cajal ou a uma célula em comum mais primitiva. A célula de Cajal é a célula marca passo do trato gastrintestinal, responsável pela coordenação da sua motilidade (2-4).

GISTs têm uma incidência estimada de 14,5 casos por 1 milhão de habitantes e ocorrem principalmente em pacientes adultos entre 40 e 80 anos de idade (média de 60 anos)(1,12-13). A forma esporádica é sua apresentação mais comum, embora raros casos possam ser familiares (4-5). Não existe uma predominância importante em relação ao sexo, mas alguns países mostram uma discreta prevalência pelo sexo masculino (11). A localização gástrica é a mais frequente, compreendendo cerca de 50% a 70% dos casos. A seguir, aparecem os casos localizados no intestino delgado (20% a 25%), esôfago, cólon e reto (10%). GISTs são pouco frequentes em omento, mesentério, apêndice cecal e retroperitônio (1,9,16-19).

A sintomatologia depende do tamanho, da localização e do comportamento biológico da neoplasia. Os principais sintomas são: sangramento, alterações da motilidade do trato gastrintestinal e, menos frequentes, quadros obstrutivos. Sua via de metástase mais comum é hematogênica, sendo o fígado e peritônio os sítios mais acometidos. Os linfonodos regionais geralmente não estão comprometidos. O tratamento indicado é o cirúrgico, com remoção completa da

lesão e margens cirúrgicas livres, já que os GISTs não respondem bem à radioterapia ou à quimioterapia convencional. A recorrência esperada ocorre de 29% a 54% dos casos (9,11).

Uma característica dos GISTs é apresentar um comportamento biológico incerto. Lesões pequenas e primárias com menos de 2,0 cm de diâmetro e com baixo índice mitótico podem eventualmente evoluir de forma agressiva (1,9-11). Muitos autores como Fletcher e colaboradores, relacionaram o tamanho da lesão e a contagem mitótica à agressividade da neoplasia (44). Em 2002, o *National Institutes of Health (NIH)* passou a usar estes dois fatores para classificar GISTs em categorias de risco que serão descritas mais adiante. A localização também parece influenciar no comportamento biológico destas lesões. GISTs do intestino delgado podem ser malignos em mais de 40% dos casos (26).

Atualmente, o diagnóstico de GIST é sugerido em exame anatomopatológico convencional e confirmado por imunoistoquímica. Macroscopicamente, são lesões geralmente nodulares, únicas, não encapsuladas e bem definidas. Na histologia, 70% dos casos apresentam células de aspecto fusocelular, 20% de aspecto epitelióide e 10% podem apresentar os dois componentes celulares (26,27).

Na imunoistoquímica, de 90% a 95% dos GISTs são positivos para a proteína KIT (CD117), com marcada positividade citoplasmática ou em área correspondente à zona de Golgi (1,44). Outro marcador de interesse diagnóstico é o CD34, também presentes em células precursoras hematopoiéticas, positivo em 60% a 70% dos casos. A actina pode ser focalmente positiva em até 40% dos casos. Raramente essas neoplasias são positivas para a proteína S100 (menos de 5%) ou desmina (menos de 2%) (3-4). Em 2006, os marcadores imunoistoquímicos recomendados por um grupo multidisciplinar internacional de estudos em GISTs foram: CD117, CD34, vimentina, actina, proteína S100 e desmina (1). A realização do painel imunoistoquímico recomendado pode ainda

esclarecer dúvidas em relação aos principais diagnósticos diferenciais: leiomiomas, leiomiossarcomas, tumores desmóides, fibromatoses e schwannomas (37).

A angiogênese em GISTs pode ter grande importância no crescimento e progressão. Inamura *et al* em trabalho realizado em 2006 associou o aumento da expressão de marcadores angiogênicos em neoplasias mais agressivas (57). A atividade angiogênica pode ser avaliada através de fatores angiogênicos como a Densidade Microvascular (DMV) e o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) e ter um importante papel na resposta ao tratamento quimioterápico e radioterápico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico

Neoplasias estromais do trato gastrointestinal foram classificados durante várias décadas como provenientes da musculatura lisa da parede gastrointestinal e denominados, na sua grande maioria, como leiomiomas, leiomiossarcomas ou leiomioblastomas. No final dos anos 60, com o advento da microscopia eletrônica, sua origem em tecido muscular foi questionada, pois poucas neoplasias apresentaram características ultra-estruturais de fibra muscular lisa (1). Na década de 80, com a difusão da técnica da imunohistoquímica, verificou-se que esses tumores estromais raramente apresentavam positividade para marcadores de tecido muscular liso. Mazur e Clark em 1983(2), baseados em achados imunohistoquímicos e ultraestruturais, sugeriram terem estas neoplasias origem em células do plexo mioentérico, provavelmente nas células intersticiais de Cajal (CIC). Estes autores propuseram a utilização de uma terminologia mais geral: tumor estromal do trato gastrointestinal (GIST). Em 1994, o CD 34, marcador imunohistoquímico hematopoiético, se mostrou extremamente útil para a identificação de GISTs apresentando alta sensibilidade. A hipótese de que os

GISTs teriam sua origem relacionadas às CIC, células marca-passo do plexo mioentérico, se fortaleceu, uma vez que estas são também fortemente positivas para o CD 34 (3,4). Em 1998, Hirota e cols. identificaram o CD 117, proteína KIT, como marcador diagnóstico universal para os GISTs, com uma sensibilidade de 94% em uma série de 49 casos. Nesta mesma série, cinco entre seis casos analisados apresentaram mutações para o gene c-kit (5). Heinrich e cols. em 2003 encontraram mutações no receptor alfa do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFRA) em alguns casos de GISTs (6). Atualmente, este conjunto de marcadores imunistoquímicos (CD 117 e CD 34) e moleculares (c-kit e PDGFRA) são os mais estudados em GISTs(7,8,9).

2.2 Epidemiologia

Estima-se que os GISTs correspondam a 0,2% dos tumores do trato gastrointestinal, com um montante de 5.000 novos casos por ano nos Estados Unidos e 20.000 novos casos anuais em todo o mundo (10). Segundo estudos de Nilsson *et al* (11) GISTs têm uma incidência estimada de 14,5 casos por 1 milhão de habitantes, e uma prevalência de 129 casos por 1 milhão de habitantes. Steigen e cols. observaram uma incidência maior de GISTs em países nórdicos, de 19 casos por milhão de habitantes (12,13).

Embora relativamente raro, os GISTs representam 80% dos tumores mesenquimais do trato digestivo (14). Ocorrem predominantemente, entre 40 e 80 anos, sendo a média em torno dos 60 anos. Sua ocorrência em idades extremas é muito rara. Alguns estudos mostram uma leve predominância em indivíduos do gênero masculino (14,15).

2.3 Localização

Já em 1965, Skandalakis & Gray, em um estudo multicêntrico, avaliaram 2.507 casos de neoplasias estromais do trato gastrintestinal, analisando sua distribuição topográfica e encontrando a proporção de 15% de lesões no esôfago, 45% no estômago, 30% no intestino delgado e 10% no cólon e reto. Assim, observa-se que o estômago e o intestino delgado são responsáveis por 75% dos tumores estromais do trato gastrintestinal, sendo o estômago o sítio mais frequente. Por outro lado GISTs representam apenas 1 a 4% de todas as neoplasias gástricas (16,17,18,19).

Liegl e Fletcher em 2010 (68) verificaram que o local mais comum é o estômago (60%), seguido por jejuno e íleo (30%), duodeno (5%) e reto (4%). Os GISTs são mais raramente encontrados no esôfago e apêndice(46)

A distribuição topográfica dos tumores estromais no estômago se dá de forma diferente da observada nos adenocarcinomas, em que se observa um predomínio das lesões no terço distal. Os GISTs gástricos têm uma localização predominantemente em terço médio, seguido do terço proximal e menos frequentemente comprometem o terço distal (16,20,21,22,23,24).

GISTs no intestino delgado têm uma localização preferencial em jejuno e íleo (25).

2.4 Aspectos clínicos

A sintomatologia depende do tamanho, localização e comportamento biológico da neoplasia. Aproximadamente 70% dos casos de GISTs apresentam sintomas clínicos, 10 a 20% são assintomáticos e 10 a 20% relacionados a achados incidentais (26). Entre 15 a 47% dos casos apresentam doença metastática no momento do diagnóstico (12,27,28,29).

GISTs são neoplasias essencialmente intra-abdominais, tendo como achados clínicos principais: fadiga relacionada à anemia, saciedade precoce e flatulência. Lesões com ulcerações da mucosa podem se manifestar por

sangramento (hematêmese, melena, enterorragia, anemia crônica normocítica ou hipocrômica). Uma minoria de GISTs, geralmente tumores maiores, podem ser palpados ou apresentar um quadro obstrutivo (28,29).

O diagnóstico por imagem pode ser feito através de tomografia computadorizada, ressonância magnética ou tomografia de emissão de pósitrons (29). Exames endoscópicos podem ser de ajuda diagnóstica assim como também a punção aspirativa (30,31)

O tratamento indicado é essencialmente cirúrgico, com remoção completa da lesão e margens cirúrgicas livres. A recorrência esperada é de 29 a 54% (14,25,32). As metástases mais frequentemente se localizam no fígado e peritônio, sem acometimento de linfonodos regionais. Metástases pulmonares, ósseas e em partes moles são menos frequentes e ocorrem em situações mais tardias. A maioria das metástases ocorre nos primeiros cinco anos após ressecção cirúrgica, mas existem relatos da presença de metástases após 20 anos do diagnóstico inicial de GIST. Portanto, um acompanhamento clínico por longos períodos de tempo está indicado, uma vez que lesões consideradas inicialmente benignas podem evoluir por anos a apresentar, posteriormente, um comportamento biológico mais agressivo (9,28).

2.5 Diagnóstico

O diagnóstico é realizado através do exame anatomopatológico e confirmado pelo estudo IHQ das lesões. (33). Na hematoxilina-eosina (HE) os GISTs apresentam três tipos morfológicos: fusocelular (70% dos casos), epitelióide (20%), e os 10% restantes apresentam um padrão misto (fusocelular e epitelióide)(25).

O principal marcador diagnóstico IHQ é o CD 117, que expressa a proteína KIT, positivo em 95% dos GISTs. A proteína KIT é um receptor tirosina quinase

da membrana celular codificada pelo proto-oncogene c-kit, localizado no cromossomo 4 (4q11-12). A proteína KIT atua como fator regulador do crescimento celular ou formador de colônia, essencial no desenvolvimento de melanócitos, eritrócitos, mastócitos, células germinativas e da célula intersticial de Cajal (34,35).

GISTs também apresentam grande sensibilidade para o marcador CD 34, sendo positivo em até 60 a 70% dos casos. O antígeno CD 34 é uma glicoproteína da superfície celular presente em células precursoras do tecido mielóide e linfóide da medula óssea (5,35).

A actina, a proteína S100 e a desmina são os principais marcadores de diagnóstico diferencial em GISTs. Podem apresentar positividade focal em até 40% para actina, 10% para a proteína S100 e menos de 5% para a desmina (36,37,38,40,47,48).

Os principais diagnósticos diferenciais do trato gastrointestinal em relação aos GISTs são: leiomiomas, leiomiossarcomas, schwannomas, tumores fibrosos solitários, pólipos inflamatórios gástricos e tumores desmóides. (38)

Alguns autores atestam que uma neoplasia para ser classificada como GIST, deve, obrigatoriamente expressar o CD 117, tornando assim, obrigatória a sua realização para o diagnóstico de certeza (31). Recentemente, Miettinen e cols.(38) publicaram um estudo comparando a sensibilidade do marcador CD 117 com a do marcador Discovered On GISTs (DOG 1.1) e encontraram percentuais semelhantes 94,4% e 94,7%, sendo a resposta ao DOG1.1 superior em GISTs gástricos epitelióides com mutação PDGFRA(39). Liegl, em 2009, concluiu que o DOG1.1 poderá ter um importante papel diagnóstico, especialmente em GISTs negativos para o CD 117 (68).

2.6 Mutações do gene c-kit e do gene PDGFRA (receptor alfa derivado do fator de crescimento plaquetário)

Evidências mostram que mutações puntiformes em c-kit são eventos principais na oncogênese dos GISTs, ocorrendo em estágios precoces do seu desenvolvimento (41,42,49). GISTs apresentam mutações em cerca de 80 a 90% dos casos. Sendo que, 80% ocorrem no gene c-kit: 70% no éxon 11 e 5 a 10% no éxon 9. O percentual de mutações presentes no PDGFRA é bem menor, 5 a 10% dos casos, e ocorrem predominantemente nos éxons 18 e 12. Cerca de 10% dos casos, não apresentam as mutações comumente observadas nos genes c-kit e no gene PDGFRA, são conhecidos como GISTs do tipo selvagem, *wild type*. As mutações para o gene c-Kit e PDGFRA são excludentes (25).

Essas diferenças mutacionais possuem importância clínica e terapêutica. Há evidências de que tumores com mutações localizadas na região regulatória do éxon 11 do gene sejam mais sensíveis ao STI 571 (mesilato de imatinibe) (41,42).

2.7 Categorias de risco

Enquanto o comportamento biológico da maioria das neoplasias humanas pode ser caracterizado como benigno e maligno baseado em suas características histológicas (atipia e pleomorfismo nuclear, perda de maturação, invasão de parede, dentre outros), para os GISTs isso não é verdadeiro, coloca-se, assim, a necessidade de estudar outras variáveis: o número de figuras de mitose por 50 campos de grande aumento (CGA), tamanho do tumor, necrose tumoral, ploidia do DNA e a profundidade da lesão (35,43). Tumores maiores do que 5,0 cm têm um prognóstico reservado, enquanto que lesões menores do que 5,0 cm apresentam melhor evolução, com melhores índices de sobrevivência em cinco anos(24).

Em 2002 Fletcher *et al.* (44) criaram um sistema para avaliar a categoria de risco dos GISTs, levando em consideração o tamanho da neoplasia e o número de mitoses por 50 CGA (Quadro 1). Nesse mesmo ano, o National Institutes of Health (NIH) aprovou o uso destas duas variáveis para classificar os GISTs em

categorias de risco. Esta classificação é também conhecida por NIH *Risk Stratification Categories*.

Quadro 1 - Potencial de malignidade do tumor estromal		
	Tamanho	Índice mitótico
RISCO MUITO BAIXO	< 2,0 cm	<5/50 CGA
RISCO BAIXO	2,0 – 5,0 cm	<5/50 CGA
RISCO INTERMEDIÁRIO	<5,0 cm	6-10/CGA
	5,0 – 10,0 CM	<5/50 CGA
RISCO ALTO	>5,0 cm	>5/50 CGA
	>10,0 cm	qualquer índice
	qualquer tamanho	>10/50 CGA

(Modificado de Fletcher *et al*, 2002)

A localização do tumor também apresenta influência nos parâmetros preditivos. Em geral, como descrito por Miettinen *et al* (26), os limiares de diâmetro para os tumores intestinais tendem a ser menores do que para os tumores gástricos (Quadro 2).

Quadro 2 – Tamanho do tumor e atividade mitótica como indicadores de malignidade nos GISTs
<p><u>Provavelmente benignos</u></p> <p>Intestinais: diâmetro máximo $\leq 2,0$ cm e contagem mitótica ≤ 5 mitoses/50 CGA</p> <p>Gástricos: diâmetro máximo $\leq 5,0$ cm e contagem mitótica ≤ 5 mitoses/50 CGA</p>
<p><u>Provavelmente malignos</u></p> <p>Intestinais: diâmetro máximo $> 5,0$ cm ou contagem mitótica > 5 mitoses/50 CGA</p> <p>Gástricos: diâmetro máximo $> 10,0$ cm ou contagem mitótica > 5 mitoses/50 CGA</p>
<p><u>Comportamento incerto ou baixo potencial de malignidade</u></p> <p>Intestinais: diâmetro máximo $> 2,0$ cm e $\leq 5,0$ cm e contagem mitótica ≤ 5 mitoses/50 CGA</p> <p>Gástricos: diâmetro máximo $> 5,0$ cm e $\leq 10,0$ cm e contagem mitótica ≤ 5 mitoses/50 CGA</p>

(Modificado de Miettinen *et al*, 2002)

Trabalhos mais recentes basearam a classificação dos GISTs em relação ao risco de progressão de doença, localização, índice mitótico e tamanho tumoral (9,38,45,46,47)(Quadro 3).

Quadro 3 – Risco de progressão da doença em GISTs de acordo com índice mitótico, tamanho e sítio primário da neoplasia					
Parâmetros Tumoriais		Risco de Progressão da Doença (%)			
	Tamanho	Gástrico	Duodeno	Jejuno/Íleo	Reto
	≤ 2 cm	0	0	0	0
Índice Mitótico	> 2 ≤ 5 cm	Muito baixo (1,9)	Baixo (8,3)	Baixo (4,3)	Baixo (8,5)
≤ 5 por 50 CGA	> 5 ≤ 10 cm	Baixo (3,6)	Dados Insuficientes	Moderado (24)	Dados Insuficientes
	> 10 cm	Moderado (10)	Alto (34)	Alto (52)	Alto (57)
	≤ 2 cm	0	Dados Insuficientes	Alto	Alto (54)
Índice Mitótico	> 2 ≤ 5 cm	Moderado (16)	Alto (50)	Alto (73)	Alto (52)
> 5 por 50 CGA	> 5 ≤ 10 cm	Alto (55)	Dados Insuficientes	Alto (85)	Dados Insuficientes
	> 10 cm	Alto (86)	Alto (86)	Alto (90)	Alto (71)

(LiegI, 2009)

Contudo as classificações iniciais de Fletcher e de Miettinen são as mais utilizadas em diferentes séries de GISTs e validadas como importante fator prognóstico (9,26,38,44,45,46,47).

2.8 Marcadores angiogênicos

Angiogênese é definida como a formação de novos vasos sanguíneos a partir da vascularização pré-existente (93), sendo um evento essencial para o desenvolvimento normal e a homeostase dos tecidos. Em condições fisiológicas atua na embriogênese, no desenvolvimento tecidual, na ovulação, na formação do corpo lúteo e no processo de cicatrização (94-95). A angiogênese patológica, por sua vez, ocorre em uma variedade de transtornos, sejam eles caracterizados por neovascularização, como observado na retinopatia proliferativa, regeneração macular relacionada com a idade, artrite reumatóide, psoríase, *diabetes mellitus*, crescimento tumoral e disseminação metastática (96-97). A angiogênese contribuiria para o processo metastático facilitando o desprendimento das células neoplásicas no interior dos vasos sanguíneos neoformados. Em contraste com o processo ordenado, regulado e autolimitado, a angiogênese patológica é um processo onde a multiplicação vascular ocorre de modo descontrolado e contínuo (98). A angiogênese constitui um importante mecanismo no desenvolvimento tumoral, sendo responsável pelo aporte nutricional às células neoplásicas em proliferação e estabelecendo condições favoráveis para a disseminação metastática (99-100).

Várias moléculas estimuladoras da angiogênese já foram caracterizadas, entre elas o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), fatores de crescimento à heparina, fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fatores de necrose tumoral (TNF alfa e TNF beta), o fator de transformação de crescimento (TGF alfa) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (101-104).

O estímulo angiogênico é acompanhado da supressão dos inibidores locais de angiogênese, denominados de fatores anti-angiogênicos, que protegem o endotélio vascular do estímulo proliferativo. Vários são esses fatores já descritos:

fator plaquetário 4 (PF4), fator de transformação de crescimento (TGF-beta), interferon alfa (alfa-IFN), endostatina, interleucina 10 (IL 10), entre outros (95).

Dentre todos os fatores envolvidos na angiogênese, o VEGF desempenha um papel essencial tanto nos processos fisiológicos como patológicos.

O VEGF atua através de sua ligação a receptores específicos tirosina quinase, promovendo uma cascata de eventos intracelulares, que incluem a proliferação, invasão e atividade quimiotática endotelial. Recentemente, estudos baseados no mecanismo molecular dessas vias de ativação e inativação dos fatores de crescimento tumoral, que utilizam receptores do tipo tirosina quinase têm demonstrado uma promissora possibilidade terapêutica (54,55).

Quanto ao estudo de novos e mais precisos marcadores angiogênicos, ajuda-nos o entendimento da farmacologia das drogas inibidoras de receptores de tirosina quinase, especialmente os mais usados no tratamento clínico de GISTs: o mesilato de imatinibe e o maleato de sunitinibe. Não ocorrendo a sinalização por inibição dos receptores de tirosina quinase, cessa o estímulo mitótico e a massa neoplásica estabiliza-se ou diminui de tamanho. O tratamento com imatinibe nesses pacientes aumenta a concentração plasmática de SCF (*stem cell factor*, ligante do KIT, presente em condições não neoplásicas) e diminui a de KIT solúvel (aumentado em cerca de duas vezes em pacientes com GISTs). Nesse grupo de pacientes, o VEGF (*vascular endothelial growth factor*), intimamente ligado à angiogênese tumoral, diminui ao longo do tratamento. Em ensaio *in vitro* realizado com células tumorais da linhagem GISTs-T1, o mesmo imatinibe suprime tanto a transcrição quanto a tradução do VEGF dosado no meio intracitoplasmático de modo dependente à dose (50,51).

O sunitinibe tem-se mostrado útil no tratamento de GISTs, sobretudo por ter uma afinidade maior para receptores de VEGF, agindo, basicamente, de modo a impedir a neoangiogênese tumoral (52). Usado por administração sistêmica,

diminui a concentração plasmática de receptores solúvel de VEGF. O VEGF atua principalmente através do VEGFR-2 (receptor 2 do VEGF) presente em níveis elevados nas células endoteliais (53,54,55). A diminuição da concentração de VEGFR solúveis parece se relacionar com a resposta ao tratamento em pacientes com carcinoma de células renais (54). Um aumento do VEGF plasmático e do VEGF expresso pelas próprias células tumorais podem estar relacionados à angiogênese, à progressão e à agressividade tumoral (55,56). Um aumento da expressão de VEGF em GISTs pode ser um fator preditor independente de mortalidade em 10 anos (57).

Através da quantidade de estruturas marcadas com o anti-CD 31 pode se observar a densidade microvascular através dos neovasos da lesão tumoral(59). A densidade microvascular (DMV) é dada pela contagem de vasos por campo. Para auxiliar esta análise, pode-se utilizar a técnica de Chalkley e imagem computadorizada(72).

De acordo com Hansen e cols. (2000)(69) a técnica de Chalkley é consenso para prognósticos em tumores de mama. Na mesma linha, Rocha e cols. (2009)(70) verificaram uma associação entre a DMV e a curva de sobrevida através da utilização da técnica de Chalkley para contagem de vasos em carcinomas de vesícula biliar.

Outros autores como Birlik et al. (2006)(71), demonstraram que a DMV apurada pelo método de Chalkley, correlacionam-se significativamente com uma menor sobrevida pós operatória por análise univariada em astrocitomas adultos.

A revisão referida nas bases bibliográficas não identificou estudo da angiogênese em tumores GISTs através da técnica de Chalkley.

2.9 Tratamento

A ressecção cirúrgica completa com margens livres é o tratamento padrão para GISTs, pois é a única modalidade capaz de proporcionar a cura. A ressecção R0 (ausência de doença residual) representa uma das influências mais importantes para o resultado do tratamento (intervalo livre de doença e sobrevida), sendo alcançada em torno de 40 a 60% dos GISTs(14,61). Em caso de recidivas locais ou de lesões metastáticas, nova cirurgia poderá ser planejada (62). Não há necessidade de dissecação linfonodal, pois assim como os sarcomas do tecido conjuntivo, os GISTs raramente acometem linfonodos disseminando-se usualmente por via hemática (43).

A descoberta de mutações na gênese e progressão dos GISTs permitiu o uso de drogas anti-moleculares específicas para essas neoplasias (63). Um primeiro paciente, com GISTs irressecável e metastático, previamente tratado com quimioterapia convencional, sem sucesso, recebeu o imatinibe. Houve uma resposta marcante, iniciando uma nova era para o tratamento dos GISTs (64). O STI-571 ou mesilato de imatinibe, foi estruturalmente desenvolvido para bloquear a tirosina quinase resultante da mutação t29-22 (Cromossomo Philadelphia) da Leucemia Mielóide Crônica, com impacto marcante no tratamento dessa doença(65) .Em 2002, o imatinibe foi aprovado para o tratamento de GISTs com doença avançada (66).

Mais recentemente novas moléculas, inibidoras da tirosina quinase, tem surgido e entre elas, o sunitinibe mostrou possuir também importante atividade anti-angiogênica, inibindo a ação dos fatores de crescimento do endotélio vascular. O sunitinibe atualmente é indicado em casos de doença avançada refratária ao tratamento com imatinibe ou em casos de intolerância ao mesmo (25,74).

3 JUSTIFICATIVA

A angiogênese tem uma importância fundamental no crescimento e na progressão tumoral. Sua atividade pode ser avaliada através da expressão de fatores angiogênicos como: DMV e VEGF. Vários estudos sugerem que a avaliação angiogênica possa ter um papel importante na resposta ao tratamento quimioterápico e radioterápico. Recentemente um anticorpo monoclonal, o anti-VEGF, foi aprovado para o tratamento de câncer colorretal e câncer de pequenas células de pulmão (53,55,67). Há consideráveis evidências experimentais que indicam que o crescimento tumoral é dependente da angiogênese. Deste modo, após um novo tumor ter obtido um pequeno tamanho de poucos milímetros em diâmetro, seu novo crescimento requer a indução de novos capilares sanguíneos (68). Além disso, a angiogênese tem sido relacionada com a capacidade de metastatização e o prognóstico em neoplasias malignas em diversos sítios anatômicos (77). Portanto é importante o estudo da angiogênese através da DMV e do VEGF em neoplasias estromais do trato gastrintestinal.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

- Relacionar a densidade microvascular (DMV) e expressão do marcador imunoistoquímico VEGF em GISTs com a sobrevida dos pacientes.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1 - Relacionar a densidade microvascular (DMV) de GISTs com sexo, faixa etária, tipo histológico, tamanho do tumor, índice mitótico, metástase, localização e categoria de risco.

2 – Relacionar a expressão imunohistoquímica de VEGF em GISTs com sexo, faixa etária, tipo histológico, tamanho do tumor, índice mitótico, metástase, localização e categoria de risco.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Amostra

Foram utilizadas amostras teciduais de todos os pacientes com diagnóstico de GISTs confirmados por HE e IHQ, obtidas do acervo do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre no período de janeiro de 1993 a dezembro de 2009. O material biológico disponível para esse trabalho consiste de tecido tumoral excisado cirurgicamente e biópsias emblocados em parafina. O número de casos de nossa amostra é de 79.

5.2 Delineamento

Estudo de coorte retrospectivo.

5.3 Critérios de inclusão

Todos os casos de GISTs diagnosticados no Serviço de Patologia do Hospital de Clínica de Porto Alegre (HCPA) no período de 01/01/1993 à 31/12/2009.

5.4 Critérios de exclusão

Ausência ou escassez de material emblocado em parafina.

5.5 Procedimentos

5.5.1 Seleção de casos

O banco de dados foi montado através da revisão de todos os exames anatomopatológico dentro do período do estudo. Todos os casos de neoplasia estromal do trato gastrintestinal diagnosticados por diferentes terminologias como: tumor mesenquimal, tumor de células fusiformes, neoplasia estromal, leiomioma, leiomiossarcoma, neoplasia epitelióide do trato gastrintestinal, tumor desmóide e fibromatoses foram inicialmente selecionados submetidos a um novo exame por HE e um painel imunoistoquímico complementar. Dentro do período do estudo foram confirmados 85 casos de GIST pertencentes ao Serviço de Patologia do HCPA.

5.5.2 Diagnóstico histológico

Foram considerados GISTs e incluídos neste estudo, casos em que a histologia (HE) foi compatível com neoplasia mesenquimal associado à: (1) nítida positividade para CD 117 à imunoistoquímica; ou (2) nítida positividade à imunoistoquímica para o CD 34 com marcadores sistematicamente negativos para HHF35 (actina), proteína S100 e desmina (92).

Os GISTs também foram classificados de acordo com sua morfologia em três subtipos: fusocelular, epitelióide e misto (fusocelular e epitelióide).

5.5.3 Dados clínicos e seguimento

Os dados clínicos foram obtidos a partir dos prontuários disponibilizados pelo SAMIS (Serviço de Arquivo Médico de Informação e Saúde) do HCPA. Para cada caso formam pesquisados os seguintes dados: idade, sexo, data do diagnóstico de GIST, sintomatologia e localização do tumor. Para análise do

seguimento foram registrados os seguintes dados: recorrência local, presença de metástases, localização das mesmas, tratamento com mesilato de imantinibe, data da última consulta, óbito por GIST ou óbito conseqüente de outras causas. O banco de dados se encontra no Anexo I.

O tamanho tumoral considerado foi o maior diâmetro da massa neoplásica e esse dado foi obtido através da descrição macroscópica do laudo anatomopatológico emitido pelo Serviço de Patologia do HCPA.

5.5.4 Categorias de risco

As categorias de risco foram avaliadas levando-se em consideração o tamanho tumoral e a contagem do número de mitoses por 50 CGA corados por HE. A classificação utilizada foi a de Fletcher e cols. 2002, assim dividida: risco muito baixo, baixo risco, risco intermediário e alto risco (44).

5.5.5 Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)

A partir do material emblocado foram realizados cortes histológicos com quatro micrômetros de espessura e realizada a técnica da IHQ para VEGF. Foi utilizado o anticorpo anti-VEGF na diluição de 1:200 proveniente da Santa Cruz Biotechnology .

A técnica da IHQ constam das principais etapas: desparafinização, hidratação, recuperação antigênica (foi realizada por meio da irradiação em forno microondas de uso doméstico durante 20 minutos. Durante essa etapa, as lâminas ficaram submersas em 100 mL de tampão citrato pH 6.0 e logo após o esfriamento do material por 20 minutos foram realizados três lavagens de cinco minutos cada em PBS, sob agitação), bloqueio da peroxidase endógena, bloqueio das reações inespecíficas (foi colocada nas lâminas uma solução de leite em pó desnatado a 10% em PBS por 30 minutos), adição do anticorpo primário, adição

do anticorpo secundário, revelação e contracoloração realizada com a hematoxilina de Harris.

5.5.6 Avaliação da densidade microvascular (DMV)

Para avaliação da DMV foi utilizado a técnica IHQ para anticorpo CD31. A diluição de 1:100 (DAKO, USA) em cortes de quatro micrômetros.

A técnica da IHQ constam das principais etapas: desparafinização, hidratação, recuperação antigênica (foi realizada por meio da irradiação em forno microondas de uso doméstico durante 20 minutos. Durante essa etapa, as lâminas ficaram submersas em 100 mL de tampão citrato pH 6.0 e logo após o esfriamento do material por 20 minutos foram realizados três lavagens de cinco minutos cada em PBS, sob agitação), bloqueio da peroxidase endógena, bloqueio das reações inespecíficas (foi colocada nas lâminas uma solução de leite em pó desnatado a 10% em PBS por 30 minutos), adição do anticorpo primário, adição do anticorpo secundário, revelação e contracoloração realizada com a hematoxilina de Harris.

Em seguida, foi realizado uma busca das áreas mais vascularizadas, os “*hot spots*”. A partir dos “*hot spots*” foi realizado a contagem em 200X dos vasos marcados com o anticorpo CD31 de acordo com a técnica de Chalkley computadorizada (72). Foi colocado uma matriz com 25 pontos sobre a imagem do campo computadorizada através do programa QCapture Pro. A partir dessa matriz foi realizada a contagem dos vasos coincidentes com os pontos. A contagem foi realizada em 10 campos e considerada a média de vasos de cada caso. (59,60).

5.6 Análise Estatística

As variáveis quantitativas para a proporção das células marcadas com o anticorpo anti-VEGF e a densidade microvascular foram analisadas através de média e desvio padrão em caso de distribuição normal. Em caso de assimetria, foram utilizadas mediana e amplitude interquartilica. As variáveis categóricas foram descritas através de frequências absolutas e relativas.

Para relacionar a sobrevida dos pacientes com GIST com os marcadores categorizados por seus respectivos pontos de corte foi aplicado o Teste Qui-quadrado de Log-rank através da estimação das curvas pelo método de Kaplan-Meier.

Para relacionar a densidade microvascular e expressão de VEGF com o tamanho tumoral, contagem mitótica e índice de positividade para o Ki-67 (92) foi aplicada a correlação linear de Pearson, caso seja simétrica a distribuição dessas variáveis admitindo-se um erro alfa de 5%. Em caso de assimetria, foi aplicada a correlação de Spearman. As análises foram realizadas no programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), versão 17,0.

Os exames foram realizados por dois patologistas experientes, individualmente, e pelo pesquisador, e os casos discordantes foram analisados conjuntamente em um microscópio de múltipla observação, chegando os observadores a um diagnóstico consensual.

5.7 Considerações Éticas

Foi assinado termo de compromisso para a utilização de dados dos pacientes e para a utilização de material biológico.

Projeto aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) do HCPA. Número de Registro: 09-248.

O projeto foi financiado pelo FIPE e pelo pesquisador.

6 RESULTADOS

6.1 Características da amostra

Dos 85 casos iniciais de GISTs, seis (7,05%) foram descartados por escassez/ausência de material. Dos 79 casos restantes 17,7% foram obtidos em material de biópsia e em 65 (82,3%) o material foi proveniente de peças cirúrgicas. Entre os 79 pacientes, 42 (53,2%) foram do sexo masculino e 37 (46,8%) do sexo feminino. A média de idade foi de 58,9 anos \pm 13,9 com uma variação entre 17 e 99 anos. O número de pacientes com mais de 60 anos, foi 40 (50,6%). Em nenhum dos nossos casos, durante a revisão dos prontuários, foi registrada a possibilidade de GIST familiar ou GIST associado a uma síndrome genética.

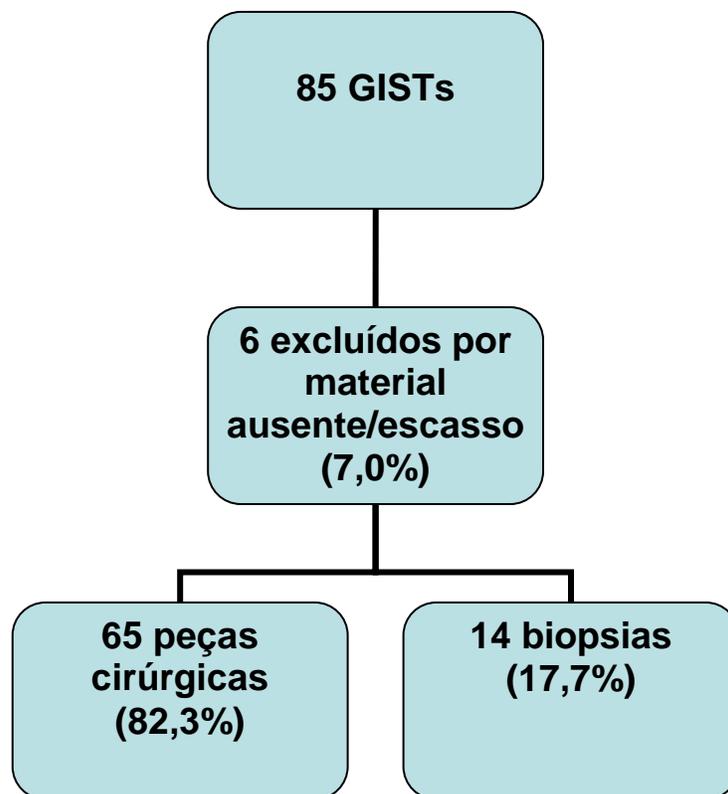


Figura 1 – Fluxograma da seleção da amostra.

6.2 Aspectos clínicos

Todos os casos de GISTs desta série são de pacientes distintos, não havendo a repetição dos mesmos. Os principais sinais e sintomas clínicos foram associados a sangramentos e dor abdominal. Em 11 casos (13,9%), o GIST foi descrito como um achado transoperatório incidental. Trinta e seis (45,6%) dos casos eram gástricos, seguida do intestino delgado, presente em 30 (38,0%) casos, retroperitônio em cinco (6,3%) casos, mesentério em quatro (5,1%) casos e reto e cólon com dois (2,5%) casos em cada uma dessas localizações. Não identificamos nenhum caso de GIST esofágico. Apenas nove (11,4%) casos evoluíram com metástases, tendo como sítios mais frequentes o fígado e a cavidade peritoneal.

6.3 Tipo histológico

O tipo histológico fusocelular foi o mais frequente, observado em 57 (72,2%) dos casos, o misto (fusocelular e epitelióide) identificado em 14 (17,7%) casos e o epitelióide identificado em 8 (10,1%)

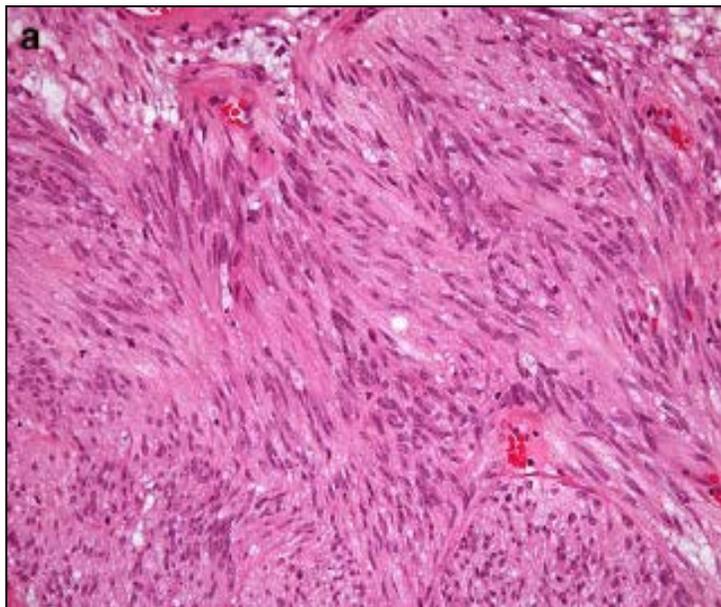


Figura 2: GIST padrão fusocelular (HE 100X)

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

Na avaliação do tamanho tumoral foi considerada a sua maior dimensão, que variou entre 0,5 cm e 25 cm com mediana de 4,8 cm. A contagem do número de mitoses dos 79 casos avaliados em cortes corados pelo método HE mostrou, em 40 (50,6%) casos um valor \leq a 5 mitoses por 50 CGA (tabela 1).

A classificação em categorias de risco nas peças cirúrgicas (n=65), segundo os critérios de Fletcher e cols., mostrou que 10 (15,4%) foram classificados como sendo de risco muito baixo, 9 (13,8%) de baixo risco, 15 (23,1%) de risco intermediário e 31 (47,7%) de alto risco (tabela 1)

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

Características		N
Contagem mitótica		79
≤ 5	40 (50,6%)	
6 – 10	11 (13,9%)	
> 10	28 (35,4%)	
Tamanho do tumor		65
≤ 5	33 (50,8%)	
6 – 10	17 (26,2%)	
> 10	15 (23,1%)	
Categoria de risco		65
Muito baixo	10 (15,4%)	
Baixo	9 (13,8%)	
Intermediário	5 (23,1%)	
Alto	31 (47,7%)	

(Cerski, 2010)

6.5 Aspectos imunoistoquímicos

6.5.1 Marcadores diagnósticos

O principal marcador imunoistoquímico diagnóstico, o CD117, foi positivo em 78 (98,8%) casos, apresentando positividade citoplasmática difusa. Foram considerados fraco-positivos os casos com 5 a 25% das células tumorais marcadas e forte positivos os casos com mais de 25% das suas células tumorais marcadas. Nos casos com positividade menor que 5%, a imunoistoquímica foi repetida para o CD117 e reavaliada antes de classificá-las como negativa. O único caso negativo para o CD117 e incluído no nosso estudo como GIST apresentou um quadro histológico compatível, positividade para o CD34 em mais de 30% das

células tumorais e imunoistoquímica negativa para a proteína S100, desmina e actina. Nos demais casos o CD34 foi positivo em 59 (74,7%) casos. Positividade focal foi observada em 27 (34,2%) casos para a proteína S100, 51 (64,6%) casos para actina e 16 (20,3%) casos para a desmina(92).

Tabela 2 – Marcadores Imunoistoquímicos diagnósticos

Marcadores (positividade)	n=79
	n (%)
Diagnóstico	
CD117	78 (98,8%)
CD34	58 (73,5%)
Actina	51 (64,6%)
Desmina	16 (20,3%)
S100	27 (34,2%)

(Cerski, 2010)

Em casos com menos de 5% das células marcadas, a imunoistoquímica foi repetida antes de considerá-los negativos.

6.5.2 Marcadores angiogênicos

Para o VEGF foram considerados fraco-positivos os casos com 5 a 25% das células tumorais marcadas e forte positivos os casos com mais de 25% das suas células tumorais marcadas. Nos casos com positividade menor que 5%, a imunoistoquímica foi repetida para o VEGF e reavaliada antes de classificá-lo como negativo. Fraco-positivos foram 22 (27,8%) casos e fortes positivos foram 57 (72,2%) casos.

Em nossa série não houve associação do VEGF com sexo, faixa etária, tipo histológico, tamanho do tumor, índice mitótico, metástases, localização, categoria de risco e curva de sobrevida.

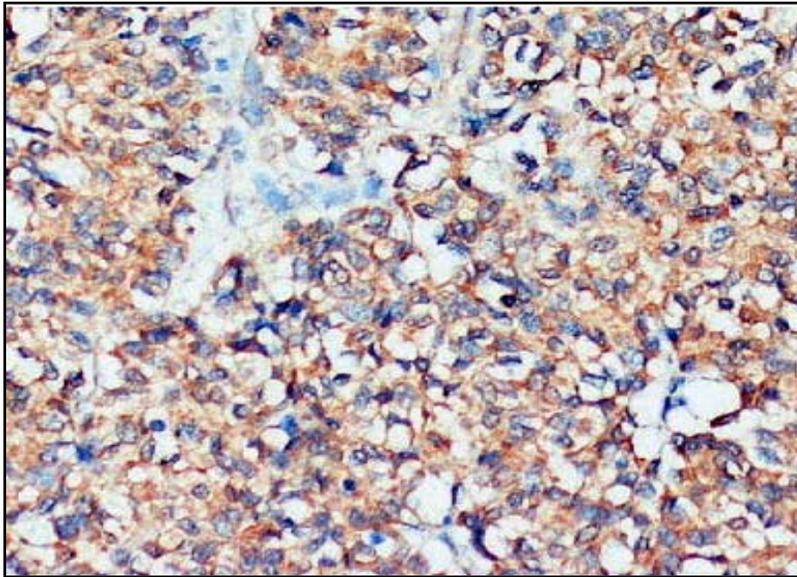


Figura 3: VEGF aumento de 100X

Para a densidade microvascular, nos casos em que não se verificou células endoteliais marcadas pelo CD31, repetiu-se a técnica de imunohistoquímica. A mediana foi de 2,6 (0 – 17,4). 67 (84,8%) casos apresentaram menos de 6 vasos marcados com o CD31 na média das contagens e 12 (15,2%) casos apresentaram mais de 6 vasos marcados com o CD31 na média das contagens.

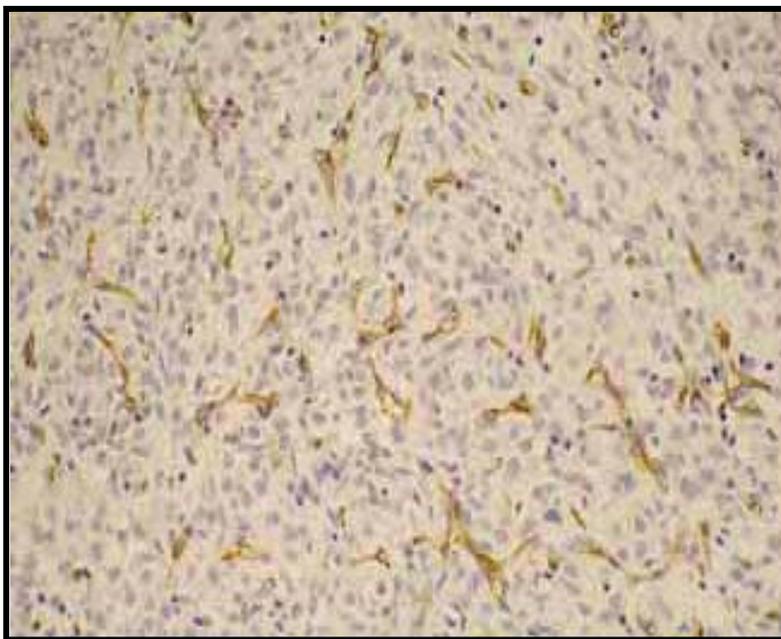


Figura 4: CD31 aumento 100X

Na série estudada não houve associação da densidade microvascular com sexo, faixa etária, tipo histológico, tamanho do tumor, índice mitótico, metástases, localização, categoria de risco.

6.6 Curva de Sobrevida

A curva mostrou um tempo médio de seguimento de 2,5 anos ($\pm 2,8$) e mediana de 1 ano e meio. O tempo médio de sobrevida foi de 10,3 anos (IC 95%: 8,9 a 11,6%). Dos 12 pacientes com $CD31 \geq 6$, 3 pacientes (25%) foram à óbito e dos 67 com $CD31 \leq 6$, 3 pacientes (4,5%) faleceram, com diferença estatisticamente significativa ($P=0,042$).

Houve diferença estatisticamente significativa na sobrevida de pacientes com $CD31 < 6$ (média=11,2; IC 95%: 10,1 a 12,4) com os $CD31 \geq 6$ (média=2,4; IC 95%: 1,67 a 3,17), com $P=0,001$.

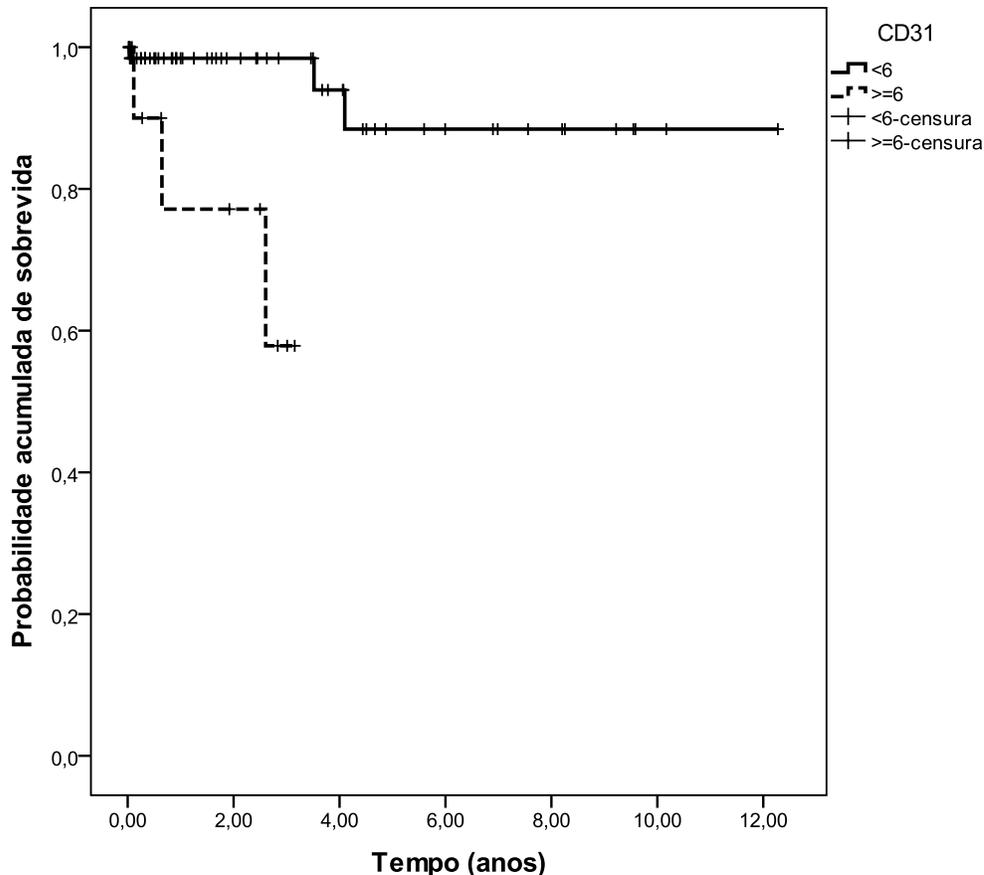


Figura 5: Curva de sobrevivida em relação à densidade microvascular (DMV)

7. DISCUSSÃO

Tumores estromais do trato gastrointestinal têm baixa incidência mas perfazem cerca de 70% dos tumores mesenquimais dessa localização. Para o diagnóstico definitivo se faz necessário além do exame anatomopatológico de rotina, uma complementação imunoistoquímica, principalmente através do marcador CD117. Dos 79 casos analisados, 65 (82,3%) casos foram provenientes de peças cirúrgicas e 14 (17,7%) casos foram provenientes de biópsias realizadas.

Nossa série foi constituída por 42 homens e 37 mulheres, não encontramos uma predominância significativa em relação ao sexo. Já Lopes e cols.(73) em um estudo publicado em 2008 com 513 casos de GIST encontrou uma predominância do sexo feminino nas categorias de baixo risco ou muito baixo risco, achado esse

não observado em nossa série. A média de idade em nosso estudo foi de 58,9 anos \pm 13,9, estando de acordo com a literatura, onde a média de idade é em torno dos 60 anos. Apenas 5 dos nossos pacientes apresentaram idade inferior a 40 anos.

A localização preferencial gástrica seguida da localização no intestino delgado, principalmente jejuno e íleo, tem sido achado frequente na literatura (10-11,41). Em nossa série, 45,6% estavam localizados no estômago e 38% no intestino delgado. O tipo histológico predominante foi o fusocelular presente em 57 (72,2%) casos nesta série, percentual este observado na maioria dos estudos de GIST (10,41,59). Em nossa série, tivemos um percentual um pouco maior de casos com padrão morfológico misto, 14 (17,7%) casos, o que pode estar associado ao fato de termos tido um número maior de GISTs localizados em mesentério e retroperitônio (11,4%), onde o padrão misto acontece com mais frequência (41).

Com relação a classificação nas diferentes categorias de risco, de acordo com o NIH (quadro 1), tivemos um percentual mais elevado de GIST classificados na categoria de alto risco (47,7%) em comparação a outros trabalhos publicados na literatura (1,5,45). Entretanto, Joensuu e cols. em 2006, revendo seis estudos de GIST, todos com uma amostragem superior a 100 casos, observaram um percentual que variou entre 26 a 54,8% para as neoplasias classificadas na categoria de alto risco (média 44%), resultado compatível com nosso estudo (29).

O diagnóstico definitivo destas neoplasias é feito através da realização de um painel imunoistoquímico, onde o principal marcador diagnóstico é o CD117, positivo entre 90 e 95% dos casos. Neste estudo, o CD 117 foi positivo em 78 (98,8%) casos. Um caso negativo foi incluído por ter apresentado aspectos histológicos compatíveis com GIST, além de CD34 positivo em mais de 50% das células examinadas e imunoistoquímica negativa para S100, actina e desmina.

As neoplasias são por definição hipóxicas. (58,59). A hipóxia tecidual pode induzir fatores de crescimento e desequilibrar o processo normal de ajustes entre fatores pró e antiangiogênicos, que se ligam a receptores específicos de células endoteliais, as quais proliferam, migram e transformam-se em vasos capilares. O VEGF é um fator angiogênico potente e específico e é secretado em quase todos os tumores sólidos. (75-76).

Du e cols,(81) em estudo com 59 casos de carcinoma de esôfago e 80 casos de adenocarcinoma gástrico, observaram a expressão do VEGF em 81,3% das amostras esofágicas e 67,5% das gástricas. Maeda e cols(79) associou a expressão do VEGF com a curva de sobrevida.

Inamura e cols em 2007 relacionou a expressão de VEGF com o tempo livre de doença, com diferença estatística entre fraco positivos com os forte positivos, com $P=0,0302$ em GISTs. Essa diferença não foi observada no nosso estudo (57).

Contrariamente a tais resultados, Tanigawa e cols,(83) em estudo com 163 pacientes com câncer gástrico, mostraram que tumores que expressaram mais intensamente o VEGF apresentavam sobrevida e prognóstico melhor. Ikeguchi e cols,(84) em estudo de 97 pacientes com invasão de serosa gástrica porém sem linfonodos comprometidos, demonstraram que os índices de proliferação tumoral e o prognóstico não estavam relacionados com a expressão do VEGF. Da mesma forma, Kido e cols (85) não encontraram relação prognóstica nos pacientes que apresentavam alta expressão da interleucina-8, fator pró angiogênico conhecido no adenocarcinoma gástrico, e à expressão do VEGF. Erenoglu e cols(80) também não associou a expressão forte do VEGF com a curva de sobrevida.

Em nossa série não observamos associação da expressão VEGF com a curva de sobrevida dos pacientes, sexo, idade, categorias de risco, localização e metástases.

A DMV tem sido considerada como um indicador prognóstico em uma variedade de neoplasias humanas e o seu aumento representa correlação com a menor sobrevida global e tempo livre de doença (56). Weidner e *cols* (77) foram os primeiros autores a relatar o valor prognóstico da estimativa da angiogênese e secções histológicas de 49 cânceres primários de mama, *in situ* ou invasivos. Neste estudo, propuseram um método quantitativo simples e reprodutivo para quantificar a DMV através do uso da imunistoquímica em que demonstraram a relação entre a DMV e o risco de desenvolver metástases. A maioria dos investigadores apóia uma correlação inversa entre DMV e prognóstico (77-78,82), porém alguns autores não dão suporte a esta afirmação (Tanaka e *cols*, Offersen e *cols*)(86-87). Amar e *cols* (88) não encontraram diferença significativa na DMV entre carcinomas de língua metastáticos e não metastáticos, enquanto que Shivakumar e *cols* (89) mostraram haver relação significativa somente nos estágios precoces de carcinoma de mama. Yao e *cols* (90) mostraram haver correlação entre a DMV e a sobrevida pós operatória em astrocitomas.

Em estudos com astrocitomas em pacientes adultos, Birilik *et al* demonstrou que a DMV através do método de Chalkley tem correlação significativa com a pior sobrevida pós operatória. Da mesma forma, a faixa etária e histologia de alto grau também tiveram correlação com sobrevida menor. A DMV mostrou ser um indicador independente de prognóstico em astrocitomas adultos (71-77-78).

A DMV determinada por marcadores imunistoquímicos correlaciona-se inversamente com a sobrevida global em pacientes com carcinoma gástrico, mas tem expressões distintas em lesões gástricas benignas(91) . Mineo e *cols* (78) demonstraram que a expressão elevada de DMV é um bom marcador de

angiogênese e está significativamente relacionada a uma taxa de sobrevida menor.

Estudos publicados na literatura (57) apontam diferenças estatisticamente significativas da DMV em relação ao sexo, localização do tumor, tamanho da lesão ($P=0,0399$, $P=0,0422$, $P=0,0006$, respectivamente). A relação forte entre MVD e VEGF é observada em vários trabalhos, porém essas diferenças não foram observadas em nossa série.

Houve diferença estatisticamente significativa na sobrevida de pacientes com $DMV < 6$ (média=11,2; IC 95%: 10,1 a 12,4) com os $DMV \geq 6$ (média=2,4; IC 95%: 1,67 a 3,17), com $P=0,001$.

Ao melhor de nosso conhecimento, o método Chalkley computadorizado para a análise da DMV em tumores GISTs ainda não foi descrito na literatura.

A relação da densidade microvascular com a curva de sobrevida pode contribuir para um maior entendimento do comportamento biológico incerto das neoplasias GISTs. Essa relação, através do método de Chalkley, é um novo achado em GISTs.

8 CONCLUSÕES

1. Houve uma associação estatisticamente significativa entre a DMV e a curva de sobrevida dos pacientes com GISTs. Esta associação não foi observada em relação ao marcador VEGF.

2. A DMV e a expressão de VEGF não apresentaram uma associação estatisticamente significativa com sexo, idade, tipo histológico, categoria de risco, localização e metástases.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS :

- 1 – Rubin, BP., *Gastrointestinal stromal tumours: an update*. *Histopathology*, 2006. **48**(1):p.83-96;
- 2 – Mazur, MT and HB, Clark. *Gastric stromal tumors. Reappraisal of histogenesis*. *Am J Surg Pathol*, 1983. **7**(6):p.507-19;
- 3- Miettinen, M, M Virolainen, and R Maarit Sarlomo, *Gastrointestinal stromal tumors – value of CD 34 antigen in their identification and separation from true leiomiomas and schwannomas*. *Am J Surg Pathol*, 1995. **19**(2): p.207-16;
- 4 – Robinson, TL et al, *Gastrointestinal stromal tumors may originate from a subset of CD 34 positive interstitial cells of Cajal*. *Am J Pathol*, 2000. **156**(4):p.1157-63;
- 5 – Hirota S, et al, *Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors*. *Science*, 1998. **279** (5350):p.577-80;
- 6 – Heinrich, MC et al, *PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors*. *Science*, 2003. **299**(5607):p.708-10;
- 7 – Lasota J, and M. Miettinen, *Clinical significance of on oncogenic KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors*. *Histopathology*, 2008.**53**(3):p.245-66;
- 8 – Tzen, CY, MN Wang and BL Mau, *Spectrum and prognostication of KIT and PDGFRA mutation in gastrointestinal stromal tumors*. *Eur J Surg Oncol*,2008. **34**(5):p.563-8;
- 9 – Liegl, B, JL Hornick, and AJ Lazar, *Contemporary pathology of gastrointestinal stromal tumors*. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2009.**23**(1):p.49-68, vii – viii;
- 10 - American Cancer Society. *Cancer facts and Figures*. American Cancer Society 2005;
11. Nilsson B et al. *Gastrointestinal stromal tumors: the incidence, prevalence, clinical course, and prognostication in the preimatinibe mesylate era – a population based study in western Sweden*. *Cancer* 2005;**103**;821-829;
- 12 – Steigen, SE and TJ Eide, *Trends in incidence and survival of mesenchymal neoplasm of the digestive tract within a defined population of northern Norway*. *APMIS*, 2006.**114**(3):p,192-200;

- 13 – Steigen SE et al. *Mutations in gastrointestinal stromal tumors – a population-based study from Northern Norway*. APMIS, 2007.**115**(4):p.289-298;
- 14 - DeMatteo RP et al. *Two hundred gastrointestinal stromal tumors: recurrence patterns and prognostic factors for survival*. Ann Surg 2000;**231**(1):51-58;
- 15 - Langer C et al. *Prognostic factor influencing surgical management and outcome of gastrointestinal stromal tumors*. Br J Surg 2003;**90**:332-339;
- 16 - Lee YTNM, *Leiomyosarcoma of the gastrointestinal tract: General pattern of metastasis and recurrence*. Cancer Treat Rv 1983;**10**:91-101;
- 17 - Bedikian et al. *Sarcoma of the stomach: Clinicopathologic study of 43 cases*. J Surg Oncol 1980;**13**:121-127;
- 18 - Farrugia G et al. *Leiomyosarcoma of the stomach: Determinants of long term survival*. Mayo Clin Proc 1992;**67**:553-536;
- 19 - Skandalakis J et al. *Smooth muscle tumors of the alimentary tract*. In: Ariel IM. Ed Progress in Clinical Cancer. New York, Grune & Stratton, 1965;**692**-708;
- 20 - Suster S et al. *Gastrointestinal stromal tumors with prominent myxoid matrix*. Am J Sur Pathol 1995;**19**(1):59-70;
- 21 - Kyriakos M. *Malignant tumors of the small intestine*. Jama 1974;**229**:700-702;
- 22 - Evans HL. *Smooth muscle tumors of the gastrointestinal tract: A study of 56 cases followed for a minimum of 10 years*. Cancer 1985;**56**:2242-2250;
- 23 - Grant CS et al. *Gastric leiomyosarcoma. Prognostic factors and surgical management*. Arch surg 1991;**26**:985-900;
- 24 - Lehnert T et al. *Surgical treatment of soft tissue tumors of the stomach*. Eur J Surg Oncol 1990;**16**:352-359;
- 25 - Hou, YY. et al. *Impact of KIT and PDGFRA genes mutations on prognosis of patients with gastrointestinal stromal tumors after complete primary tumor resection*. J Gastrointest Surg, 2009, **13** (9); 1583-92.
- 26 – Miettinen M. et al. *Evaluation of malignancy and prognosis of gastrointestinal stromal tumors: a review*. Hum Pathol, 2002.**33**(5):p.478-83;
- 27 – Miettinen M and J Losota, *Gastrointestinal stromal tumors: a review on morphology, molecular pathology, prognosis, and differential diagnosis*. Arch Pathol Lab Med,2006.**130**(10):p.1466-78;

- 28 – Quek, R and S. George, *Gastrointestinal stromal tumor: a clinical overview*. Hematol Oncol Clin North Am, 2009. **23**(1):p.69-78;
- 29 – Joensuu H, *Gastrointestinal stromal tumor (GIST)*. Ann Oncol, 2006. **17 Suppl 10**: p.x280-6;
- 30 – Elliot DD, CV Fanning and NP Caraway, *The utility of fine-needle aspiration in the diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: a cytomorphologic and immunohistochemical analysis with emphasis on malignant tumors*. Cancer, 2006. **108**(1):p.49-55;
- 31 – Chatzipantelis P et al, *Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration cytology of pancreatic neuroendocrine tumors: a study of 48 cases*. Cancer. 2008. **114**(4):p. 255-62;
- 32 – Gold JS and RP Dematteo, *Combined surgical and molecular therapy: the gastrointestinal stromal tumor mode*. Ann Surg, 2006. **244**(2):p176-84;
- 33 – Nemoto Y, et al, *Correlation of enhanced cell turnover with prognosis of gastrointestinal stromal tumors of the stomach: relevance of cellularity and p27 kip1*. Pathol Int, 2006. **56**(12):p.724-31;
- 34 - Isozaki K et al . *Disturbed intestinal movement, bile reflux to the stomach, and deficiency of c-KIT expressing cells in Ws/Ws mutants rats*. Gastroenterology 1998; **109**(2):456-464;
- 35 - Sakano AI et al .*Tumores estromais gastrointestinais: atualização propedêutico-terapêutica*. GISTSS em foco 2006: **03** fascículo 04;
- 36 – Abrahan SC, *Distinguishing gastrointestinal stromal tumors from their mimics: na update*. Adv Anat Pathol, 2007. **14**(3):p.178-88.
- 37 – Dow N, et al. *Gastrointestinal stromal tumors: differential diagnosis*. Semin Diagn Pathol, 2006. **23**(2):p.111-9.
- 38 – Miettinen M and J Lasota, *Gastrointestinal stromal tumors: pathology and prognosis at different sites*. Semin Diagn Pathol, 2006, **23**(2):p.70-83;
- 39 – Miettinen M, ZF Wang and J Lasota, *DOG1 antibody in the differential diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: a study of 1840 cases*. Am J Surg Pathol, 2009. **33**(9):p.1401-8;

- 40 – Liegl B et al, *Monoclonal antibody DOG1.1 shows higher sensitivity than KIT in the diagnosis of gastrointestinal stromal tumors, including unusual subtypes*. Am J Surg Pathol, 2009.**33**(3):p.437-46;
- 41 - Heinrich MC et al. *Biology and genetics aspects of gastrointestinal stromal tumors: KIT activation and cytogenetic alterations*. Hum Pathol 2002;**33**(5):484-495;
- 42 - Fletcher JA. *Role of KIT and platelet-derived growth factor receptors as oncoproteins*. Semim Oncol 2004;**31**(2 suppl 6):4-11;
- 43 - Caponero R et al. *Tratamento clínico dos tumores estromais gastrointestinais*. GIST em foco 2006;**3** fascículo 05;
- 44 - Fletcher CD et al. *Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: a consensus approach*. Hum Pathol 2002;**33**(5):459-465;
- 45 – Miettinen M et al, *Gastrointestinal stromal tumors of the jejunum and ileum: a clinicopathologic, imunohistochemical, and molecular genetic study of 906 cases before imantinib with long-term follow-up*. Am J Surg Pathol, 2006.**30**(4):p.477-89;
- 46 – Miettinen M, LH Sobin and J Lasota, *Gastrointestinal stromal tumors of the stomach: a clinicopathologic, imunohistochemical, and molecular genetic study of 1765 cases with long-term follow up*. Am J Surg Pathol, 2005.**29**(1):p.52-68;
- 47 - Wong, N.A., et al., *Prognostic indicators for gastrointestinal stromal tumours: a clinicopathological and immunohistochemical study of 108 resected cases of the stomach*. Histopathology, 2003. **43**(2): p. 118-26.
- 48 - Özgüç, H., et al., *Analysis of prognostic and immunohistochemical factors in gastrointestinal stromal tumors with malignant potential*. J Gastrointest Surg, 2005. **9**(3): p. 418-29.
- 49 -Nakamura, N., et al., *Prognostic significance of expressions of cell-cycle regulatory proteins in gastrointestinal stromal tumor and the relevance of the risk grade*. Hum Pathol, 2005. **36**(7): p. 828-37
- 50 - Sabah, M., et al., *Altered expression of cell cycle regulatory proteins in gastrointestinal stromal tumors: markers with potential prognostic implications*. Hum Pathol, 2006. **37**(6): p. 648-55.

- 51 - Jin, T., et al., *STI571 (Glivec) suppresses the expression of vascular endothelial growth factor in the gastrointestinal stromal tumor cell line, GIST-T1*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(5): p. 703-8.
- 52 - Izzedine, H., et al., *Sunitinib malate*. Cancer Chemother Pharmacol, 2007. **60**(3): p. 357-64.
- 53 -Pang, R.W. and R.T. Poon, *Clinical implications of angiogenesis in cancers*. Vasc Health Risk Manag, 2006. **2**(2): p. 97-108.
- 54 - DePrimo, S.E., et al., *Circulating protein biomarkers of pharmacodynamic activity of sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma: modulation of VEGF and VEGF-related proteins*. J Transl Med, 2007. **5**: p. 32.
- 55 - Kerbel, R.S., *Tumor angiogenesis*. N Engl J Med, 2008. **358**(19): p. 2039-49.
- 56 - de Jong, et al *Hot spot microvessel density and the mitotic activity index are strong additional prognostic indicators in invasive breast cancer*. Histopathology, 2000. **36**(4): p. 306-12.
- 57 - Inamura, M., et al., *Prognostic significance of angiogenesis in gastrointestinal stromal tumor*. Mod Pathol, 2007. **20**(5): p. 529-37.
- 58 - Fox, S.B., et al., *Association of tumor angiogenesis with bone marrow micrometastases in breast cancer patients*. J Nat Cancer Inst, 1997. **89**(14): p. 1044-9.
- 59 - Takahashi, R., et al., *Hypoxia-inducible factor-1alpha expression and angiogenesis in gastrointestinal stromal tumor of the stomach*. Oncol Rep, 2003. **10**(4): p. 797-802.
- 60 - Takahashi, R., et al., *Expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in gastrointestinal stromal tumor of the stomach*. Oncology, 2003. **64**(3): p. 266-74.
- 61 - Robert PJ et al. *Clinical presentation of gastrointestinal stromal tumors and treatment of operable disease*. Eur J Cancer 2002;**38**(suppl 5):537-538;
- 62 –Franquemont DW. *Differentiaton an risk assessment of gastrointestinal stromal tumors*. Am J Cli Pathol 1995;**103**:41-47;
- 63 - Linhares E et al. *Atualização em GIST*. Rev Col Bras Cir 2006;**33**(1):51-54;

- 64 - Joensuu H *et al.* *Brief report: effects of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with metastatic gastrointestinal stromal tumor.* *New Engl J Med* 2001;**344**:1052-1056;
- 65 - Druker BJ *et al.* *Effects of selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells.* *Nat Med* 1996 may;**2**(5):561-566;
- 66 - Savage DG *et al.* *Drug therapy: imantinibe mesylate – A New Oral Targeted Therapy.* *N Eng J Med* 2002;**346**:683-693;
- 67 - Poon, R.T., *et al.*, *Clinical significance of angiogenesis in gastrointestinal cancers: a target for novel prognostic and therapeutic approaches.* *Ann Surg*, 2003. **238**(1):9-28.
- 68 – Liegl AB, *et al.*, *Gastrointestinal stromal tumors.* *Virchows Arch.* 2010. **456**(2):111-27
- 69 – Hansen S.*et al.*, *The prognostic value of angiogenesis by Chalkley counting in a confirmatory study design on 836 breast cancer patients.* *Clin Cancer Res.* 2000;**6**(1):139-46.
- 70 – Rocha AO, *et al.* *The prognostic value of angiogenesis by Chalkley counting in gallbladder carcinoma.* *Hepatogastroenterology.* 2009;**56**(89)34-8.
- 71 – Birilik B, *et al.*, *Tumor vascularity is prognostic significance in adult, but not pediatric astricytoms.* *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2006.**32**(5):532-8.
- 72 – Dornelles C. *Comparsion of acquired cholesteatoma between pediatric and adult patients.* *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2009.**256**(10):1553-61.
- 73 - Lopes LF *et al.* *Gastrointestinal stromal tumor in Brazil: clinicopathology, immunohistochemistry and molecular genetics of 513 cases.* *Pathol Int*, 2008.**58**(6):p.344-52.
- 74 - Nilsson B. *et al.*, *Gastrointestinal stromal tumors: the incidence, prevalence, clinical course, and prognostication in the preimantinib mesylate era – a population-based study in Western Sueden.* *Cancer*, 2005.**103**(4):p.621-9
- 75 - Lieckens S *et AL.* *Angiogenesis: regulators and clinical applications.* *Bioch Pharmacol*, 2001. **61**(3):253-70.
- 76 – Shweiki D. *et al.* *Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis.* *Nature.* 1992;**359**(6398):843-5.

- 77 – Weidner N *et al.* *Tumor angiogenesis and metastasis – correlation in invasive breast carcinoma.* N Eng J Med, 1991. **324** (1):1-8.
- 78 – Mineo *et al.* *Prognostic impact of VEGF, CD31, CD34, and CD105 expression on tumor vessel invasion after radical surgery for IB-IIA non-small cell lung cancer.* J Clin Pathol. 2004.**57**(6):591-7.
- 79 – Maeda K *et al.* *Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric cancer.* Cancer. 1996; **77**:858-63.
- 80 – Erenoglu C *et al.* *Angiogenesis predict poor prognosis in gastric carcinoma.* Dig Surg. 2000;**17**(6)-581-86
- 81 – Du JR *et al.* *Vascular endothelial growth factor and microvascular density in esophageal and gastric carcinomas.* World J Gastroenterol. 2003.**9**(7):1604-6.
- 82 – Ichinoe M *et al.* *High microvascular density is correlated with high VEGF, iNOS and COX-2 expressing in penetrating growth-type early gastric carcinomas.* Histopathology. 2004.**45**(6):612-8.
- 83 – Tanigawa N *et al.* *Correlation between expression of vascular endothelial growth factor and tumor vascularity, and patient outcome in human gastric carcinoma.* J Clin Oncol. 1997;**15**(2):828-32.
- 84 - Ikeguchi M *et al.* *The expression of vascular endothelial growth factor and proliferative activity of cancer cells in gastric cancer.* Langerbecks Arch Surg. 1999;**384**:264-70.
- 85 – Kido S *et al.* *Interleukin 8 and vascular endothelial growth factor-prognostic factors in human gastric carcinoma.* Eur J Cancer. 2001;**37**:1482-87.
- 86 – Tanaka *et al.* *Evaluation of angiogenesis in non-small cell lung cancer: comparison between anti-Cd34 antibody and anti-CD105 antibody.* Clin Cancer Res. 2001.**7**(11);3410-5
- 87 – Offersen BV *et al.* *Patterns of angiogenesis in nonsmall-cell lung carcinoma.* Cancer. 2001.**91**(8);1500-9.
- 88 – Amar A *et al.* *Microvascular density in carcinoma of tongue.* Ver Assoc Med Bras. 2002,**48**(3);204-8.

- 89 – Shivakumar S *et AL.* *Evaluation of serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and microvessel density as prognostic indicators in carcinoma breast.* J Cancer Res Clin Onco 2009. **135**(4);627-36.
- 90 – Yao Y *et AL.* *Prognostic significance of microvessel density determined by anti-Cd105/endothelin monoclonal antibody in astrocytic tumors: comparison with anti CD31 monoclonal antibody.* Neuropathology, 2005,**25**(3):201-6.
- 91 – Ding S *et al.* *Comparative evaluation of microvessel density determined by CD34 or CD105 in benign and malignant gastric lesions.* Hum Pathol, 2006,**37**(7):861-6.
- 92- Cerski MR e Meurer L. *Tumores estromais gastrointestinais (GIST): fatores de risco e análise molecular de 85 casos provenientes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul.* Tese de Doutorado, 2010. Biblioteca da UFRGS, 000751700.
- 93 – Risau W. *Mechanisms of angiogenesis.* Nature, 1997; **386**:671-4.
- 94 – Folkman J. *Angiogenesis: na organizing principle for drug discovery?* Nat Rev Drug Discov. 2007, **6**(4):273-86.
- 95 – Folkman J. *Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis.* N Engl J Med. 1995;**333**:1757-63.
- 96 – Folkman J. *What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?* J Natl Cancer Inst. 1990;**82**:4-6.
- 97 – Jebreel A. *et AL.* *Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors expression and microvascular density in benign and malignant thyroid diseases.* Int J Exp Pathol 2007;**88**:271-7.
- 98 – Folkman J. *Can mosaic tumor vessels facilitate molecular diagnosis of cancer?* Proc Natl Acad Sci USA 2001;**98**(2):398-400.
- 99 – Fox SB, *et al.* *Tumor angiogenesis.* J Pathol. 1996;**176**:232-7.
- 100 – Souza GFM *et V.* *Angiogênese em carcinoma de células escamosas de língua e lábio inferior.* Cienc Odontol Brás 2007;**10**(1):12-8.
- 101 – Buone G. *et AL.* *Expression of angiogenesis stimulators and inhibitors in human thyroid tumors and correlation with clinical pathological features.* Am J Pathol. 1999;**155**(6):1967-76.

102 – Ferrara N. *VEGF and the quest for tumor angiogenesis factors*. Nat Ver Cancer 2002;**2**:795-803.

103 – Pourgholami MH *et al*. *Inhibitors of vacular endothelial growth factor in cancer*. Cardiovasc Hematol Agents Med Chem. 2008;**6**:343-7.

104 – Kerbel RS. *Tumor angiogenesis*. N Engl J Med. 2008.**358**;2039-49.

ANEXO I – BANCO DE DADOS

Caso	obito	datadiag	datafim	Sexo	Idade	Local	incidental	metastase	Diagnóstico	Tamanho	biopsy	tipohist	Mit50	Ki67	risco	P16	tempo	cd31	vefg
1	0,00	09-jul-1993	27-jan-2001	Masc	71	EST	Não	Não	tumor de músculo liso	13,0	Não	FUS	4	0,05	A	POS	7,56	5,90	MOD/FORTE
2	1,00	22-mai-1994	22-mai-1994	Masc	75	EST	Não	Não	leiomiossarcoma	20,0	Não	FUS	16	2,00	A	NEG	0,03	1,60	MOD/FORTE
3	0,00	14-out-1994	24-abr-1995	Fem	71	ID	Não	Não	neoplasia mesenquimal maligna de células fusiformes	10,0	Não	FUS	1	0,05	I	POS	0,53	1,80	MOD/FORTE
4	0,00	17-fev-1994	17-dez-1996	Fem	55	EST	Não	Não	tumor de músculo liso benigno	5,5	Não	FUS	10	0,05	I	NEG	2,83	7,30	MOD/FORTE
5	0,00	28-abr-1995	15-jul-2004	Masc	51	EST	Não	Não	tumor de músculo liso epitelióide	15,0	Não	EPI	5	5,00	A	POS	9,22	1,10	MOD/FORTE
6	0,00	30-abr-1995	04-mar-1996	Masc	55	ID	Não	Não	neoplasia de músculo liso compatível com leiomioma	5,0	Não	FUS	29	0,05	A	POS	0,85	3,20	MOD/FORTE
7	0,00	01-jun-1995	25-mai-2002	Fem	66	EST	Não	Não	leiomioma	3,0	Não	FUS	7	1,00	I	NEG	6,99	2,80	MOD/FORTE
8	0,00	25-jul-1995	21-jun-1996	Masc	60	Cólon	Sim	Não	leiomiossarcoma metastático	3,0	Não	MISTO	77	12,00	A	NEG	0,91	0,00	MOD/FORTE
9	0,00	20-out-1995	25-jun-1996	Fem	57	EST	Não	Não	leiomiossarcoma	25,0	Não	FUS	17	2,00	A	NEG	0,68	2,40	AUS/FRACO
10	0,00	27-nov-1995	04-mar-2008	Masc	81	EST	Não	Não	leiomioma		Sim	FUS	9	1,00		POS	12,28	1,80	AUS/FRACO
11	0,00	01-mai-1996	09-mai-1996	Masc	71	EST	Não	Não	leiomiossarcoma	23,0	Não	FUS	5	0,05	A	NEG	0,02	1,60	MOD/FORTE
12	0,00	08-mar-1996	08-nov-1999	Fem	70	ID	Não	Não	tumor de músculo liso histologicamente benigno	2,5	Não	FUS	8	0,05	I	POS	3,67	1,20	MOD/FORTE
13	0,00	11-mar-1996	28-abr-1998	Fem	51	ID	Não	Não	leiomioma	2,5	Não	FUS	9	0,05	I	POS	2,13	0,90	MOD/FORTE
14	0,00	01-jan-1996	10-abr-1996	Fem	70	EST	Não	Não	leiomiossarcoma	4,0	Não	FUS	34	1,50	A	POS	0,27	7,00	MOD/FORTE
15	0,00	01-mar-1996	01-mar-1996	Masc	17	ID	Não	Não	tumor mesenquimal	1,3	Não	FUS	3	0,05	MB	POS	0,33	0,00	MOD/FORTE
16	0,00	01-jan-1996	01-jan-2000	Fem	73	ID	Não	Não	neoplasia maligna de células fusiformes		Sim	MISTO	14	0,05		POS	3,50	5,40	MOD/FORTE
17	0,00	07-out-1997	25-out-1997	Fem	46	ID	Não	Não	neoplasia mesenquimal maligna	6,8	Não	MISTO	27	45,00	A	POS	0,05	2,50	MOD/FORTE
18	0,00	22-out-1997	21-nov-1997	Masc	62	ID	Não	Não	tumor estromal com diferenciação neural	3,5	Não	FUS	1	0,05	B	POS	0,08	2,60	MOD/FORTE
19	0,00	28-out-1997	18-nov-1997	Masc	99	ID	Não	Não	tumor estromal borderline	5,5	Não	FUS	2	1,00	I	POS	0,06	1,80	AUS/FRACO
20	0,00	10-dez-1997	29-jul-1998	Masc	26	Retrop	Não	Sim	neoplasia de células fusiformes	2,5	Não	FUS	2	10,00	B	POS	0,63	8,70	MOD/FORTE
21	0,00	19-fev-1998	19-abr-2008	Fem	67	ID	Não	Não	sarcoma de células fusiformes	7,0	Não	MISTO	80	12,00	A	NEG	10,17	1,20	MOD/FORTE
22	0,00	01-jan-1998		Masc	49	Retrop	Não	Não	neoplasia fusiforme		Sim	FUS	24	25,00		NEG	0,33	3,20	MOD/FORTE
23	0,00	07-ago-1998		Fem	62	ID	Não	Não	tumor estromal benigno	3,0	Não	FUS	1	1,00	B	POS	0,33	1,00	MOD/FORTE
24	0,00	29-dez-1998	14-jul-2008	Fem	47	EST	Não	Não	tumor estromal		Sim	FUS	2	0,05		NEG	9,55	1,00	MOD/FORTE
25	0,00	15-dez-1998	14-jul-2008	Masc	60	EST	Não	Não	tumor estromal gástrico	1,7	Não	MISTO	13	8,00	A	POS	9,59	5,70	MOD/FORTE
26	0,00	07-abr-1999	15-abr-1999	Masc	62	ID	Não	Não	tumor estromal fusiforme	3,0	Não	FUS	0	0,05	B	NEG	0,02	4,80	AUS/FRACO
27	1,00	01-out-1999	07-abr-2003	Masc	68	ID	Não	Não	sarcoma	11,0	Não	FUS	37	5,00	A	POS	3,52	3,00	AUS/FRACO
28	0,00	21-dez-1999	06-ago-2002	Fem	53	EST	Não	Não	tumor estromal gastrointestinal borderline	5,5	Não	FUS	5	1,00	I	NEG	2,63	3,50	MOD/FORTE
29	0,00	26-jan-2000	08-mar-2000	Masc	86	ID	Não	Não	tumor estromal GI	1,7	Não	FUS	2	0,05	MB	POS	0,12	2,10	AUS/FRACO
30	0,00	28-jul-2000	03-set-2000	Masc	76	reto	Não	Sim	tumor estromal gastrointestinal		Sim	MISTO	117	7,00		NEG	0,10	2,00	MOD/FORTE
31	0,00	23-mar-2000	03-jun-2008	Fem	56	EST	Não	Sim	tumor maligno do estroma gástrico	15,0	Não	FUS	16	0,05	A	POS	8,20	2,30	AUS/FRACO
32	0,00	14-abr-2000	14-jul-2008	Fem	49	Retrop	Não	Não	neoplasia mesenquimal		Sim	FUS	6	5,00		POS	8,25	2,10	MOD/FORTE
33	1,00	01-mar-2000	05-abr-2004	Fem	61	EST	Não	Sim	GIST	6,5	Não	FUS	16	0,90	A	NEG	4,10	1,00	AUS/FRACO
34	0,00	19-jul-2001	09-jun-2008	Fem	26	Mes- reto	Não	Não	GIST com diferenciação neural e muscular	10,0	Não	MISTO	24	0,05	A	NEG	6,90	1,30	MOD/FORTE
35	0,00	25-mai-2002	02-jun-2002	Fem	88	ID	Não	Não	sarcoma fusocelular pleomórfico grau III	2,4	Não	EPI	114	90,00	A	NEG	0,02	3,60	MOD/FORTE
36	0,00	13-ago-2002	10-fev-2005	Fem	74	ID	Não	Não	GIST	1,4	Não	FUS	0	0,05	MB	POS	2,50	10,40	MOD/FORTE
37	0,00	23-nov-2001	24-jul-2006	Fem	41	ID	Não	Não	GIST com diferenciação neural	3,2	Não	MISTO	8	0,50	I	POS	4,67	2,60	MOD/FORTE
38	0,00	01-jul-2002	27-jun-2008	Fem	40	Retrop	Não	Não	compatível com GIST	15,2	Não	EPI	2	0,05	A	POS	5,99	3,50	MOD/FORTE
39	0,00	12-nov-2002	15-mai-2007	Masc	77	EST	Não	Não	neoplasia mesenquimal		Sim	FUS	1	0,05		POS	4,51	3,10	MOD/FORTE
40	0,00	08-nov-2002	12-jun-2008	Fem	48	Mes- reto	Não	Sim	GIST com diferenciação muscular e neural	7,0	Não	EPI	27	50,00	A	POS	5,60	1,20	MOD/FORTE
41	0,00	05-ago-2004	16-mai-2008	Fem	60	EST	Não	Não	GIST	9,5	Não	FUS	16	0,50	A	POS	3,78	2,20	MOD/FORTE
42	0,00	08-dez-2003	15-mai-2008	Masc	57	EST	Sim	Não	consistente com tumor estomal gastrointestinal	1,2	Não	FUS	1	0,10	MB	POS	4,44	3,40	MOD/FORTE
43	0,00	30-mar-2009	22-abr-2009	Fem	33	ID	Não	Não	GIST	5,0	Não	FUS	39	30,00	A	POS	0,08	2,00	MOD/FORTE
44	0,00	22-mar-2004	17-mai-2007	Masc	65	ID	Sim	Não	GIST, adenocarcinomas gástrico e esofágico	2,0	Não	MISTO	0	0,50	B	POS	3,15	6,90	AUS/FRACO
45	0,00	08-fev-2004	29-fev-2008	Masc	41	EST	Não	Não	neoplasia de células fusiformes compatível com GIST	1,8	Não	MISTO	3	2,00	MB	POS	4,06	1,10	MOD/FORTE

46	0,00	31-jan-2004	17-fev-2004	Fem	61	ID	Não	Não	tumor desmóide	12,0	Não	FUS	1	1,00	A	POS	0,05	17,40	MOD/FORTE
47	0,00	01-mar-2007	13-mar-2008	Fem	62	EST	Não	Não	GIST	4,8	Não	FUS	6	1,00	I	NEG	1,04	4,40	MOD/FORTE
48	1,00	03-jan-2004	26-ago-2004	Masc	55	Mes-re	Não	Não	possível GIST	2,3	Não	FUS	68	45,00	A	POS	0,65	6,00	MOD/FORTE
Caso	obito	datadiag	datafim	Sexo	Idade	Local	incidental	metastase	Diagnóstico	Tamanho	biopsy	tipohist	Mit50	Ki67	risco	P16	tempo	cd31	vefg
49	0,00	25-jun-2009	07-jul-2009	Fem	58	Cólon	Não	Não	GIST	4,0	Não	FUS	0	8,00	B	POS	0,08	0,10	AUS/FRACO
50	0,00	09-jul-2006		Fem	70	EST	Não	Não	GIST		Sim	FUS	0	0,05		NEG	0,33	2,60	MOD/FORTE
51	1,00	27-out-2004	08-dez-2004	Masc	55	EST	Sim	Sim	tumor estromal gastrointestinal maligno	15,0	Não	FUS	26	5,00	A	NEG	0,12	10,80	MOD/FORTE
52	0,00	11-jan-2005	15-jan-2008	Fem	68	ID	Sim	Sim	GIST sem atipias		Sim	FUS	0	0,10		POS	3,01	7,90	MOD/FORTE
53	0,00	07-mai-2007	17-nov-2008	Masc	60	Retrop	Não	Não	GIST	8,0	Não	MISTO	4	1,50	I	POS	1,50	2,80	MOD/FORTE
54	0,00	26-ago-2005	01-jul-2008	Masc	37	EST	Não	Não	GIST		Sim	FUS	1	50,00		NEG	2,85	2,40	MOD/FORTE
55	0,00	01-fev-2005	18-jul-2008	Masc	52	ID	Não	Não	GIST	5,0	Não	FUS	11	0,05	A	POS	3,46	2,40	MOD/FORTE
56	0,00	13-dez-2005	16-mai-2008	Masc	58	reto	Não	Não	GIST		Sim	FUS	1	0,50		POS	2,42	2,70	MOD/FORTE
57	0,00	29-jul-2004	09-jan-2007	Fem	58	EST	Não	Não	possível GIST	7,0	Não	MISTO	1	2,00	I	POS	2,45	0,10	AUS/FRACO
58	0,00	13-set-2006	19-jun-2008	Masc	68	EST	Não	Não	GIST		Sim	EPI	1	0,05		POS	1,77	1,50	MOD/FORTE
59	0,00	28-nov-2006	01-jul-2008	Masc	57	EST	Não	Não	GIST e LMC	2,7	Não	FUS	9	2,00	I	POS	1,59	2,30	AUS/FRACO
60	0,00	05-set-2006	18-jul-2008	Fem	71	Mes- reto	Não	Não	GIST	6,0	Não	FUS	40	5,00	A	POS	1,87	4,90	AUS/FRACO
61	0,00	01-set-2003	16-jul-2008	Fem	52	EST	Não	Não	compatível com GIST	16,5	Não	FUS	12	0,05	A	POS	4,88	1,30	MOD/FORTE
62	0,00	14-abr-2008	14-jul-2009	Masc	63	ID	Sim	Não	GIST	0,8	Não	FUS	1	0,05	MB	POS	1,25	2,00	MOD/FORTE
63	0,00	23-jun-2008	29-jun-2009	Fem	72	ID	Sim	Não	GIST	1,5	Não	FUS	2	3,00	MB	POS	1,00	3,10	MOD/FORTE
64	0,00	10-ago-2007	12-jul-2009	Masc	48	EST	Não	Não	GIST	3,0	Não	FUS	3	3,60	B	POS	1,92	10,10	AUS/FRACO
65	0,00	19-out-2007	03-jun-2009	Masc	63	EST	Não	Não	GIST	12,0	Não	FUS	1	2,60	A	NEG	1,67	1,50	MOD/FORTE
66	0,00	18-fev-2009	13-jul-2009	Masc	56	ID	Não	Não	GIST	17,0	Não	EPI	43	30,00	A	POS	0,42	4,20	MOD/FORTE
67	0,00	16-abr-2008	10-jul-2009	Fem	63	ID	Sim	Não	GIST	0,5	Não	FUS	0	0,05	MB	POS	1,25	5,20	MOD/FORTE
68	0,00	03-jun-2009	16-jun-2009	Fem	45	ID	Não	Sim	GIST	10,0	Não	EPI	15	25,00	A	POS	0,04	1,40	AUS/FRACO
69	0,00	18-ago-2008	13-jul-2009	Masc	72	EST	Não	Não	GIST	3,5	Não	FUS	10	5,00	I	POS	0,92	1,30	AUS/FRACO
70	0,00	13-ago-2008	02-jun-2009	Masc	57	EST	Não	Não	GIST	4,5	Não	FUS	3	3,00	B	POS	0,83	2,50	AUS/FRACO
71	0,00	22-dez-2008	13-jul-2009	Masc	77	EST	Não	Não	GIST	4,0	Não	FUS	5	5,00	I	POS	0,58	1,00	AUS/FRACO
72	0,00	10-dez-2008	06-fev-2009	Masc	53	ID	Sim	Não	GIST	0,5	Não	FUS	0	0,05	MB	NEG	0,17	2,90	MOD/FORTE
73	0,00	09-jan-2009	09-jul-2009	Masc	53	EST	Sim	Não	GIST	4,8	Não	FUS	6	6,00	I	NEG	0,50	2,80	MOD/FORTE
74	0,00	09-jan-2009	07-abr-2009	Fem	60	ID	Não	Não	GIST	8,0	Não	MISTO	18	15,00	A	POS	0,25	2,60	AUS/FRACO
75	0,00	22-abr-2009	10-jul-2009	Masc	45	ID	Não	Sim	GIST	3,5	Não	MISTO	50	40,00	A	NEG	0,25	5,60	AUS/FRACO
76	0,00	01-jun-2004	27-jun-2008	Fem	49	EST	Não	Não	sugestivo de tumor estromal gastrointestinal	5,0	Não	FUS	5	0,50	B	POS	4,07	2,10	MOD/FORTE
77	1,00	31-mai-2005	07-jan-2008	Masc	49	EST	Sim	Não	compatível com GIST histologicamente benigno		Sim	FUS	0	0,05		POS	2,61	7,80	MOD/FORTE
78	0,00	15-jun-2009	13-jul-2009	Masc	51	EST	Não	Não	GIST	1,7	Não	EPI	2	0,05	MB	NEG	0,08	9,60	AUS/FRACO
79	0,00	28-nov-2006	29-out-2007	Masc	61	EST	Não	Não	GIST		Sim	FUS	3	0,05		NEG	0,92	5,40	AUS/FRACO

ANEXO II – ARTIGO CIENTÍFICO

O presente artigo foi submetido à revista Gastroenterology Research no dia 18/05/2011 e aceito no dia 24/11/2011.

Microvessel density (Chalkley method) in a series of 79 Gastrointestinal Stromal Tumors

Luiz Eduardo Waengertner^{1, 3}, Luise Meurer Ph.D^{1,2,3}, Marcelle Reesink Cerski Ph.D^{1,2,3}

Programa de Pós Graduação: Ciências em Gastroenterologia¹, Departamento de Patologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul², Serviço de Patologia do Hospital de Clínica de Porto Alegre³, RS, Brazil.

Correspondence to:

Programa de Pós Graduação: Ciências em Gastroenterologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, n° 2400, 2° andar, CEP 90035-001, Porto Alegre, RS, Brazil

Phone 55.51.33085603; fax: 55.51.33085616; e-mail: meurerl@terra.com.br

Suggested short title: GISTs, angiogenesis, microvessel density, Chalkley method.

Funding: Fundo de Investimento de Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Abstract:

Introduction: Gastrointestinal stromal tumors (GISTs) are the most common mesenchymal tumors of the gastrointestinal tract, representing 70% of these neoplasias, having an annual incidence of 1 to 2/100.000. They are mostly sporadic and occurring mainly in adults. GISTs are tumors of relative unknown behavior and a score of risk stratification was developed based on two criteria: maximum tumor size and mitotic index according to the National Institutes of Health (NIH) consensus, validated by several authors. Angiogenic factors such as the MVD (microvessel density) may play an important role in growth and tumor progression. **Objective:** evaluation of the MVD (modified Chalkley method) in a series of 79 cases of GISTs diagnosed by the Pathology Service at the HCPA (Hospital de Clínicas de Porto Alegre) from January 1993 to December 2009. **Material and Methods:** 79 cases of GISTs were submitted to immunohistochemical analysis for CD31, an endothelial marker, to analyze MVD. Hot spots were identified for each case, and the mean numbers of stained blood vessels collected through Chalkley count, with the use of a 25 point grid, placed onto a scanned image. Images were analysed through a image analysis system. We used a cutoff of six vessels. **Results:** our series was composed of 42 male and 37 female and presented an average age of 58.9 years. GISTs were predominately located in the stomach (45.6%) followed by the small intestine (38.0%). Sixty seven GISTs (84.8%) showed an average of less than six vessels stained by CD31 (MVD) and 12 (15.2%) GISTs an average of more than six vessels. A statistically significant difference was observed between survival rate of patients having GISTs with MVD of ≤ 6 vessels (mean=2.4, CI 95%: 1.67 a 3.17) and patients having GISTs with MVD of ≥ 6 vessels (mean=2.4, CI 95%: 1.67 a 3.17), $p=0.001$. No association for MVD was observed related to sex, age, histological type, risk category, location and metastasis. **Discussion:** Chalkley method is an important tool to evaluate angiogenesis and prognosis of patients in different kinds of neoplasias such as: astrocytomas, renal tumors, prostate carcinoma, breast and gastric cancers. We propose the use of Chalkley method for GISTs.

Conclusions: 79 cases of GISTs diagnosed at a single center in South Brazil were studied for MVD (Chalkley method). There was a statistically significant difference between MVD and the survival rate for these patients. The use of Chalkley method in GISTs may be helpful to evaluate clinical outcome.

Microvessel density (Chalkley method) in a series of 79 Gastrointestinal Stromal Tumors

INTRODUCTION

Gastrointestinal stromal tumors (GISTs) are the most common stromal tumors of the gastrointestinal tract, with an annual incidence of nearly 2/100.000/ year (1-4). They affect males and females similarly and most patients are between 50 and 60 years of age (1-5). GISTs represent 2% of all gastric tumors, 14% of small intestine tumors and 0.5% of colonic tumors (5). They are thought to arise from interstitial cell of Cajal, a pacemaker cell found in the myoenteric plexus (6-7). Macroscopically, GISTs are non-encapsulated, well-defined, intra-abdominal nodular lesions, which can cause a bulging in the lumen of the gastrointestinal tract (3-8). On histology, about 70% of GISTs are composed of spindle-cells, while epithelioid cells comprise a further 20% and remaining 10% of tumors are of mixed cell types (2,8-11).

The tyrosine kinase receptor, CD117, is present in 90 to 95% of GISTs, usually with diffuse cytoplasmic expression (12-16). The protein is considered the main diagnostic marker for GISTs, along with CD34, a hematopoietic stem cell marker, present in up to 70% of GISTs (5,17-20). Some authors, notable Fletcher *et al.*, have reported that lesion size and mitotic count can be important predictors of GISTs potential malignancy (10-11,13-14,17,21-22). These characteristics are used to classify tumors into different risk categories for aggressive behavior, (3,10-11,17,22)

Angiogenesis, formation of new blood vessels, plays a central role in cancer survival, local tumor growth and development of distant metastasis (23,24, 25). Tumor blood supply is directly related to an imbalance between pro-angiogenic and anti-angiogenic factors (26-27). The mainstay of the assessment of tumor vascularity has been counting the number of immunohistochemical identified microvessels in vascular hot spots (27). Microvessel density (MVD) has been studied as a prognostic marker in different kinds of human cancer (24,28,29,30). Techniques including Chalkley counting, vascular grade and the use of image analysis systems are described to

evaluate angiogenesis (27) Dornelles *et al.* measured angiogenesis using a method combining MVD, Chalkley grid and image analysis systems(31).

MATERIALS AND METHODS

Seventy-nine cases of GISTs diagnosed at the Department of Pathology of Hospital de Clínicas de Porto Alegre from January 1993 to December 2009 were submitted to immunohistochemical analysis for CD31, (1:10 by DAKO), an endothelial marker, for MVD analysis. Procedures were made according to manufacturer's instructions. For antigenic recovery we used citrate buffer with pH 6.0 and microwave oven. Initially, 3 to 5 microscopic fields (200x) showing the highest microvascular density (hot spots) were identified, with the use of CD31 antibody (Figure 1). The mean number of stained blood vessels was collected through Chalkley count, where a 25-point grid was placed onto a scanned image and all points coincided with the marked vessels were counted. Three to five images were used and the mean value was obtained with the number of counted vessels in each image (31).

Clinical information and follow-up were obtained from medical records of Hospital de Clínicas de Porto Alegre: age, month/year of diagnosis, tumor location. In the retrospective follow-up analysis we looked for local recurrence, metastases, site of metastases, use of adjuvant therapy with tyrosine kinase inhibitors, date of the last medical appointment and death as a consequence of disease activity or other causes.

RESULTS

Demographic data

The sample composed of 79 cases, 42 male and 37 female presented an average age of 58, 9 years \pm 13. Forty patients were over 60. All our cases were considered sporadic GISTs. Eleven cases (13.9%) were described as an incidental finding during surgery. GISTs were predominately located in the stomach (45.6%) followed by the small intestine (38.0%) and (26.4%) were located in omentum and mesenterium. We have not identified any case of esophageal GIST.

Histological findings

Spindle cell morphology was present in 72.2% of these tumors. Tumor size varied, ranging from 0.5 to 25.0cm, with median of 4.8cm. According to the NIH classification, 15.4% GIST were classified as very low risk category, 13.8% low risk category, 23.1% intermediate risk category and 47.7% belonged to the high risk category.

Immunohistochemical findings and statistical analysis

CD117 was strongly expressed in 78 cases. Only one case was negative for CD117, but strongly positive for CD34, and negative for S-100 protein, desmin and actin (previous data not published). Microvessel density evaluation, through Chalkey method using scanned images, showed an average of less than six vessels (stained by the anti-CD31 antibody reaction) in 67 cases (84.8%), and a average of more than six vessels in 12 cases (15.2%). Out of 12 patients with a mean of $MVD \geq 6$ vessels, 3 died (25.0%) and out of 67 patients having a mean of $MVD \leq 6$ vessels, 3 died (4.5%). A statistically significant difference was seen when these findings were related to survival rates: $MVD \leq 6$ vessels (mean=2.4, CI 95%: 1.67 a 3.17) and $MVD \geq 6$ vessels (mean=2.4, CI

95%: 1.67 a 3.17), $p=0.001$ (Figure 2). No association for MVD was observed related to sex, age, histological type, risk category, location and metastasis.

Follow-up

Our patients were followed for a mean time of 2.5 ± 2.8 years (median 1.5 years). Nine patients developed metastasis, five involving liver and four peritoneal cavity. Three patients received adjuvant therapy with tyrosine kinase inhibitors for a period not longer then 3 months.

DISCUSSION

Seventy-nine cases of GISTs from a single center in South Brazil were analysed for MVD to evaluate angiogenesis. Our series was composed of 79 cases, 42 male and 37 female with an average age of 58, 9 years ± 13 . GISTs were predominately located in the stomach followed by the small intestine, omentum and mesenterium. 15.4% GISTs were classified as very low risk category, 13.8% low risk category, 23.1% intermediate risk category and 47.7% high risk category (NIH classification).

Our patients were followed for a mean time of 2.5 ± 2.8 years (median 1.5 year). Many cases were diagnosed and added to this study in the last three years, thus impairing follow-up time. Only nine cases (11.4%) have progressed to metastasis, involving liver and peritoneal cavity. Other GISTs series with a longer follow-up time, observed metastases in 27.0% to 54.0% of their cases. The low incidence of metastasis in our series is probably related to the short follow-up time (16). Only three patients where treated with anti-molecular therapy, 400mg/daily, for a period not longer than 3 months, considered insufficient (35).

A high MVD may indicate poor prognosis in different kinds of human neoplasias such as prostate carcinoma, adult astrocytoma, gastric and breast cancer. These same correlation was not observed for lung and bladder cancers and cerebellar medulloblastoma (24,29-30,32-33).

MVD appeared to be an important independent factor of poor prognosis by multivariate analysis for adult astrocytomas ($P=0.001$) (32). The study of

MVD in renal cell carcinoma suggested that for these tumors, MVD was inversely associated with micro vascular invasion, metastasis and patient survival (34). Another series of 67 gastric cancer samples showed a significantly association between high MVD, and poor survival (24).

Imamura *et al.* investigating angiogenesis in 95 GISTs, evaluated MVD through CD31 immunochemicalstaining. In his series multivariate analysis identified MVD and tumor grade as being two independent factors of worse prognosis ($P=0.0007$, 0.0152 respectively), suggesting that the study of MVD may be a useful predictor of aggressive biologic behavior for GISTs. (23)

In our series microvessel density evaluation, through Chalkley method using scanned images, showed an average of less than six vessels (stained by the anti-CD31 antibody reaction) in 67 cases (84.8%) and an average of more than six stained vessels in 15.2%. Out of 12 patients with a mean of $MVD \geq 6$ vessels, 3 died (25.0%) and out of 67 patients having a mean of $MVD \leq 6$ vessels, 3 died (4.5%). A statistically significant difference was seen when these findings were related to survival rates: $MVD \leq 6$ vessels (mean=11.2, CI 95%: 10.1 - 12.4) and $MVD \geq 6$ vessels (mean=2.4, CI 95%: 1.67 - 3.17), $P=0.001$. Histological quantification of tumor vascularity may be a significant prognosticator in GISTs. No association for MVD was observed related to sex, age, histological type, risk category, location and metastasis in the present work.

Angiogenic activity may be measured by MVD , but other factors such as the vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors (VEGFR-1,VEGFR-2), cell adhesion molecules, proteases and other cytokines markers may also be involved in the process. Future analysis for more information on the biology of tumor angiogenesis may be necessary(26-27,30).

CONCLUSION

Seventy-nine cases of GISTs diagnosed at a single center in South Brazil were analyzed for MVD (Chalkley method). There was a statistically significant difference between MVD and survival rates for these patients. The use of Chalkley method in GISTs may be helpful to evaluate clinical outcome.

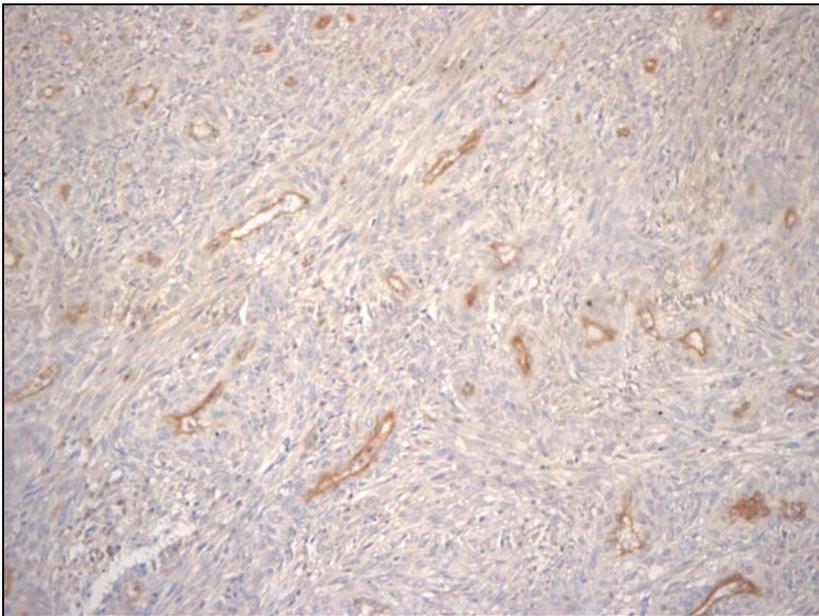


Figure 1: CD31 antibody in GIST (200X).

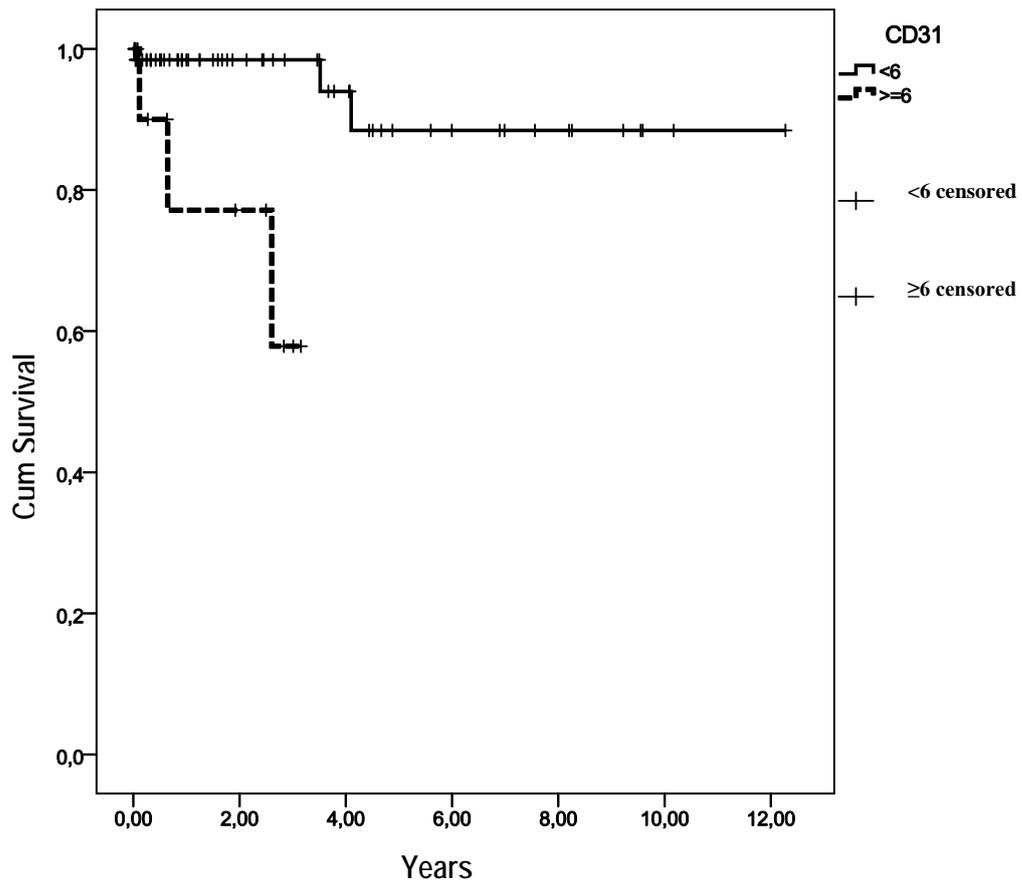


Figure 2: Survival functions in relation to MVD (CD31). Out of the 12 patients with $MVD \geq 6$ vessels, 3 died (25.0%) and out of 67 with $MVD \leq 6$ vessels, 3 died (4.5%).

REFERENCES

1. Nilsson B. *et al.*, *Gastrointestinal stromal tumors: the incidence, prevalence, clinical course, and prognostication in the preimantinib mesylate era – a population-based study in Western Sweden*. *Cancer*, 2005.**103**(4):p.621-9.
2. Steigen SE. and TJ Edie, *Trends in incidence and survival of mesenchymal neoplasm of digestive tract within a defined population of Northern Norway*. *APMIS*, 2006. **114**(3):p.192-200.
3. Quek R. and S. George., *Gastrointestinal stromal tumor: a clinical overview*. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2009;**23**(1):p.69-78viii.
4. Steigen SE and TJ Edie.*Gastrointestinal stromal tumor (GISTs): a review*. *APMIS*,2009.**117**(2):p.73-86.
5. Blacktein ME *et al* V. *Gastrointestinal stromal tumours: consensus steatment on diagnosis and treatment*. *Can J Gastroenterol*, 2006.**20**(3):p.157-63.
6. Min KW and M Leabu. *Interstitial cells of Cajal (ICC) and gastrointestinal stromal tumor (GIST): facts, speculations and myths*. *J Cell Mol Med* 2006.**10**(4):p.995-1013.
7. Kindblom LG *et al.* *Gastrointestinal pacemaker cell tumor (GIPACT): gastrointestinal stromal tumors show phenotypic characteristics of interstitial cells of Cajal*. *Am J Pathol*, 1998.**152**(5):p.1259-69.
8. Liegl B *et al.* *Contemporary pathology of gastrointestinal stromal tumor*. *Hematol Oncol Cin North Am*, 2009.**23**(1):p.49-68, vii-viii.
9. Miettinen M and J Lasota.*Gastrointestinal stromal tumors – definition, clinical,histological, immunohistochemical, and molecular genetics features an differential diagnosis*. *Virchows Arch*, 2001.**438**(1):p.1-12.
10. Fletcher CD *et al.* *Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: A consensus approach*. *Hum Pathol*, 2002.**33**(5):p.459-65.
11. Miettinen M *et al.* *Evaluation of malignancy and prognosis of gastrointestinal stromal tumors: a review*. *Hum Pathol*, 2002.**33**(5):p.478-83.
12. Gold JS and RP Dematteo. *Combined surgical and molecular therapy: the gastrointestinal stromal tumor model*. *Ann Surg*, 2006.**244**(2):p.176-84.

13. Miettinen M *et al.* *Gastrointestinal stromal tumors of the jejunum and ileum: a clinicopathologic, immunohistochemical and molecular genetic study of 906 cases before imatinib with long-term follow-up.* Am J Surg Pathol, 2006. **30**(4):p.477-89.
14. D'Amato G *et al.* *Update on the biology and therapy of gastrointestinal stromal tumors.* Cancer Control, 2005. **12**(1):p.44-56.
15. Rubin BP. *Gastrointestinal stromal tumors: an update.* Histopathology, 2006. **48**(1):p.83-96.
16. Joensuu H. *Gastrointestinal stromal tumor (GIST).* Ann Oncol, 2006. **17 suppl 10**:p. x280-6.
17. Blay JY *et al.* *Consensus meeting for the management of gastrointestinal stromal tumors. Report of the GIST Consensus Conference of 20-21 March 2004, under the auspices of ESMO.* Ann Oncol. 2005. **16**(4):p.566-78.
18. Miettinen *et al.* *Gastrointestinal stromal tumors – value of CD34 antigen in their identification and separation from true leiomyomas and schwannomas.* Am J Surg Pathol, 1995. **19**(2):p.207-16.
19. Robinson TL *et al.* *Gastrointestinal stromal tumors may originate from a subset o CD34 positive interstitial cells of Cajal.* Am J Pathol, 2000. **156**(4):p1157-63.
20. Miettinen M and J Lasota. *Gastrointestinal stromal tumors: pathology and prognosis at different sites.* Semin Diagn Pathol, 2006. **23**(2):p.70-83.
21. Shinomura Y *et al.* *Pathophysiology, diagnosis, and treatment of gastrointestinal stromal tumors.* J Gastroenterol, 2005. **48**(8):p.775-80.
22. Joensuu H. *Risk stratification of patients diagnosed with gastrointestinal stromal tumor.* Hum Pathol, 2008. **39**(10):p.1411-9.
23. Inamura M, Yamamoto H, Nakamura N, *et al.* *Prognostic significance of angiogenesis in gastrointestinal stromal tumor.* Modern Pathology, 2007. **20**,529-37.
24. Zaho HC, Qin R, Chen XX, *et al.* *Microvessel density is a prognostic marker of human gastric cancer.* World J Gastroenterol. **12**(47):7598-7603.
25. Folkman J, Shing Y. *Angiogenesis.* J Biol Chem 1992; **267**:10931-10934.
26. Capp C, Zenning N, Wajner S *et al.* *O papel do fator de crescimento endothelial vascular nos carcinomas de tireóide.* Revista HCPA; **29**(1):51-59.

27. Fox SB and Harris AL. *Histological quantitation of tumor angiogenesis*. APMIS 2004,**112**:413-30.
28. Duff SE, Jeziorska M, Kumart S et al. *Lymphatic vessel density, microvessel density and lymphangiogenic growth factor expression in colorectal cancer*. Colorectal disease 2006, **9**;793-800.
29. Offersen BV, Borre M, Sorenses FB et al. *Comparison of methods of microvascular staining and quantification in prostate carcinoma: Relevance to prognosis*. APMIS 2002,**110**;177-85.
30. Offersen BV, Borre M, Overgaard J. *Quantification of angiogenesis as a prognostic marker in human carcinomas: a critical evaluation of histopathological methods for estimation of vascular density*. European J of Cancer 2003, **39**;881-90.
31. Dornelles C, Meurer L et al. *Comparison of acquired cholesteatoma between pediatric and adult patients*. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2009.**256**(10):1553-61.
32. Birilik B, Canda S and Ozer E. *Tumour vascularity is of prognostic significance in adult, but not pediatric astrocytomas*. Neuropathology and Applied Neurobiology, 2006,**32**;532-38.
33. Tural S, Gercek A, Konya D et al. *Microvessel density and vascular endothelial growth factor expression as predictors of children's survival from cerebellar medulloblastoma*. J of Clin Neuroscience 2009,**16**;1199-1202.
34. Yildiz E, Ayan S, Goze F et al. *Relation of microvessel density with microvascular invasion, metastasis and prognosis in renal cell carcinoma*. BJU 2007.**101**;758-764.
- 35 - Savage DG et al. *Drug therapy: imantinibe mesylate – A New Oral Targeted Therapy*. N Eng J Med 2002;**346**:683-693;

