INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Oncologia

Marcus Vinícius Motta Valadão da Silva

Avaliação de potenciais biomarcadores preditores de benefício clínico ao mesilato de imatinibe em portadores de GIST metastático

Rio de Janeiro

2012

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Oncologia

Avaliação de potenciais biomarcadores preditores de benefício clínico ao mesilato de imatinibe em portadores de GIST metastático

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Oncologia do Instituto Nacional de Câncer para obtenção do titulo de Doutor em Oncologia.

Doutorando: Marcus Vinicius Motta Valadão da Silva

Orientador: Dr. Carlos Gil Moreira Ferreira

Co-orientadora: Dr[a] Denise Peixoto Guimarães

Rio de Janeiro

Maio de 2012

FICHA CATALOGRÁFICA

S586a Silva, Marcus Vinicius Motta Valadão
Avaliação de potenciais biomarcadores preditores de benefício clínico ao ao mesilato de imatinibe em portadores de GIST metastático. / Marcus Vinicius Motta Valadão Silva. – Rio de Janeiro, 2012.
87 f.: il. tab.

Tese (Doutorado em Oncologia) – Programa de Pós-Graduação em Oncologia - Instituto Nacional de Câncer José Gomes da Silva, 2012.

Orientador: Carlos Gil Moreira Ferreira.

Co-Orientadora: Denise Peixoto Guimarães.

1. Tumores do Estroma Gastrointestinal. 2. Metástase. 3. Imatinibe. 4. IGF-1R. 5. Resposta. 6. Predição. I. Ferreira, Carlos Gil Moreira (Orient.). II. Guimarães, Denise Peixoto (Co-Orient.). III. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. IV. Título.

CDD 616.99433061

Avaliação de potenciais biomarcadores preditores de benefício clínico ao mesilato de imatinibe em portadores de GIST metastático

Marcus Vinícius Motta Valadão da Silva

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Oncologia do Instituto Nacional de Câncer para obtenção do titulo de Doutor em Oncologia.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Laércio Gomes Lourenço

Dr. Rui Manuel Reis

Dr. Eduardo Linhares Riello de Mello

Dr. Marcelo Henrique Mamede Lewer

Dr. Márcio Soares

Dr. Daniel Herchenhorn

Rio de Janeiro

Maio de 2012

Dedico esta tese à memória de meu pai, pelo apoio e orgulho de saber que faço com amor a profissão que escolhi influenciado por ele.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela chance de poder ajudar o próximo.

À Regiane, minha esposa, pelo apoio incondicional e pela compreensão da minha ausência por conta da realização do trabalho e por saber entender que para mim significava mais que um simples doutorado e sim a concretização de um sonho.

À minha família (minha mãe, minhas irmãs, minha tia), pelo incentivo e apoio.

Ao meu orientador, Carlos Gil, pela oportunidade e pela aposta em mim para a realização desse projeto. Você foi responsável pelo meu crescimento profissional na medida em que me deu a chance de experimentar meus primeiros passos na carreira como pesquisador. Muito obrigado pela confiança!

À Denise, minha co-orientadora, melhor dizendo, muito mais que co-orientadora! Devo a você a realização desse trabalho, pois pude sempre contar em todos os momentos, principalmente nos momentos de maiores dificuldades (experimentos que não dão certo, centros que prometem participar do estudo e não respondem, dentre outros...). Denise sempre tinha um discurso que me deixava menos angustiado e mais confiante mesmo nos momentos em que parecia que as coisas não iam no caminho desejado (isso é fundamental para o aluno seguir nessa longa jornada sem pensar em desistir). Enfim, não há palavras que traduzam minha eterna gratidão por tudo que você fez. Obrigado pela amizade!

Ao meu amigo, Sérgio Romano, fundamental para que fosse possível a realização do meu mestrado e doutorado. Tenho dívida eterna com você por tudo que você fez. Não só agradeço a essencial contribuição, como também a amizade, a paciência e a disponibilidade, pois durante todos esses anos (mestrado e doutorado) Sérgio sempre arranjava um tempo para ver as lâminas (na maioria das vezes, deixava de fazer suas atividades só para ver as lâminas comigo). Muito obrigado por tudo!

À Danielle Braggio, fundamental para que esse trabalho se concretizasse. Devo a Danielle o aprendizado de todos os experimentos realizados nesse estudo. Sempre com paciência e com muita competência, soube transmitir esses ensinamentos e cumprir a missão dada (a missão não era fácil: ensinar um cirurgião a trabalhar na bancada!). Muito obrigado por tudo!

À Anna Flavia, que me ajudou bastante com os experimentos na bancada. Muito obrigado pela importante ajuda.

Aos colaboradores do estudo, Rui Reis, Antônio Talvane de Oliveira Daniel Cubero, Felipe Cruz, Olga Martinho, pela participação no estudo e disponibilização dos casos.

Aos meus amigos da Coordenação de Pesquisa Clinica, Cynthia Bangoim, Luciene Fontes, Joyce Moraes, Fernanda Costas, Mariana Duarte, Maurício Caetano, João de Séllos, Viviane Alves, Vitor Hugo, Cinthya Sternberg, Luiz Henrique, Andreia Melo, Haynna Inada, Isabelle Small, Isabel da Nóbrega pela oportunidade do convivio e pela ajuda incondicional.

À Gustavo Stefanoff, pela disponibilização do laboratório do BNT e pela ajuda.

Aos funcionários da Coordenação de Pesquisa Clinica, Alexandre, Thais, Vera e Sônia, pela atenção e gentileza.

Aos membros da banca examinadora, por terem aceito o convite para participar e pelas contribuições na intenção de melhorar o trabalho.

Ao INCA (Ministério da Saúde) e a empresa Novartis pelo apoio financeiro a esse projeto.

“A felicidade não está em viver, mas em saber viver. Não vive mais o que mais vive, mas o que melhor vive.”

Mahatma Gandhi

RESUMO

Contexto: Apesar dos benefícios do uso do mesilato de imatinibe no tratamento do GIST metastático, observa-se que um número considerável de pacientes (em torno de 75%) evoluem com progressão de doença no curso do tratamento, sendo o desenvolvimento de resistência à droga um problema cada vez mais relevante na prática clínica. Embora alguns preditores de resposta ao mesilato de imatinibe tenham sido identificados, a busca por biomarcadores mais validados tem sido a tônica, pois possibilitará a otimização do tratamento e a busca de novas ferramentas para superar a resistência à droga. **objetivo**: o presente estudo busca investigar o papel de potenciais biomarcadores (Expressão imuno-histoquimica de IGF-1R, PKC theta total e fosforilada e RKIP; perda de heterozigose do gene *KIT*; status mutacional dos genes *KIT*, *PDGFRA* e *BRAF*) como preditores de beneficio clinico ao mesilato de imatinibe em portadores de GIST metastático. **Pacientes e métodos:** Analisamos retrospectivamente 76 portadores de GIST metastático tratados com imatinibe entre 2002 e 2007. Após a exclusão de 13 casos, a análise final foi realizada com 63 pacientes. A expressão imuno-histoquimica de IGF-1R, PKCθ (total e fosforilada) e RKIP e o status mutacional dos genes *KIT*, *PDGFRA* e *BRAF* foram correlacionados com a resposta objetiva ao imatinibe, sobrevida livre de progressão (SLP) e sobrevida global (SG). **Resultados:** O seguimento mediano foi de 31,2 meses (IC 95%, 26,3-36,1). Houve associação estatisticamente significante entre a expressão de IGF-1R e a resposta objetiva ao imatinibe (p=0,05), ou seja, maior expressão de IGF-1R se relacionou à menor taxa de resposta objetiva ao imatinibe. Curiosamente, essa associação ocorreu apenas no grupo feminino (p=0,015) e não no masculino (p=0,5). Porém, a expressão de IGF-1R não teve impacto na SLP nem na SG. Não houve correlação entre a expressão das proteínas PKCθ (total e fosforilada) e RKIP e os desfechos estudados. Portadores de GIST com mutação no éxon 9 do gene *KIT* apresentaram pior SLP quando comparado aos outros tipos de mutação (p=0,027). A análise da perda de heterozigose do gene *KIT* não pôde ser correlacionada com as medidas de desfecho. Não foi identificada mutação no gene *BRAF* nos casos estudados **Conclusões:** A expressão imuno-histoquimica de IGF-1R parece ser um biomarcador preditor de resposta ao imatinibe em portadores de GIST metastático, especialmente no sexo feminino. A presença da mutação no éxon 9 do gene *KIT* pode ser considerado fator prognóstico e preditor de resposta ao imatinibe.

Palavras-chaves: Tumores do estroma gastrointestinal, metástase, imatinibe, IGF-1R, resposta, predição

ABSTRACT

Background: Despite the benefits derived from the use of imatinib mesylate in the treatment of metastatic GIST, it is observed that a considerable number of patients (around 75%) will have disease progression during treatment. Therefore, the development of drug resistance has become a relevant problem in the clinical practice. Although some predictors of response to imatinib have been identified, the recognition of more reliable markers is warranted, as will enable treatment optimization and the search for new tools to overcome drug resistance. **Objective:** The aim of this study is: to investigate the role of potential biomarkers (IGF-1R, total PKCθ, phosphorylated PKCθ and RKIP imunohistochemical expression; Loss of heterozygosity of *KIT* gene; *KIT*, *PDGFRA* and *BRAF* genes mutational status) as predictors of clinical benefit to imatinib treatment in metastatic GIST. **Patients and methods**: We retrospectively reviewed 76 patients with metastatic GIST submitted to imatinib treatment from 2002 to 2007. Over the course of the study, 13 patients initially intended for the study were excluded from further analysis, resulting in a cohort of 63 patients for the final study population. IGF-1R, total PKCθ, phosphorylated PKCθ at Thr538 and RKIP immunohistochemical expression and *KIT* and *PDGFRA* genes mutational status were correlated with objective response to imatinib treatment, progression-free survival (PFS) and overall survival (OS). **Results**: Median follow-up was 31.2 months (95% CI, 26.3-36.1). There was a statistically significant association between IGF-1R expression and the objective response to imatinib treatment (p=0.05), i.e, higher IGF-1R expression was related to lower objective response rate to imatinib therapy. Interestingly, this association was true in females (p=0.015) but not in males (p=0.5). However IGF-1R higher expression did not impact on PFS and OS. There was no association between total PKCθ, phosphorylated PKCθ and RKIP imunohistochemical expression and the endpoints analyzed. Patients with *KIT* Exon 9 mutation tumors had worse PFS than other mutation (p=0.027). Loss of heterozygosity of *KIT* gene could not be correlated with the endpoints variables. No *BRAF* mutations were found. **Conclusion**: IGF-1R immunohistochemical expression seems to be a biomarker for prediction of response to imatinib treatment in metastatic GIST, specially in the female group. *KIT* exon 9 mutation is a prognostic and predictive factor in GIST tumors.

Key words: Gastrointestinal stromal tumor, metastatic, imatinib mesylate, IGF1R, response, prediction

SUMÁRIO

1.Introdução..... 1

1.1 GIST: Bases moleculares..... 2
1.2 Tratamento do GIST na era pré-imatinibe..... 3
1.3 Tratamento do GIST na era imatinibe..... 4
1.3.1 O papel do imatinibe..... 4
1.3.2 Resistência ao imatinibe..... 8
1.3.3 Biomarcadores já identificados: *KIT* e *PDGFRA*..... 8
1.3.4 Potenciais biomarcadores..... 11
1.3.4.1 IGF-1R..... 11
1.3.4.2 PKCθ..... 14
1.3.4.3 RKIP..... 15
1.3.4.4 Perda de Heterozigose (LOH)..... 16
1.3.4.5 *BRAF*..... 17
2.Justificativas..... 19

3.Objetivos..... 21

4.Paciente e Métodos..... 23

4.1 Desenho..... 24
4.2 Amostra-população..... 24
4.3 Variáveis clínico-patológicas..... 25
4.4 Extração de DNA..... 26
4.5 Análise mutacional..... 26
4.5.1 Análise de mutação em *KIT* e *PDGFRA* 26
4.5.2 Análise de mutação em *BRAF* 28
4.6 Análise da expressão de IGF-1R e PKCθ (total e fosforilada) e RKIP..... 29
4.6.1 Construção do TMA..... 29
4.6.2 Imuno-histoquímica..... 30
4.6.3 Análise da expressão imuno-histoquímica 31
4.7 Análise de perda de heterozigose do gene *KIT* e das regiões microsatélites nos cromossomos 1p, 14q, 22q e 17p..... 32
4.8 Análise estatística..... 33
4.9 Considerações éticas..... 34

5.Resultados 35

5.1 Dados demográficos e clínicopatológicos 36
5.2 Mutações nos genes *KIT, PDGFRA* e *BRAF* 36
5.3 Expressão imuno-histoquímica de IGF-1R, PKC θ (total e fosforilada) e RKIP e correlação com os dados clinico-demográficos e mutações..... 37
5.4 Correlação entre expressão imuno-histoquimica e resposta ao imatinibe 38
5.5 Perda de heterozigose do gene *KIT* e das regiões microssatélites nos cromossomos 1p, 14q, 22q e 17p..... 39
5.6 Desfecho clínicos 40

6.Discussão..... 43

7.Conclusões..... 50

8.Perspectivas..... 52

9. Referências..... 54

10.Anexos..... 63

Anexo I – Ficha clínica utilizada para coleta de dados..... 64
Anexo II - Carta de aprovação do projeto no Comitê de ética em Pesquisa do INCA..... 70
Anexo III - Cartas de aprovação das emendas apresentadas..... 71
Anexo IV - Carta de aprovação relatório anual..... 73
Anexo V - Perfil mutacional (genes *KIT* e *PDGFRA*) da amostra estudada..... 74
Anexo VI - Perfil imuno-histoquimico (expressão de IGF-1R, PKCθ total, PKCθ fosforilada e RKIP) da amostra estudada..... 77
Anexo VII – Artigo publicado (Journal of Surgical Research)..... 82

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1- Critérios RECIST (THERASSE, P. *et al*, 2000).....24

Tabela 4.2- Sequência dos oligonucleotideos utilizados para amplificação dos genes *KIT, PDGFRA* e *BRAF*.....29

Tabela 4.3- Especificações dos anticorpos primários utilizados na imuno-histoquimica.....31

Tabela 4.4 – Critérios para classificação da intensidade de marcação das células tumorais.....32

Tabela 5.1 – Características clinicopatológicas e moleculares.....37

Tabela 5.2- Associação entre a expressão de IGF-1R, PKCθ (total e fosforilada), RKIP e Sobrevida Livre de Progressão (SLP), Sobrevida Global(SG) e Resposta Objetiva à terapia com imatinibe. 41

Tabela 5.3- Associação entre a expressão dos 4 marcadores (IGF-1R, PKCθ total, PKCθ fosforilada e RKIP) em forma de painel e a Resposta Objetiva à terapia com imatinibe……41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1- Vias de sinalização dos receptores KIT e PDGFRA no GIST (BRAGGIO, D., 2010) 5

Figura 1.2- Mecanismo de ação do imatinibe. (A) Ativação da sinalização celular através da ligação do ATP ao sitio de ativação dos receptores KIT ou PDGFRA. (B) Inibição da via de sinalização celular por meio da competição do imatinibe ao sitio de ativação dos receptores KIT ou PDGFRA (local onde o ATP se ligaria) (BRAGGIO, D., 2010).....6

Figura 1.3- Via de sinalização de IGF-1R. Adaptado de Pantaleo *et al* (PANTALEO, M. *et al*, 2010).....13

Figura 1.4- Via de sinalização da proteína PKCθ ativada pelo receptor KIT ou PDGFRA (BRAGGIO, D., 2010).....15

Figura 1.5- Vias de sinalização de PKCθ e RKIP (KOLCH, W., 2000).....16

Figura 1.6- As múltiplas interações entre as vias de sinalização das moléculas IGF-1R, PKCθ, RKIP e BRAF no GIST. Adaptado de Pantaleo *et al* (PANTALEO, M. *et al*, 2010) e Kolch (KOLCH, W., 2000).....18

Figura 5.1- Cromatograma evidenciando mutação no éxon 11 do gene *KIT* / V559D 38

Figura 5.2- Expressão imuno-histoquimica (expressão forte) das proteínas estudadas. A: IGF-1R, B: RKIP, C: PKC θ total e D:PKC θ fosforilada 39

Figura 5.3- Eletroferograma evidenciando a perda de heterozigose do gene *KIT* (Marcador HK 8810) (análise pelo bioanalizador Agilent 2100) 40

Figura 5.4- Estimativa da curva de Sobrevida (Kaplan-Meier) relacionando o local da mutação no gene *KIT* e a Sobrevida Livre de Progressão (SLP).....42

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
AKT	Proteína AKT
ATP	Adenosina trifosfato
BCR-ABL	Breakpoint-cluster region-Abelson Tyrosine Kinase
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
C	Citosina
DAB	3,3'tetrahidroclorídrico diaminobenzina
DNA	Sigla em inglês para ácido desoxirribonucléico (Deoxyribonucleic acid)
dNTP	Sigla em inglês para Desixirribonucleotideo trifosfato
EDTA	Sigla em inglês para Ácido etilenodiamino tetra-acético
EORTC	Sigla em inglês para organização européia para pesquisa e tratamento do câncer (European Organization for Research and Treatment of Cancer)
ER alpha	Sigla em inglês para Receptor estrogênico alfa (Estrogen Receptor Alpha)
ERK	Sigla em inglês para Quinase regulada por sinal extracelular (Extracellular-signal-regulated Kinase)
FLT3	Receptor Tirosina Quinase 3 semelhante a FMS
G	Guanina
GIST	Sigla em inglês para tumor estromal gastrointestinal (Gastrointestinal Stromal Tumor)
IGF	Sigla em inglês para fator de crescimento semelhante a insulina (Insulin-like Growth Factor)
IGF-1R	Sigla em inglês para receptor tipo 1 do fator de crescimento semelhante a insulina (Type 1 Insulin-like Growth Factor Receptor)

INCA	Instituto Nacional de Câncer
IRS-1	Sigla em inglês para Substrato 1 do receptor de insulina (Insulin Receptor Substrate 1)
KIT	Receptor tirosina quinase
KIT	Gene *KIT*
LOH	Sigla em inglês para perda de heterozigose (Loss of Heterozigosity)
MAPK	Sigla em inglês para proteína quinase ativada por mitógenos (Mitogen- activated protein kinase)
MEK	Mitogen- activated protein kinase kinase
PBS	Solução salina de tampão fosfato
PCR	Sigla em inglês para reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction)
PDGFRA	Sigla em inglês para receptor alfa do fator de crescimento derivado das plaquetas (platelet derived growth factor receptor alpha)
PDGFRA	Gene *PDGFRA*
PET	Sigla em inglês para tomografia com emissão de pósitrons (Positron Emission Tomography)
PKC θ	Proteína quinase C Teta
RAF	Proteína RAF
RAS	Proteína RAS

RECIST	Sigla em inglês para critérios de avaliação de resposta em tumores sólidos (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors)
RKIP	Sigla em inglês para Proteína Inibidora da RAF Quinase (RAF Kinase Inhibitor Protein)
SG	Sobrevida Global
SLP	Sobrevida Livre de Progressão
T	Timina
TBE	Tampão Tris, Borato,EDTA
TE	Tampão Tris,EDTA
TMA	Sigla em inglês para Tissue Microarray
WT	Sigla em inglês para Wild Type (selvagem)

1.Introdução

1.Introdução

1.1 GIST: Bases moleculares

O proto-oncogene *KIT* apresenta 21 éxons e codifica uma proteína transmembrana de peso molecular de 145.000 kD (RUBIN, B. *et al*, 2001). Essa proteína é estruturalmente dividida em três regiões: uma região de ligação extracelular, uma região transmembrana e uma região intracelular que contém os domínios justamembrana e o de tirosina quinase (RUBIN, B. *et al*, 2001). O receptor KIT é um membro da família dos receptores de tirosina quinase da sub-classe III que inclui dois outros membros, FLT3 e PDGFR. A interação do ligante (Fator de Crescimento de Células-Tronco - stem cell factor) ao receptor KIT resulta em autofosforilação nas tirosinas localizadas na região intracelular, seguida pela fosforilação de proteínas comprometidas com várias vias de sinalização responsáveis pelos mecanismos de proliferação celular (RUBIN, B. *et al*, 2001)(CORLESS, C.; FLETCHER, J.; HEINRICH, M., 2004). A maioria dos GISTs apresenta mutação com ganho de função no gene *KIT*, resultando em ativação constitutiva do receptor KIT (HIROTA, S. *et al*, 1998) (RUBIN, B. *et al*, 2001)(CORLESS, C.; FLETCHER, J.; HEINRICH, M., 2004). Esse receptor KIT continuamente ativado não necessita da ligação ao Fator de Crescimento de Células-Tronco para dimerização e autofosforilação, logo, há um desequilíbrio no ciclo celular, impedindo a apoptose e estimulando a proliferação celular (RUBIN, B. *et al*, 2001)(CORLESS, C.; FLETCHER, J.; HEINRICH, M., 2004). Figura 1.1 ilustra os mecanismos relacionados a via de sinalização dos receptores KIT e PDGFRA no GIST.

Apesar da elevada frequência na qual a mutação oncogênica do gene *KIT* é encontrada nos GIST, uma porcentagem desses tumores apresenta o gene *KIT* selvagem. Foi demonstrado que alguns tumores que não apresentam mutação no gene *KIT*, podem apresentar mutações no gene que codifica outro receptor tirosina quinase, conhecido como PDGFRA (receptor alfa do fator de crescimento derivado de plaqueta) (HEINRICH, M. *et al*, 2003) (CORLESS, C. *et al*, 2005). A frequência de mutação em *PDGFRA* varia entre 5% e 7% (CORLESS, C. *et al*, 2005). A sinalização celular consequente à ativação da via de PDGFRA é indistinguível daquela consequente à ativação da via KIT. E,

provavelmente, isso explica porque a ocorrência de mutação nos dois genes em GIST é mutuamente exclusiva (HEINRICH, M. *et al*, 2003). Ambos receptores ativam as vias Ras/MAPK e PI3k/AKT, culminando na proliferação e aumento da sobrevida celular, como demonstrado na Figura 1.1 (RUBIN, B.; HEINRICH, M.; CORLESS, C., 2007).

1.2 Tratamento do GIST na era pré-imatinibe

O conhecimento gerado nos últimos anos acerca dos mecanismos moleculares envolvidos na patogênese do GIST (HIROTA, S. *et al*, 1998) foi responsável por sua identificação como entidade clínica distinta e pela compreensão de seu comportamento biológico. O melhor conhecimento sobre sua história natural permitiu observar que a cirurgia representa a única modalidade terapêutica capaz de conferir cura, porém, utilizada isoladamente, apresenta resultados desanimadores (DEMATTEO, R. *et al*, 2000)(VALADÃO, M. *et al*, 2009).

O acompanhamento de longo prazo de portadores de GIST de alto risco submetidos à ressecção cirúrgica indica que a cirurgia isolada geralmente não é capaz de proporcionar cura, pois 85% a 90% desses casos irão evoluir de maneira não favorável (recidiva, metástase ou morte)*(*FLETCHER, C.D*. et al*, 2002)(LEHNERT, T., 1998). A presença da recidiva é freqüente, apesar da ressecção cirúrgica completa do tumor primário. Na experiência do MD Anderson Cancer Center, somente 10% dos doentes estavam livres de doença após longo acompanhamento (mais de 10 anos) (NG, E. *et al*, 1992). O padrão inicial de recidiva envolve, predominantemente, o peritônio e o fígado. Na casuística do Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, 40% dos doentes submetidos à ressecção completa desenvolveram recidiva, tendo o peritônio envolvido em 50% dos casos e o fígado em 75%. A sobrevida mediana dos portadores de recidiva foi de 15 meses (MUDAN, S. *et al*, 2000).

O resgate cirúrgico deve ser empregado sempre que seja constatada doença ressecável (VALADÃO, M.; LINHARES, E., 2009), porém, praticamente todos esses doentes irão desenvolver recidivas subseqüentes apesar da ressecção macroscópica completa dessas lesões (MUDAN, S. *et*

al, 2000). A recidiva peritoneal, geralmente, permite a ressecção completa do tumor, porém a recorrência hepática usualmente se apresenta como doença difusa intra-hepática, impedindo a abordagem cirúrgica.

A identificação dos fatores prognósticos responsáveis pelos resultados insatisfatórios da cirurgia isolada tornou-se, assim, assunto de fundamental importância (VALADÃO, M. *et al*, 2006), pois essas informações podem proporcionar a estratificação de grupos de pior prognóstico (alto risco para recidiva ou menor sobrevida), permitindo o reconhecimento desses pacientes e a possibilidade de adoção de novas opções terapêuticas (EISENBERG, B.; JUDSON, I., 2004)(VALADÃO, M. *et al*, 2006), otimizando os resultados da cirurgia e aumentando as chances de cura para os portadores desta neoplasia. Dos inúmeros fatores prognósticos estudados na literatura, o tamanho tumoral (avaliado em centímetros) e o índice mitótico (avaliado pelo número de mitoses por 50 campos de grande aumento)(FLETCHER, C.D. *et al*, 2002) são, atualmente, os mais largamente utilizados na prática clínica (LINHARES, E.; VALADÃO, M., 2006).

Quanto ao tratamento da doença à distância, a abordagem cirúrgica está restrita a número limitado de casos, haja vista que a grande maioria dos pacientes com doença metastática apresenta disseminação extensa, impossibilitando a ressecção tumoral. Diante desse fato, alguns tipos de tratamento foram utilizados para controlar doença metastática, como quimioterapia sistêmica ou intraperitoneal e a quimioembolização hepática, porém os resultados alcançados se mostraram desanimadores devido a baixa taxa de resposta (PIDHORECKY, I. *et al*, 2000).

1.3 Tratamento do GIST na era imatinibe

1.3.1 O papel do imatinibe

A descoberta de que o gene *KIT* tem papel importante na patogênese do GIST (HIROTA, S. *et al*, 1998) foi fundamental para a evolução do tratamento dessa neoplasia.

Esse novo conhecimento propiciou o desenvolvimento do STI571 (mesilato de imatinibe [Glivec®]; Novartis, Basel, Suíça), revolucionando o tratamento do câncer por ser a primeira terapia a agir especificamente na

alteração molecular responsável pela etiologia do câncer. O imatinibe é um inibidor competitivo de determinadas tirosinas quinases como BCR-ABL, KIT e PDGFRA (CARROLL, M. *et al*, 1997)(BUCHDUNGER, E. *et al*, 2000). A molécula compete com o sítio de ligação do ATP ao receptor tirosina quinase KIT ou PDGFRA e previne a fosforilação dos substratos da enzima, evitando a sinalização para o núcleo e possibilitando um aumento do estímulo pró-apoptótico, redução da proliferação e da sobrevida das células tumorais (RUBIN, B.; HEINRICH, M.; CORLESS, C., 2007). Figura 1.2 ilustra o mecanismo de atuação do mesilato de imatinibe.

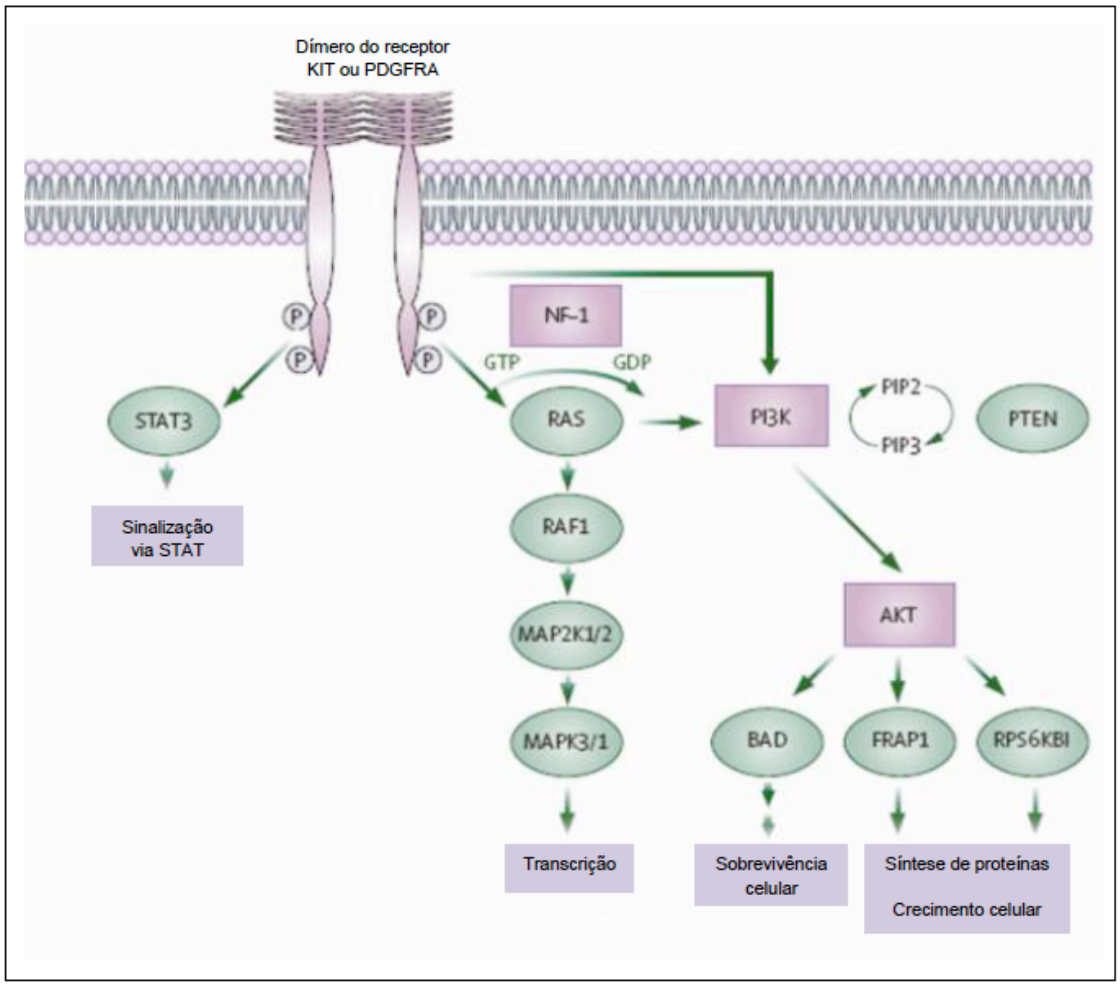


Figura 1.1- Vias de sinalização dos receptores KIT e PDGFRA no GIST (BRAGGIO, D., 2010)

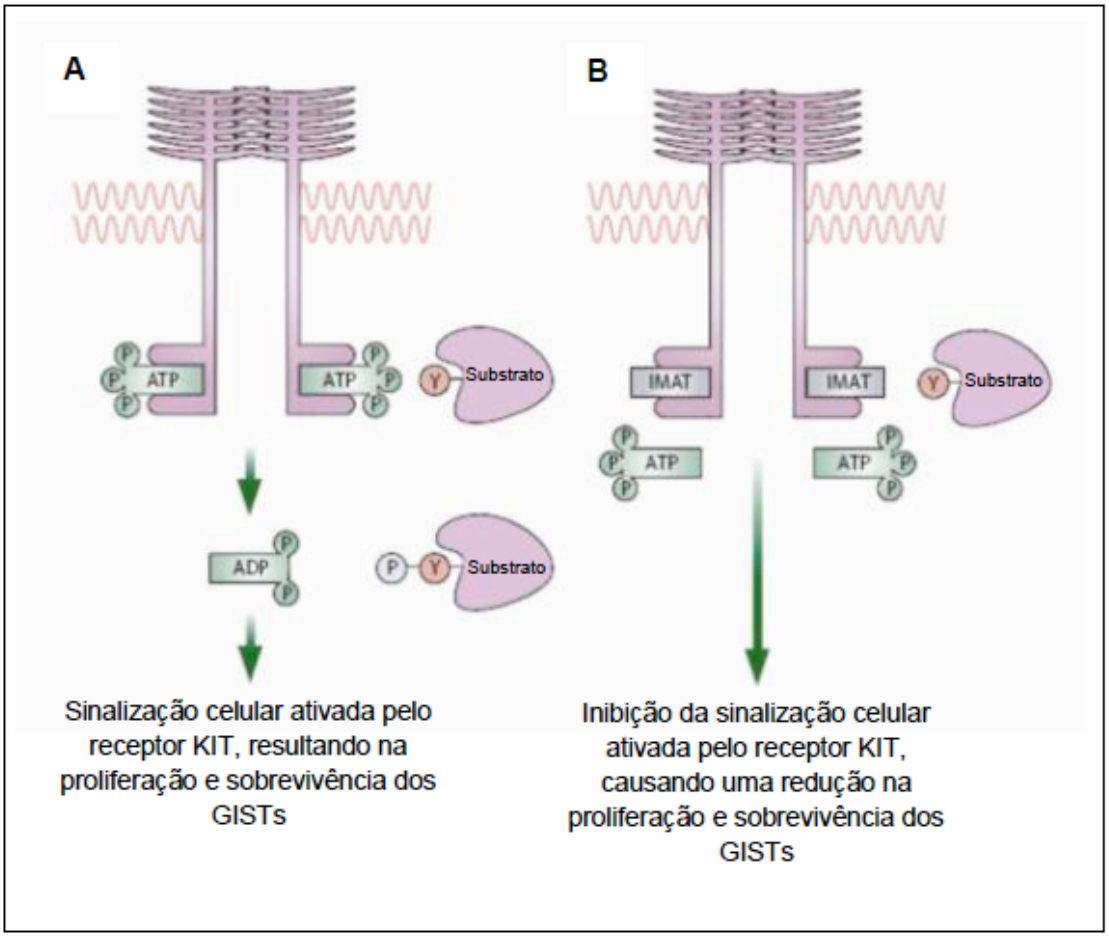


Figura 1.2- Mecanismo de ação do imatinibe. (A) Ativação da sinalização celular através da ligação do ATP ao sitio de ativação dos receptores KIT ou PDGFRA. (B) Inibição da via de sinalização celular por meio da competição do imatinibe ao sitio de ativação dos receptores KIT ou PDGFRA (local onde o ATP se ligaria) (BRAGGIO, D., 2010).

O conhecimento de mutações (com ganho de função do gene *KIT*) na gênese e progressão do GIST suscitou os ensaios clínicos utilizando o mesilato de imatinibe. Inicialmente utilizada no tratamento da leucemia mielóide crônica com grande sucesso, o STI571 começou a ser empregado no tratamento dos GIST. O primeiro relato de tratamento do GIST com STI571 foi em fevereiro de 2000 na Finlândia (JOENSUU, H. *et al*, 2001). A paciente apresentava doença disseminada na cavidade abdominal, tendo insucesso com várias outras modalidades terapêuticas. O tumor expressava a proteína KIT (imuno-histoquímica positiva para CD117) e continha

mutação no éxon 11 do gene *KIT*. Em algumas semanas de tratamento, houve resposta dramática, mensurada por tomografia, PET-scan e biópsias seriadas do tumor. Histologicamente, o tumor foi substituído por degeneração mixóide e fibrose (JOENSUU, H. *et al*, 2001).

Os resultados encorajadores com o primeiro caso levaram à implementação de estudos fase I e II, confirmando sua atividade (DEMETRI, G. *et al*, 2002)(VAN OOSTEROM, A. *et al*, 2001). O estudo fase I, realizado pela EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer) (VAN OOSTEROM, A. *et al*, 2001), compreendendo 36 doentes, concluiu que a maior dose tolerada de mesilato de imatinibe era de 400mg duas vezes ao dia, tendo atividade significante nos doentes com GIST avançado, além do que essa terapia não beneficiava portadores de outros tipos de sarcomas que não expressavam KIT. Baseado nesse estudo fase I, foi realizado um estudo multicêntrico fase II sobre a utilização do mesilato de imatinibe para o tratamento do GIST irressecável ou metastático (DEMETRI, G. *et al*, 2002). Tal estudo randomizou 147 doentes para receber 400 ou 600mg/dia da droga. Ocorreu toxicidade grau 3 ou 4 (hemorragia, dor abdominal, distúrbio eletrolítico) em 21,1% dos casos. O acompanhamento mediano foi de 288 dias, a taxa de resposta parcial (diminuição de pelo menos 50% do tamanho da lesão) ocorreu em 53,7% e a estabilização da doença ocorreu em 27,9%. Houve progressão em 13% dos casos. O tempo médio de resposta objetiva foi de 13 semanas e não houve diferença significante em toxicidade e resposta entre o grupo que utilizou 400mg e o que utilizou 600mg.

Devido à eficácia desse tratamento constatada em estudos fase I e II, foram realizados estudos fase III comparando o uso do mesilato de imatinibe em doses de 400 e 800mg/dia em portadores de GIST metastático. O estudo europeu multicêntrico (VERWEIJ, J. *et al*, 2004) randomizou 946 doentes (portadores de GIST metastático) com a finalidade de comparar a sobrevida livre de progressão entre o grupo que utilizou 400mg/dia e 800mg/dia de mesilato de imatinibe. Os resultados desse trabalho evidenciaram que a resposta clínica foi semelhante entre os grupos e que a dose de 800mg/dia promoveu significativo aumento na sobrevida livre de progressão.

1.3.2 Resistência ao imatinibe

Embora o mesilato de imatinibe seja efetivo para maioria dos pacientes com GIST avançado, o desenvolvimento de resistência à droga tem se tornado um problema crescente (HEINRICH, M. , 2006)**.** A resistência pode ocorrer de forma precoce (aparecimento antes de 180 dias de tratamento e sem resposta objetiva inicial) ou tardia (aparecimento após 180 dias de tratamento e/ou progressão após resposta objetiva inicial). A taxa de resistência precoce tem sido reportada entre 10% e 26% (DEBIEC-RYCHTER, M. *et al*, 2004)(VERWEIJ, J. *et al*, 2004)(BLANKE, C.D. *et al*, 2008). Porém, a grande maioria dos pacientes que inicialmente respondem ao mesilato de imatinibe irá evoluir com progressão de doença (HEINRICH, M., 2006). Estudos clínicos fase II/III demonstraram que a sobrevida livre de progressão (mediana) é em torno de 20 a 24 meses (VAN OOSTEROM, A. *et al*, 2001)(DEMETRI, G. *et al*, 2002)(VERWEIJ, J. *et al*, 2004)(BLANKE, C.D. *et al*, 2008).

1.3.3 Biomarcadores já identificados: *KIT* e *PDGFRA*

Um biomarcador é definido como uma característica específica que é passível de mensuração e indica um processo biológico normal, patogênico ou de resposta a alguma abordagem terapêutica (BIOMARKERS DEFINITIONS WORKING GROUP, 2001). Às informações fornecidas por marcadores moleculares em oncologia somam-se os índices clínicos, laboratoriais, de imagem e histológicos e esses se relacionam com maior ou menor agressividade tumoral, ou seja, se relacionam com o prognóstico. Já os marcadores preditivos estão ligados à resposta ao tratamento e, portanto, guiam a decisão terapêutica. A identificação de biomarcadores preditores de resposta é fundamental para que se possa ter uma prática clinica embasada nos mecanismos fisiopatológicos relacionados à doença em questão, contribuindo para a otimização dos resultados.

No GIST, tem sido demonstrado que a resposta ao mesilato de imatinibe é influenciada pelo tipo de mutação encontrada (CORLESS, C.; FLETCHER, J.; HEINRICH, M., 2004). Um estudo multicêntrico fase II (HEINRICH, M. *et al*, 2003) avaliou a correlação entre o tipo de mutação e a

resposta clínica ao mesilato de imatinibe, alocando 127 portadores de GIST metastático tratados com 400mg ou 600mg ao dia. Nesse estudo, a freqüência da mutação do gene *KIT* foi de 88,2% (112 pacientes) e do gene *PDGFRA* de 4,7% (6 pacientes). A taxa de resposta parcial foi significativamente maior (83,5%) nos portadores de GIST com mutação no éxon 11 do gene *KIT* quando comparada a dos tumores com mutação no éxon 9 do gene *KIT* (47,8%, p=0,0006) ou com mutação no gene *PDGFRA* (0,0%, p<0,0001). Utilizando-se mesilato de imatinibe, os portadores da mutação no éxon 11 do gene *KIT* também tiveram maior sobrevida livre de doença e maior sobrevida global quando comparados aos pacientes com outros tipos de mutação (p<0,004). Os investigadores também realizaram teste de sensibilidade *in vitro* com linhagens celulares originadas de GIST com diferentes tipos de mutações, sendo evidenciado que as mutações do gene *KIT* (éxons 11,9, 13 e 17) e mutações do gene *PDGFRA* (éxon 12 e alguns tipos de mutação no éxon 18) conferiam sensibilidade ao mesilato de imatinibe. Porém, a linhagem com mutação *PDGFRA* mais freqüentemente encontrada, no éxon 18 (D842V), se mostrou resistente ao mesilato de imatinibe. Esses achados *in vitro* tiveram correlação com os achados clínicos, uma vez que nenhum dos 3 pacientes com mutação *PDGFRA* D842V apresentou resposta clínica (HEINRICH, M. *et al*, 2003).

Um segundo estudo (DEBIEC-RYCHTER, M. *et al*, 2004) incluiu 37 pacientes portadores de GIST alocados nos ensaios fase I e fase II da EORTC, com o objetivo de avaliar o papel do tipo de mutação na resposta ao mesilato de imatinibe. Pacientes com mutação *KIT* éxon 11 obtiveram maior chance de apresentar resposta parcial (83%) quando comparados aos pacientes com mutação *KIT* éxon 9 (25%), *KIT* éxon 13 (0%), *PDGFRA* éxon 18 (0%) ou sem mutação (33%). Pacientes com mutação em *KIT* cursaram com maior sobrevida mediana e menor chance de progressão de doença durante o tratamento com mesilato de imatinibe quando comparados aos portadores de mutação em *PDGFRA* ou nos casos sem mutação.

O estudo randomizado fase III do Grupo de Estudo de Sarcoma (Sarcoma Group Study S0033) investigou a relação entre o tipo de mutação (*KIT* ou *PDGFRA*) e a resposta clínica ao mesilato de imatinibe, utilizando

doses diária de 400mg e 800mg em 746 pacientes (BLANKE, C.D. *et al*, 2008). Mutação *KIT* e *PDGFRA* foram encontradas em 86,4% e 1% dos casos respectivamente. Pacientes com mutação *KIT* éxon 11 demonstraram resposta objetiva (67%) mais freqüentemente que os portadores de mutação *KIT* éxon 9 (40%) e que os sem mutação *KIT* (39%, p=0,0022). Não houve diferença estatisticamente significante na taxa de resposta entre os portadores de diferentes mecanismos de mutação *KIT* éxon 11 (mutação pontual versus deleção/inserção). A análise multivariada nesse estudo evidenciou que a mutação *KIT* éxon 11 foi o melhor preditor de resposta objetiva, além de conferir maior sobrevida livre de doença (576 dias) quando comparada à mutação *KIT* éxon 9 (308 dias) ou sem mutação (251 dias) (p=0,0012). Ainda nesse estudo, a dose do mesilato de imatinibe não teve influência no grau de resposta objetiva nos GIST portadores de diferentes tipos de mutação.

Recentemente, o nosso grupo analisou a freqüência de mutações no gene *KIT* e em *PDGFRA* em um grupo de 55 portadores de GIST ressecados cirurgicamente no INCA e em outros centros do Brasil. A freqüência encontrada foi de 74,5% para o gene *KIT* e 7,3% para o gene *PDGFRA* (BRAGGIO, E. *et al*, 2010), semelhantes àquelas encontradas em outros estudos (HEINRICH, M. *et al*, 2003)(DEBIEC-RYCHTER, M. *et al*, 2004)(HEINRICH, M., 2006). Não foi demonstrada, no entanto, associação entre a presença de mutação e a agressividade do tumor avaliada pelo risco de apresentar metástase, utilizando a classificação descrita por Fletcher *et al* (FLETCHER, C.D. *et al*, 2002). Entretanto, não é conhecido, no nosso meio, o impacto do *status* de mutação dos genes *KIT* e *PDGFRA* como fator de predição de resposta terapêutica ao inibidor de tirosina quinase.

A resistência precoce está mais comumente associada à presença de mutação *KIT* éxon 9, *PDGFRA* D842V e à ausência de mutação *KIT*/*PDGFRA* (GIST tipo selvagem)(HEINRICH, M. *et al*, 2003)(DEBIEC-RYCHTER, M. *et al*, 2004). Nos casos do GIST com mutação *KIT* éxon 9 ou no tipo selvagem (sem mutação), a hipótese é que a resistência ao mesilato de imatinibe ocorra devido a anormalidades moleculares intrínsecas presentes no tumor antes do inicio da terapia (HEINRICH, M., 2006). Esses

tumores apresentam menor dependência da sinalização do receptor KIT para proliferação celular e anulação da apoptose, adaptando-se mais facilmente às condições de inibição do receptor KIT. Nos casos de GIST com mutação envolvendo o códon 842 de *PDGFRA*, a hipótese é que apesar desses tumores dependerem da ativação do gene *PDGFRA*, essa mutação resulta em uma conformação do receptor PDGFRA resistente ao mesilato de imatinibe (CORLESS, C. *et al*, 2005), fato corroborado pela evidência de desenvolvimento de resistência na presença de mutação secundária D842V (DEBIEC-RYCHTER, M. *et al*, 2005).

A resistência tardia é mais comumente associada à aquisição de mutações secundárias do gene *KIT*, principalmente nos GIST que apresentam mutação primária no éxon 11. Mutações secundárias também ocorrem nos tumores com mutação *KIT* éxon 9, porém em uma freqüência bem menor (DEBIEC-RYCHTER, M. *et al*, 2005). As mutações secundárias ocorrem em duas regiões do gene *KIT*: o sítio de ligação ATP/mesilato de imatinibe da proteína (éxons 13 e 14) e na alça de ativação do KIT (éxon 17). Essas mutações impedem a ligação da droga ao receptor KIT, seja alterando diretamente o sítio de ligação ou estabilizando o receptor em sua conformação ativada (o mesilato de imatinibe só é capaz de se ligar ao receptor KIT em sua conformação inativada)(MOL, C. *et al*, 2004).

Amplificações do locus *KIT* têm sido descritas como evento infreqüente em GIST com resistência secundária ao mesilato de imatinibe. Teoricamente, quando essas amplificações são acompanhadas de super expressão do KIT, resultariam em progressão de doença com dose padrão de mesilato de imatinibe (ANTONESCU, C.R. *et al*, 2005)(DEBIEC-RYCHTER, M. *et al*, 2005).

1.3.4 Potenciais biomarcadores

1.3.4.1 IGF-1R

Mecanismos moleculares de resistência independentes dos receptores KIT incluem mutações ativadoras ou ativação direta de receptores tirosina quinase que utilizam a mesma via de sinalização que o KIT (exemplos:

PI3K/AKT), aumento do metabolismo do mesilato de imatinibe ou desenvolvimento de resistência multi-drogas (GRAMZA, A.; CORLESS, C.; HEINRICH, M., 2009). Em alguns casos, esses mecanismos podem estar associados à deleção do locus *KIT* e/ou perda da expressão do KIT (GRAMZA, A.; CORLESS, C.; HEINRICH, M., 2009).

Recentemente, outros mecanismos moleculares têm sido descritos no GIST. A via de sinalização do receptor IGF-1R (Receptor tipo 1 do Fator de Crescimento semelhante a insulina) tem tido crescente destaque como mecanismo molecular no GIST, devido à sua importante função de controle da proliferação celular e da apoptose (PANTALEO, M. *et al*, 2010). IGF-1R é um receptor tirosina quinase que se liga tanto a IGF1 e IGF2, formando o complexo IGF (Insulin-like Growth Factor- Fator de Crescimento semelhante à insulina). A ativação do receptor IGF-1R por meio da formação do complexo IGF (ligação de IGF1 e IGF2 ao receptor IGF-1R) desencadeia uma cascata de sinalização intracelular por meio das vias PI3-K/AKT/mTOR e RAF-1/MEK/MAPK, sendo responsável por funções celulares importantes, como proliferação, sobrevivência e desenvolvimento de metástase (SAMANI, A. *et al*, 2007). Figura 1.3 ilustra a via de sinalização do receptor IGF-1R.

A expressão do complexo IGF (Insulin-like Growth Factor) tem sido reconhecida como marcador de pior prognóstico (BRACONI, C. *et al*, 2008) e como possível mecanismo relacionado à resistência ao mesilato de imatinibe (BELINSKY, M.G. *et al*, 2008). Braconi *et al* (BRACONI, C. *et al*, 2008) observaram que a expressão aumentada de IGF1 e IGF2 se correlacionou com sobrevida livre de doença em 94 portadores de GIST, ou seja, os tumores com expressão aumentada desses marcadores apresentavam um risco maior de recidiva. Estudos recentes têm sugerido que a via de sinalização intracelular dependente de IGF tem sido implicada na patogênese de diversos tumores (MILLER, B.; YEE, D., 2005)(SAMANI, A. *et al*, 2007), inclusive nos GIST (TRENT, J. *et al*, 2006)(TARN, C. *et al*, 2008). Além disso, existe um racional para se pensar que a expressão do complexo IGF possa representar não só um possível preditor de resposta ao mesilato de imatinibe, como também um potencial alvo terapêutico. Tarn *et*

al (TARN, C. *et al*, 2008) evidenciaram que havia expressão aumentada do receptor IGF-1R (Receptor tipo 1 do fator de crescimento semelhante a insulina) nos GIST selvagem (Wild type) quando comparados aos GIST que apresentavam mutação no gene *KIT* ou *PDGFRA*. Esses achados poderiam explicar o porquê dos GIST selvagens responderem pior ao mesilato de imatinibe, ou seja, é possível que esse subgrupo de tumores utilize outra via de sinalização, independente de KIT, que assegure a sobrevivência da célula tumoral.

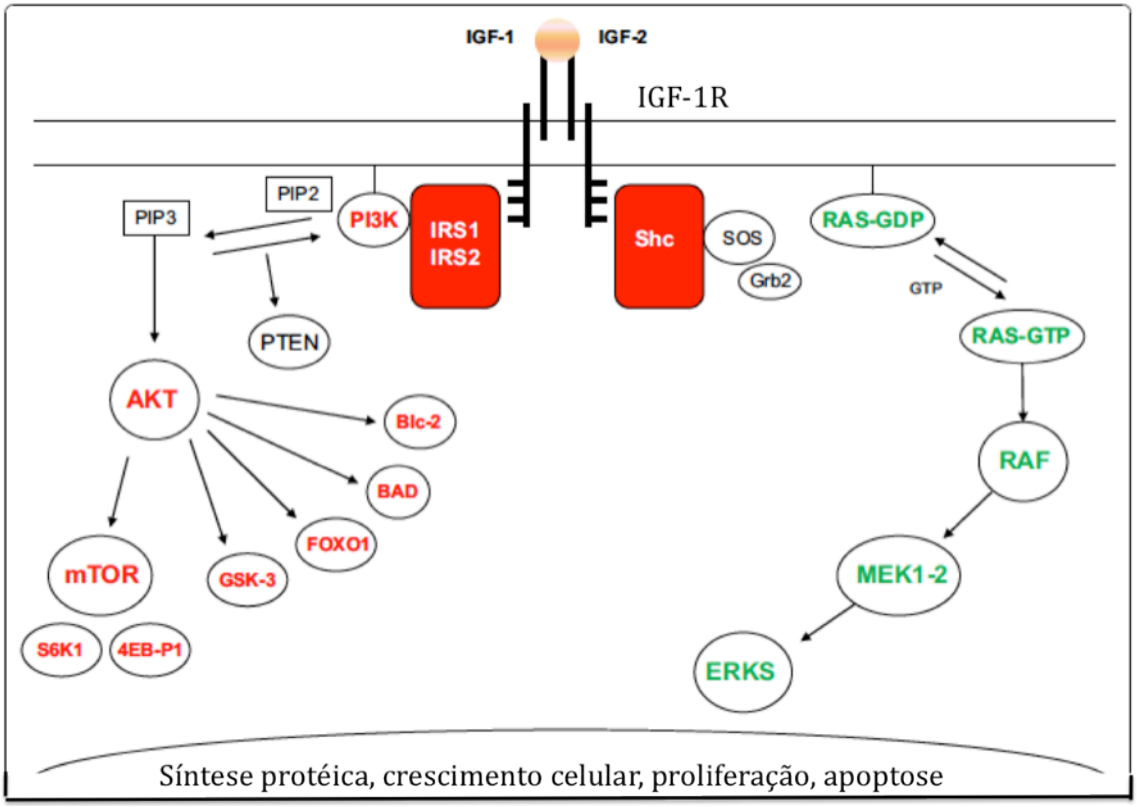


Figura 1.3- Via de sinalização de IGF-1R. Adaptado de Pantaleo *et al* (PANTALEO, M. *et al*, 2010).

A hipótese da existência de uma via alternativa é reforçada pelo achado de que, após o tratamento com mesilato de imatinibe, há inibição de AKT nas células de GIST, porém a via MAPK continua ativa (TARN, C. *et al*, 2008). É possível que a via IGF seja responsável por esse mecanismo de resistência ao mesilato de imatinibe. Os mesmos autores evidenciaram que

o uso do inibidor de IGF-1R (chamado NVP-AEW541) reduziu a autofosforilação estimulada por ligante de IGF-1R em linhagens celulares de GIST (T1 e 882) sem afetar o nível de fosfo-KIT, além de reduzir a fosforilação de moléculas da cascata de sinalização como AKT, MAPK e GSKB (TARN, C. *et al*, 2008).

1.3.4.2 PKCθ

Um outro marcador molecular, PKCθ, tem sido apontado como possível alvo de drogas inibidoras de tirosina quinase (ZHU, M. *et al*, 2007) e potencial marcador de resistência ao imatinibe. A proteína PKCθ é uma nova isoforma da família PKC, a qual faz parte da família das serina/treonina quinases, cuja função está relacionada à regulação de diversas atividades celulares como proliferação, transcrição e apoptose (SUN, Z. *et al*, 2000)(ALTMAN, A.; VILLALBA, M., 2003). PKCθ atua na célula através da ativação das vias de sinalização de Ras/MAPK e de PI3K/AKT (ALTMAN, A.; VILLALBA, M., 2002) (Figura 1.4) e sua inibição resulta na parada do ciclo celular independente de p53 em diferentes linhagens celulares, incluindo células mesenquimais (DEEDS, L. *et al*, 2003). Sua modulação parece estar relacionada à ativação de PI3K e da fosfolipase C γ mediada pela ativação de KIT e de PDGFRA (ALTMAN, A.; VILLALBA, M., 2003) (Figura 1.4).

A proteína PKCθ tem sido reconhecida como possível marcador diagnóstico em GIST. Duensing *et al* (DUENSING, A. *et al*, 2004), estudando 27 GIST e 40 tumores histologicamente semelhantes ao GIST, evidenciaram forte expressão da proteína PKCθ na maioria dos GIST e a não expressão nos outros tumores. Kim *et al* (KIM, K. *et al*, 2006) demonstraram expressão de PKCθ em 96% dos 220 casos de GIST analisados.

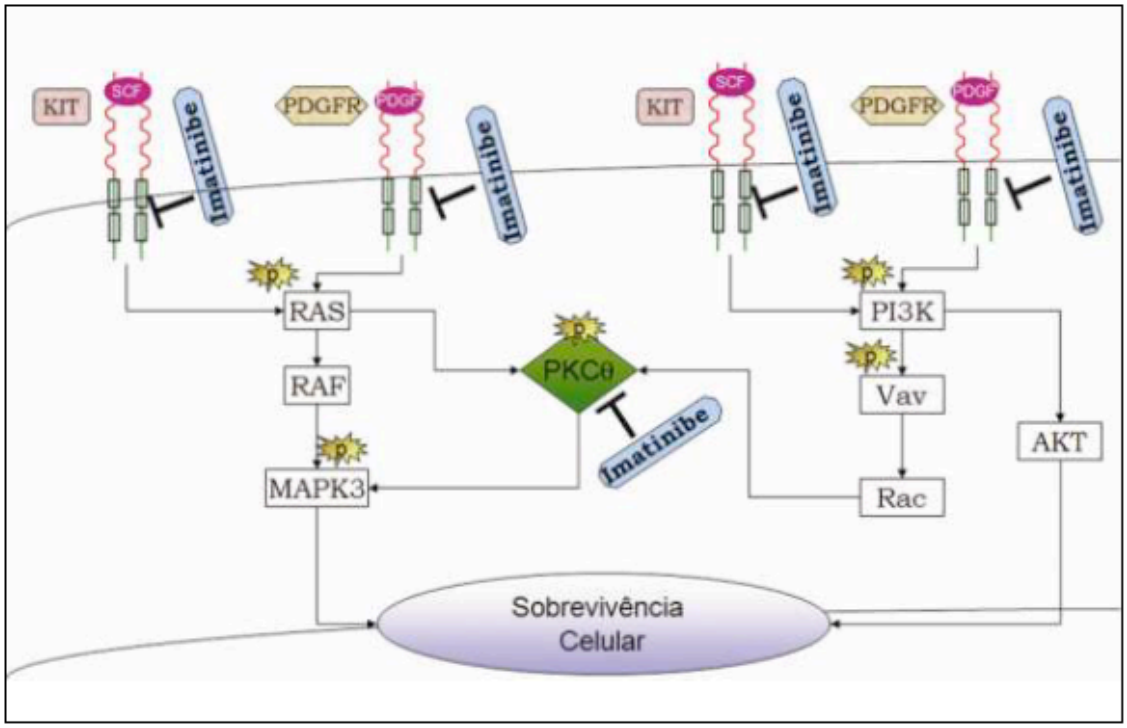


Figura 1.4- Via de sinalização da proteína PKCθ ativada pelo receptor KIT ou PDGFRA (BRAGGIO, D., 2010).

Além da importância diagnóstica, sua relevância terapêutica tem sido postulada com base no estudo de Zhu *et al* (ZHU, M. *et al*, 2007) que evidenciaram, em linhagens celulares de GIST, a inibição da fosforilação de PKCθ por mesilato de imatinibe e PKC412, um outro inibidor de tirosina quinase. Esses mesmos autores postularam que a expressão e ativação de PKCθ são cruciais para sobrevida e proliferação das células tumorais de GIST. A partir desses achados, fica clara a importância de se estudar o impacto clínico da expressão da proteína PKCθ e, principalmente, da de suas formas ativada e fosforilada como preditoras de resposta ao mesilato de imatinibe.

1.3.4.3 RKIP

Outro potencial biomarcador, a proteína inibidora da Raf quinase (RKIP) foi originalmente identificada como um inibidor endógeno da via RAS/RAF/MEK/ERK, interferindo na fosforilação e ativação da MEK através da Raf-1 (YEUNG, K. *et al*, 1999). Há evidências de que a RKIP exerce importante

papel na regulação da atividade e na mediação das relações entre diversas vias de sinalização celular, incluindo diferenciação celular, ciclo celular, apoptose e migração celular (KLYSIK, J. *et al*, 2008) (Figura 1.5). Além disso, a redução da atividade da RKIP tem sido descrita em diversos tumores (KLYSIK, J. *et al*, 2008), inclusive no GIST (MARTINHO, O. *et al*, 2009). Martinho *et al* (MARTINHO, O. *et al*, 2009) evidenciaram que a perda da expressão da RKIP estava associada a pior sobrevida câncer-específica e à necrose tumoral nos GISTs.

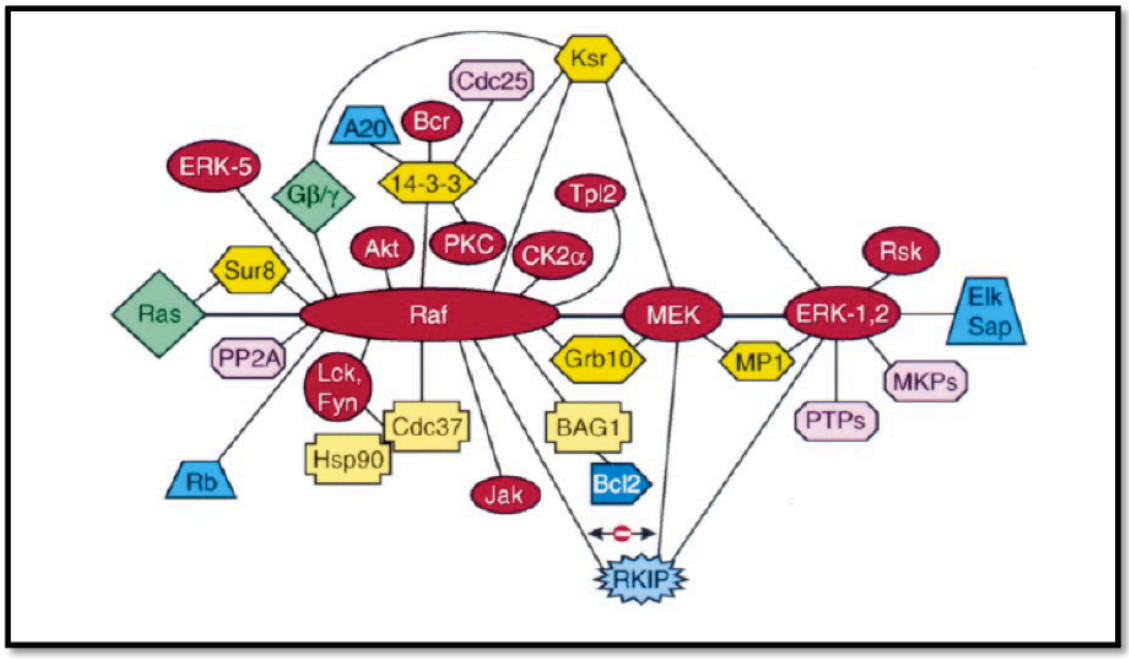


Figura 1.5- Vias de sinalização de PKCθ e RKIP (KOLCH, W., 2000).

1.3.4.4 Perda de Heterozigose (LOH)

A identificação da perda de heterozigose (LOH) tem sido reconhecida como marcador de pior prognóstico (KIKUCHI, H. *et al*, 2007)(SCHURR, P. *et al*, 2006) e como possível mecanismo relacionado à resistência ao mesilato de imatinibe (KIKUCHI, H. *et al*, 2006). Fukasawa *et al* (FUKASAWA, T. *et al*, 2000) evidenciaram que a LOH em determinados cromossomos estava relacionada à presença de GIST de alto risco. Schurr *et al* (SCHURR, P. *et al*, 2006) observaram que a LOH do cromossomo 17 foi fator prognóstico independente relacionado à sobrevida em portadores de GIST. Kikuchi *et al* (KIKUCHI, H. *et al*, 2006) postularam que a LOH do gene *KIT* poderia estar relacionada à resistência ao mesilato de imatinibe. Esses

autores observaram, no caso de GIST gástrico submetido à neoadjuvância com mesilato de imatinibe, que uma determinada área tumoral apresentava elevada celularidade e Ki67 mais intenso, diferente do restante tumoral.Essa área apresentava LOH no lócus do gene *KIT* enquanto que as áreas restantes não. Além disso, a metástase hepática do mesmo caso (ressecada metacronicamente) apresentava as mesmas características da área de tumor primário com maior celularidade, Ki67 mais intenso e presença de LOH no lócus do gene *KIT*. Esses achados sugerem que a LOH no lócus do gene *KIT* pode ser responsável pelo aumento do potencial metastático além de influenciar na resistência ao mesilato de imatinibe. Desta forma, o estudo da presença da LOH no lócus do gene *KIT* nos portadores de GIST metastático que serão submetidos ao tratamento com mesilato de imatinibe poderá ser esclarecedor em relação ao papel desse marcador como fator prognóstico e preditor de resposta à medicação.

1.3.4.5 *BRAF*

O gene *BRAF* codifica uma proteína quinase da família serina/treonina, cuja função é o controle da proliferação e diferenciação celular mediada pela via Ras-Raf-MAPK (SCHRECK, R.; RAPP, U., 2006). Esse gene está mutado em diferentes tipos de câncer, sendo mais frequentemente encontrado no melanoma, carcinoma de tireóide e câncer colorretal com instabilidade microssatélite (DAVIES,H.; BIGNELL,G.; COX, C., 2002). A maioria das mutações ocorrem no éxon 15 (98%), especificamente a substituição de aminoácidos V600E. O restante ocorre no éxon 11 (2%)(DAVIES,H.; BIGNELL,G.; COX, C., 2002). Recentemente, a mutação no gene *BRAF* tem sido descrita no subgrupo dos GIST selvagens para *KIT* e *PDGFRA* (AGARAM, N. et al, 2008)(MARTINHO, O. *et al*, 2009)(HOSTEIN, I. et al, 2010), sendo implicada não só como uma via de sinalização alternativa na fase inicial da tumorigênese dessa população especifica (AGAIMY, A. et al, 2009), como também possível mecanismo de resistência ao imatinibe (MIRANDA, C. *et al*, 2012). Miranda *et al* (MIRANDA, C. *et al*, 2012) realizaram estudo experimental *in vitro* com linhagens celulares de GISTs que continham mutações ativadoras em *KIT*

ou *PDGFRA* concomitante à mutações em *KRAS* ou *BRAF*, sendo evidenciado que o imatinibe era capaz de desativar o receptor KIT mutado, porém não desativava a sinalização intracelular disparada pelos efetores RAS-RAF.

Além do seu potencial biológico individual como biomarcadores no GIST, pode haver interação entre as vias de sinalização das moléculas citadas (Figura 1.6), tornando racional seu estudo simultâneo no GIST como potenciais biomarcadores preditores de resposta ao imatinibe.

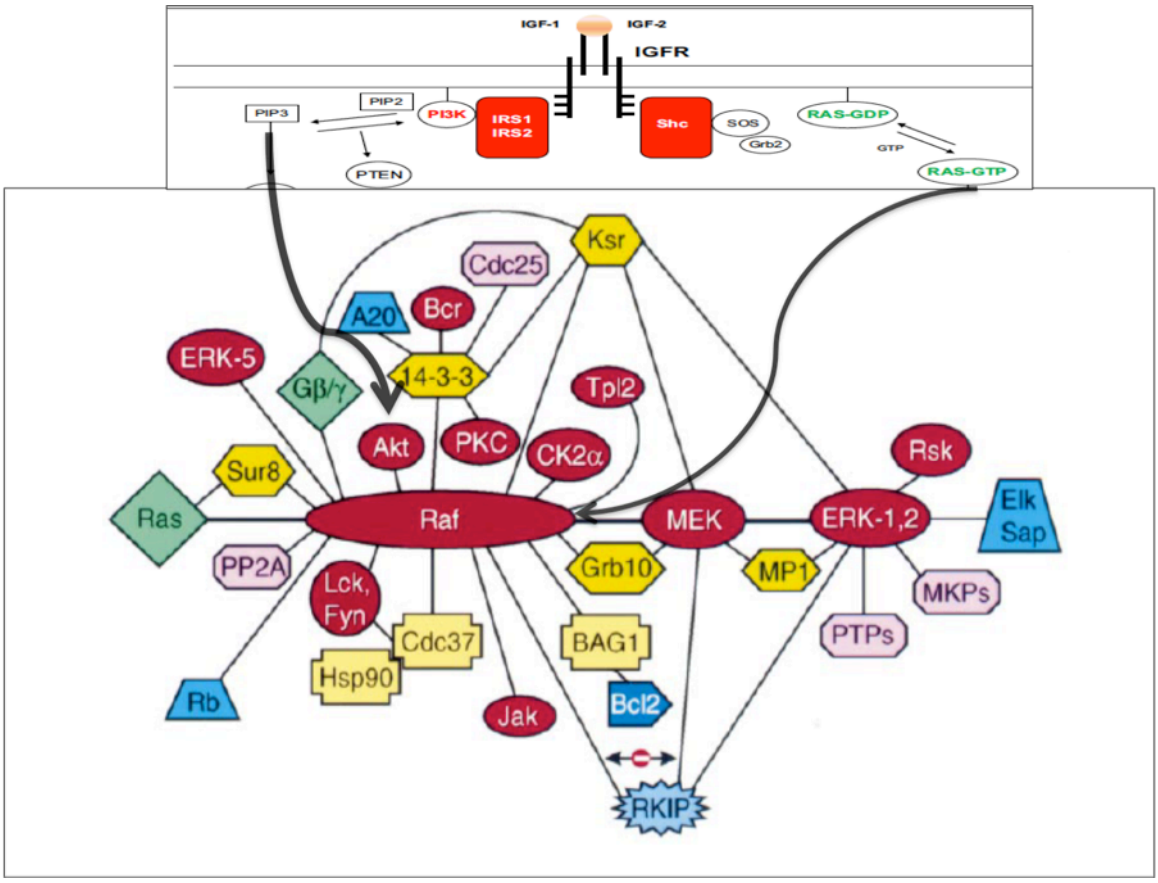


Figura 1.6- As múltiplas interações entre as vias de sinalização das moléculas IGF-1R, PKCθ, RKIP e BRAF no GIST. Adaptado de Pantaleo *et al* (PANTALEO, M. *et al*, 2010) e Kolch (KOLCH, W., 2000).

2. Justificativas

2. Justificativas

Diante do exposto na introdução, as justificativas para realização do presente estudo tem como base a necessidade da identificação de biomarcadores preditores de resposta ao imatinibe mais precisos e validados do que os já utilizados na prática clínica. Esse conhecimento contribuirá para a otimização do tratamento dos portadores de GIST metastático, uma vez que o conhecimento antecipado a respeito da predição de resposta ao imatinibe poderá selecionar melhor os indivíduos para a utilização de determinadas opções terapêuticas.

Além de poupar os indivíduos não-respondedores de terapias sabidamente não eficazes, estratégias de busca por biomarcadores, como a explorada nessa tese, podem subsidiar a incorporação de novas tecnologias, no caso drogas de alto custo, de maneira mais racional nos sistemas de saúde.

3. Objetivos

3. Objetivos

3.1-Objetivo geral:

- Avaliar o papel de potenciais biomarcadores como preditores de beneficio clínico ao mesilato de imatinibe em pacientes com GIST metastático.

3.2-Objetivos específicos:

- Avaliar a associação entre a expressão imuno-histoquimica de IGF-1R, PKCθ total, PKCθ fosforilada (resíduo Thr538) e RKIP e a taxa de resposta objetiva ao mesilato de imatinibe em pacientes com GIST metastático.
- Avaliar a correlação entre a perda de heterozigose do gene *KIT* e das regiões microssatélites nos cromossomos 1p, 14q, 22q e 17p e a taxa de resposta objetiva ao mesilato de imatinibe em pacientes com GIST metastático.
- Avaliar a correlação entre a presença de mutações no gene *BRAF* (éxons 11 e 15) e a taxa de resposta objetiva ao mesilato de imatinibe em pacientes com GIST metastático.
- Avaliar a associação entre a expressão imuno-histoquimica de IGF-1R, PKC θ (total e fosforilada) e RKIP e a sobrevida livre de progressão (SLP) e a sobrevida global (SG) em pacientes com GIST metastático tratados com mesilato de imatinibe.
- Avaliar a associação entre a expressão imuno-histoquimica de IGF-1R, PKC θ (total e fosforilada) e RKIP e idade, gênero, sitio da metástase e presença de mutação nos genes *KIT* e *PDGFRA.*
- Correlacionar a presença de mutações dos genes *KIT*, *PDGFRA* e *BRAF* com a sobrevida global, sobrevida livre de progressão e com a taxa de resposta objetiva ao mesilato de imatinibe em portadores de GIST metastáticos.

4. Pacientes e Métodos

4. Pacientes e Métodos

4.1 Desenho

Estudo retrospectivo, multicêntrico, que incluiu pacientes portadores de GIST metastático tratados com o mesilato de imatinibe. A avaliação de resposta foi feita por meio de tomografia computadorizada ou ressonância magnética, utilizando-se os critérios RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) (THERASSE, P. *et al*, 2000)(Tabela 4.1). A partir dos critérios RECIST foram definidos dois grupos para efeito de análise: resposta completa/parcial ou doença estável versus progressão. Os biomarcadores (expressão imuno-histoquimica de IGF-1R, PKC θ total, fosfo-PKC θ e RKIP , perda de heterozigose do gene *KIT, status* mutacional dos genes *KIT, PDGFRA* e *BRAF*) foram correlacionados com a taxa de resposta objetiva, sobrevida livre de progressão e sobrevida global.

As análises moleculares foram realizadas nos blocos de parafina do tumor primário de cada caso estudado.

Tabela 4.1- Critérios RECIST (THERASSE, P. *et al*, 2000)

Tipo de Resposta	**Definição**
Resposta Completa	Desaparecimento da lesão
Resposta Parcial	Redução tumoral > 30%
Doença estável	Ausência de resposta ou progressão
Progressão	Crescimento tumoral > 20%

4.2 Amostra-população

Foram incluídos 76 pacientes portadores de GIST metastáticos tratados com mesilato de imatinibe em três instituições brasileiras de tratamento de

câncer: Instituto Nacional de Câncer-INCA, Hospital do Câncer de Barretos e Faculdade de Medicina do ABC.

O INCA foi o centro coordenador do estudo. Os centros colaboradores encaminharam ao INCA os blocos de parafina de cada caso para realização das análises moleculares.

Critérios de inclusão dos pacientes no estudo:

- Portadores de GIST metastático tratados com mesilato de imatinibe entre 2002 e 2007 e:
- Possuir bloco de parafina do tumor

Critérios de exclusão dos pacientes no estudo:

- Casos que não possuíssem bloco de parafina do tumor ou:
- Casos com informações incompletas a respeito do tratamento empregado.

4.3 Variáveis clinico-patológicas:

Além das análises moleculares e do padrão de resposta clínica ao mesilato de imatinibe, foram consideradas para análise as seguintes variáveis (Anexo I – ficha clínica utilizada para coleta de dados):

- Idade
- Sexo
- Localização do tumor primário e do metastático
- Tempo de tratamento com o mesilato de imatinibe
- Intervalo de tempo entre o tratamento da lesão primária e a detecção da doença metastática.
- Dose utilizada do mesilato de imatinibe
- Tratamento utilizado na progressão de doença
- Padrão de resposta ao mesilato de imatinibe.

4.4 Extração de DNA

O DNA foi extraído a partir de tecido incluído e fixado em parafina. O procedimento consiste de múltiplas etapas de desparafinização com xilol, seguido pela adição de etanol em gradação, para eliminar eventuais resíduos de xilol. A desparafinização com xilol é seguida pela digestão pela proteinase K (BioAmerica,Inc, Homested, FL, USA), utilizando o *Wizard® Genomic DNA purification* (Promega, Madison, WI,USA). A proteinase K é responsável pela digestão protéica, além de inibir nucleases que podem degradar o DNA. Os restos celulares são precipitados por centrifugação e o DNA, no sobrenadante é utilizado nas reações de PCR (direto ou diluído). A confirmação da extração é feita por meio da aplicação de uma alíquota de 5 µL em gel de agarose 0.8% em tampão de eletroforese (TBE 1X). Para avaliar a integridade e concentração do DNA extraído, é aplicada uma alíquota de 1 µL no espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop Technologies Inc., Delaware, USA) . As amostras de DNA são, então, conservadas a 4º C.

4.5 Análise mutacional

4.5.1 Análise de mutação em *KIT* e *PDGFRA*

A análise mutacional nos dois genes é realizada utilizando-se a amplificação por PCR seguida pelo sequenciamento genômico.

As análises são iniciadas pelo éxon 11 no gene *KIT*, onde são encontradas mais de 70% das mutações descritas, seguida pelas análises dos éxons 9, 17 e 13. Vale ressaltar que as mutações nos dois genes são mutuamente exclusivas.

Os éxons 9,11,13 e 17 do gene *KIT* são amplificados utilizando-se os pares de iniciadores descritos na Tabela 4.2. Os pares de iniciadores são desenhados com base no gene *KIT* humano (GenBank accession no. U63834). As condições de reação da PCR são realizadas em um volume final de 50 µl, contendo 100ng de DNA, 1X PCR Buffer, 3 mM $MgCl_2$, 0,25 mM dNTPs, 10 μM primer e 1U Taq DNA polymerase (Invitrogen). As condições de amplificação

consistem de um passo inicial de desnaturação de 2 minutos a 94°C, seguido por 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 60 segundos, e uma extensão final de 10 minutos a 72°C. Os produtos de PCR são purificados usando o KIT de purificação GFX (GE Healthcare). Os produtos são sequenciados no sequenciador automático ABI PRISM TM 377 (Applied Biosystems Foster City, Califórnia, USA).

Os tumores que são analisados para a mutação de *PDGFRA* são aqueles considerados *KIT*-WT (selvagem). São analisadas as mutações nos éxons 18, 12 e 14 do gene *PDGFRA,* onde são encontradas as mutações com maior freqüência (DEBIEC-RYCHTER, M. *et al*, 2004). Os oligos utilizados na reação de seqüenciamento estão descritos na Tabela 4.2. As condições de reação da PCR são realizadas em um volume final de 50 µl, contendo 4µL da solução de DNA, 1X PCR Buffer (Invitrogen, São Paulo, Brazil), 1,5 mM $MgCl_2$ (Invitrogen, São Paulo, Brazil), 0,25 mM dNTPs, 0.6µM de primers e 1U Taq DNA polymerase (Invitrogen, São Paulo, Brazil). As condições de amplificação consistem de 40 ciclos de 94°C (desnaturação), seguido por 60°C (anelamento) e 72°C (extensão) por 45 segundos cada para os éxons 12 e 18. As condições para o éxon 14 são de 45 ciclos a 94°C (desnaturação), seguido de 56°C (anelamento) e 72°C (extensão) por 1 minuto cada.

Após amplificação, os produtos de PCR são purificados, utilizando-se o sistema de colunas com filtros do KIT de purificação GFX (GE Healthcare). Uma alíquota de 5 µl dos produtos de PCR purificados é aplicada em gel de agarose 2% em tampão de eletroforese (TBE 1X) para confirmação da purificação.

Os produtos de PCR purificados são preparados para o sequenciamento genômico, utilizando-se volume final de 7,5 µl (solução contendo iniciador, DNA e água mili-Q). O sequenciamento é realizado pelo seqüenciador automático ABI PRISM TM 377 (Applied Biosystems Foster City, Califórnia, USA), utilizando-se o método de Sanger (pelo método de Sanger, uma fita simples de DNA que será sequenciada é hibridizada com um primer de desoxinucleotídeos marcado na ponta 5´ (cinco linha). Quatro misturas de reação são preparadas onde os primers utilizados serão elongados por uma DNA polimerase. Cada mistura contém os quatro desoxinucleosídeos trifosfato normais mais um dos

quatro didesoxinucleosídeos trifosfato em uma razão de aproximadamente 1/100. Uma vez que um didesoxinucleotídeo não tem ponta 3´-OH, não é possível haver elongação a partir do nucleotídeo adicionado, parando a reação. Desta forma, cada mistura de reação produzirá cadeias prematuramente terminadas de acordo com toda ocorrência de um didesoxinucleotídeo adicionado. Cada mistura é então separada em um gel de sequenciamento por eletroforese para se detectar cada um dos nucleotídeos presentes na sequência de DNA lida. Esses sequenciadores analisam as moléculas através do processo de eletroinjeção, que é chamado o curto período em que a eletroforese ocorre no capilar imerso na amostra. As moléculas entram no capilar em um fluxo constante, sempre do catodo em direção ao anodo. Quando os fragmentos de DNA atingem a janela de detecção no capilar, um laser excita os corantes fluorescentes. Quatro diferentes substâncias ligadas aos nucleotídeos modificados são empregadas e, uma vez excitadas por um feixe de laser, emitem luz em diferentes comprimentos de onda, ou seja, emitem quatro cores diferentes. O software de sequenciamento interpreta os resultados, titulando cada base em relação à intensidade do composto fluorescente, denominando quatro cores específicas. O software para análise do sequenciamento utiliza as mesmas quatro cores específicas para cada base. Por convenção, A (adenina) ficou como verde, C (citosina) como azul, T (timina) como vermelho e G (guanina) como preto na visualização do eletroferograma).

4.5.2 Análise de mutação em *BRAF*

Foram analisados os éxons 11 e 15 do gene *BRAF*, sendo utilizados os oligos descritos na Tabela 4.2. As condições de amplificação consistem de um passo inicial de desnaturação por 5 minutos a 95^{o} C seguidos por 38 ciclos de 45 segundos a 95°C , seguido por 45 segundos a 58^{o} C (para o éxon 11) e 60°C (para o éxon 15) (anelamento) e 72°C (extensão) por 45 segundos e um ciclo de extensão final por 10 minutos a 72^{o} C. O seqüenciamento seguiu os passos descritos no item anterior (item 4.5.1).

Tabela 4.2- Sequência dos oligonucleotideos utilizados para amplificação dos genes *KIT, PDGFRA* e *BRAF*

Gene	Alvos	Sequência (5'-3')
KIT	Éxon 9F	TTCCTAGAGTAAGCCAGGGC
	Éxon 9R	ACAGAGCCTAAACATCCCCT
	Éxon 11F	CCAGAGTGCTCTAATGACTGAGAC
	Éxon 11R	AGGTGACATGGAAAGCCCCTG
	Éxon 13F	CTGCATGCGCTTTGACATCAG
	Éxon 13R	CTAGCATTGCCAAAATCATATT
	Éxon 17F	GTTTTCTTTTCTCCTCCAACCT
	Éxon 17R	CCTTTGCAGGACTGTCAAGC
PDGFRA	Éxon 12F	CTCTGGTGCACTGGGACTTT
	Éxon 12R	AAAGGGAGTCTTGGGAGGTT
	Éxon 14F	TGGTAGCTCAGCTGGACTGAT
	Éxon 14R	GGGATGGAGAGTGGAGGATT
	Éxon 18F	ACCATGGATCAGCCAGTCTTGC
	Éxon 18R	GTCAGGACGTACACTGCCTTTCGA
BRAF	Éxon 11F	AGGTTTTCTTTTTCTGTTTGGC
	Éxon 11R	ACTTGTCACAATGTCACCACATTAC
	Éxon 15F	TAATGCTTGCTCTGATAGGA
	Éxon 15R	GGCCAAAAATTTAATCAGTGGA

F: Senso ; R: Anti-senso

4.6 Análise da expressão de IGF-1R, PKC θ (total e fosforilada) e RKIP

4.6.1. Construção do TMA

A expressão das proteínas acima descritas foi analisada por imuno-histoquímica em blocos de "Tissue microarray" (TMA) a partir das secções de tecido tumoral provenientes dos blocos de parafina. Foram identificadas e demarcadas áreas tumorais representativas de pelo menos um bloco de cada caso incluído neste estudo, assim como de tumores selecionados como controles positivos internos para as reações de imuno-histoquímica, pelo patologista Dr. Sérgio Romano da Divisão de Patologia-INCA.

O bloco de TMA foi construído em colaboração com o Banco Nacional de Tumores (BNT) do Instituto Nacional de Câncer. Os centros que dispunham do método (Hospital do Câncer de Barretos) confeccionaram o bloco de TMA dos seus próprios casos. Cilindros de tecido (cores) dos blocos de parafina foram retirados com agulhas especiais de 1 mm de diâmetro e inseridos, de

forma ordenada, em um bloco receptor de resina sintética (Histosec®, Merck), utilizando um equipamento manual (Beecher Instrumedics, Microarray Technology).

Cortes de 4 μm foram realizados a partir do bloco TMA, recolhidos com o auxílio de filme aderente comercial (Instrumedics) e montados sobre lâminas comerciais com adesivo (Starfrost®, Instrumedics) e/ou carregadas positivamente (Superfrost Plus®, Erviegas). O tecido foi fixado através da exposição das lâminas à luz ultravioleta por 15 minutos e o adesivo plástico removido com solvente não clorinado (TPC®, Instrumedics). As lâminas foram apropriadamente identificadas e armazenadas a -20°C.

4.6.2. Imuno-histoquímica

As lâminas do TMA foram submetidas a desparafinização por xylol e subseqüente re-hidratação com lavagens seriadas com gradação de etanol. A recuperação antigênica calor-induzida foi feita utilizando-se steamer e tampão citrato (pH: 6,0; 10mol/l) ou panela de pressão ou banho-maria (Tabela 4.3). Após resfriamento, as lâminas foram imersas em peróxido de hidrogênio a 3% por 20 minutos para bloqueio da peroxidase endógena. As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário a 4^{o}C por 12 horas. Os anticorpos primários utilizados estão detalhados na Tabela 4.3. As lâminas foram incubadas com o pós-primário, seguido de uma incubação com o polímero Novolink (Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle, UK). Finalmente, as lâminas foram lavadas em PBS e reveladas com substrato cromogênico diaminobenzidina (DAB; DAKO, Carpinteria, CA, USA) por 5 minutos. Os controles positivos utilizados foram: carcinoma de próstata (IGF-1R e RKIP) e linfonodo (PKC θ total e fosforilada).

Tabela 4.3- Especificações dos anticorpos primários utilizados na imuno-histoquimica.

Antigeno	Clone	Diluição	Fonte	TRA	Detecção
IGF-1R	Policlonal	1:200	Cell Signaling,Beverly, MA, USA	Panela de Pressão	Novolink polymer (Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle, UK)
PKCθ Total	27	1:200	BD Biosciences PharMingen, San Diego, CA,USA	Steamer	Novolink polymer (Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle, UK)
Fosfo-PKCθ (Thr538)	19	1:200	Cell Signaling,Beverly, MA, USA	Panela de Pressão	Novolink polymer (Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle, UK)
RKIP	Policlonal	1:600	Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA	Banho-maria	UltraVision Large Volume Detection System Anti-Polyvalent, HRP; Lab Vision Corporation

TRA: Técnica de recuperação antigênica

4.6.3. Análise da expressão imuno-histoquímica

A análise da expressão das proteínas foi feita utilizando-se tanto os critérios de intensidade da marcação (a intensidade de marcação foi divida em quatro graus: 0, 1, 2 e 3, de acordo com os critérios da Tabela 4.4) como da porcentagem de células marcadas (variava de 0% a 100%). A quantificação final da expressão (*score*) foi determinada através da multiplicação da porcentagem de células marcadas pela intensidade da marcação da proteína analisada em cada tumor conforme validado na literatura (GUIMARAES, D.P. *et al*, 2009). Toda a avaliação imuno-histoquimica foi realizada pelo mesmo patologista (Dr. Sergio Romano) de modo cego. O valor final do *score* foi utilizado como instrumento de correlação com os desfechos pesquisados.

Tabela 4.4 – Critérios para classificação da intensidade de marcação das células tumorais

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

4.7 Análise de perda de heterozigose do gene *KIT* e das regiões microssatélites nos cromossomos 1p, 14q, 22q e 17p.

As análises foram realizadas pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir do DNA extraído dos blocos de parafina. A extração do DNA segue a mesma técnica descrita no item 4.4. Foram utilizadas amostras pareadas de cada caso (tecido tumoral e tecido normal) para análise da perda de heterozigose. Cada bloco de parafina foi dissecado para separação do tecido tumoral do tecido normal adjacente. A partir dessa separação, foi extraído o DNA para amplificação por PCR. As regiões de *KIT* e de microssatélites amplificadas por PCR estão listados a seguir:

- Gene *KIT* (HK8810)
- Cromossomo 1p (D1S209)
- Cromossomo 14q (D14S281, D14S254)
- Cromossomo 22q (D22S275, D22S280)
- Cromossomo 17p (D17S520, D17S796,D17S804)

Esses marcadores de microssatélite foram escolhidos com base na sua freqüência e nos resultados prévios de literatura (FUKASAWA, T. *et al*, 2000; SCHURR, P. *et al*, 2006). As seqüências dos iniciadores para amplificar essas regiões foram selecionadas através do banco de dados UniSTS (www.ncbi.nlm.nih.gov).

As condições de reação da PCR foram realizadas em um volume final de 50µl, contendo 200ng de DNA, 1X PCR Buffer, 3mM $MgCl_2$ 0,25 mM dNTPs, 0,2µM primer e 1U Taq DNA polimerase (Invitrogen). Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%. Perda de heterozigose é definida quando a banda correspondente ao alelo selvagem do DNA do tecido normal for perdida no DNA do tecido tumoral e bandas extras no tecido tumoral em relação ao tecido normal foram definidas como instabilidade de microssatélite. Uma segunda análise foi feita pelo bioanalizador Agilent 2100 *(*Agilent Technologies*, Santa Clara, CA, USA)* de acordo com as instruções do fornecedor. A análise dos fragmentos obtidos foi realizada pelo Agilent *2100 expert software* (Agilent Technologies*, CA, USA)*, e a superposição dos eletroferogramas foi usada para avaliar as diferenças entre os tecidos tumorais e não tumorais.

4.8 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa SPSS versão 18.0 (SPSS Inc., Chicago,IL). Resposta objetiva ao mesilato de imatinibe foi utilizada como desfecho primário do estudo. A sobrevida global (definida como o tempo entre a data do inicio do tratamento e a data do óbito) e a sobrevida livre de progressão (definida como o tempo entre o inicio da utilização do mesilato de imatinibe e a confirmação da progressão) foram estimadas pelo método de Kaplan-Meier e as curvas de sobrevida comparadas pelo teste de Log-rank. A análise univariada foi feita com o intuito de avaliar a correlação entre as variáveis idade, gênero, sitio do tumor primário, expressão imuno-histoquimica, *status* mutacional (genes *KIT*,*PDGFRA e BAF*) e sobrevida livre de progressão (SLP). Além disso, investigamos a correlação entre as variáveis descritas acima e a sobrevida global (SG) e o tipo de resposta ao

mesilato de imatinibe de acordo com os critérios RECIST (THERASSE, P. *et al*, 2000). Para fins de análise estatística, a expressão imuno-histoquimica foi avaliada como variável continua, utilizando-se o número absoluto do *score* final (produto da multiplicação entre a intensidade da expressão e a porcentagem de células marcadas) de cada amostra e variável dicotômica, sendo dicotomizado o *score* de duas formas: acima versus abaixo da mediana do *score* de expressão (a mediana do *score* de expressão foi usado como ponto de corte) e expressão positiva versus negativa para cada marcador. Além disso, a expressão imuno-histoquimica foi avaliada como um painel dos 4 marcadores estudados (IGF-1R, PKC θ total e fosforilada e RKIP), sendo realizada a correlação entre o painel de expressão (expressão de todos os 4 marcadores, expressão de apenas 1 marcador, expressão de 2 marcadores, expressão de 3 marcadores, ausência de expressão dos marcadores) e a resposta objetiva. Para avaliar a correlação entre variáveis foram utilizados os seguintes testes estatísticos: Test T (variável categórica versus numérica), Qui-quadrado ou ANOVA (variável categórica versus categórica) e coeficiente R de Spearman (variável numérica versus numérica). Um valor de *p* igual ou inferior a 0,05 foi considerado estatisticamente significante.

4.9. Considerações éticas

O estudo em questão foi submetido à análise do Comitê de Ética em Pesquisa do INCA, tendo sido aprovado (Protocolo 111/07), inclusive as emendas solicitadas e o relatório anual (Anexo II, Anexo III e Anexo IV). Fica garantida a manutenção do sigilo das informações médicas e respeito à privacidade dos pacientes.

5. Resultados

5. Resultados

5.1. Dados demográficos e clinicopatológicos

Foram incluídos inicialmente no estudo 76 pacientes, sendo excluídos 13 casos (7 casos devido a informações clinicas incompletas e 6 casos devido a má qualidade do DNA extraído associada a indisponibilidade de tecido suficiente para realização dos testes imuno-histoquimicos). Após a exclusão dos casos acima citados, foi possível a análise dos marcadores imuno-histoquimicos em uma amostra final de 63 casos, estudo do *status* mutacional (*KIT, PDGFRA* e *BRAF*) em 60 casos e análise da perda de heterozigose (LOH) em 25 casos apenas.

A média de idade da amostra estudada foi de 56 anos (desvio padrão ± 11,6 anos), além de discreta predominância do sexo masculino (52,4%). O estômago foi o sitio primário mais freqüente (41,3%) e o fígado foi o sitio metastático mais encontrado (49,2%) . (Tabela 5.1).

5.2. Mutações nos genes *KIT, PDGFRA* e *BRAF*

A análise da presença de mutação nos genes acima citados foi possível em apenas 60 casos (não foi possível a análise em 3 casos devido a má qualidade do DNA extraído). Quanto à mutação do gene *KIT*, houve predomínio no éxon 11 (73,3%), seguido do éxon 9 (8,3%). A Fig. 5.1 apresenta um cromatograma exemplificando um caso (caso 36) apresentando mutação no éxon 11 do gene *KIT*. O local mais freqüente de mutação do gene *PDGFRA* foi no éxon 18 (5%). Quatro casos (6,6%) não apresentavam mutações nos genes *KIT* nem *PDGFRA* (selvagens). Não foi identificada mutação no gene *BRAF*. A Tabela 5.1 resume os dados acima apresentados. Em anexo, o quadro descritivo das mutações encontradas (Anexo V).

Tabela 5.1- Características clinicopatológicas e moleculares

Características	n
Média de idade (desvio padrão),anos	56(±11.6)
Gênero	
Masculino	33(52.4%)
Feminino	30(47,6%)
Sítio do tumor primário	
Estômago	26(41.3%)
Intestino Delgado	23(36.5%)
Outro	14(22.2%)
Sítio da metástase	
Fígado	31(49.2%)
Peritôneo	20(31.7%)
Fígado e peritôneo	12(19.1%)
Mutação	
KIT Éxon 11	44(73.3%)
KIT Éxon 9	5(8.3%)
KIT Éxon 17	2(3.3%)
KIT Éxon 13	0(0%)
PDGFRA Éxon 18	3(5.0%)
PDGFRA Éxon 14	1(1.6%)
PDGFRA Éxon 12	1(1.6%)
Selvagem	4(6.6%)
BRAF Éxon 11	0(0%)
BRAF Éxon 15	0(0%)
Expressão IGF-1R	
Positiva	48(82.8%)
Negativa	10(17.2%)
Expressão PKCθ Total	
Positiva	51(92.7%)
Negativa	4(7.3%)
Expressão PKCθ fosforilada	
Positiva	25(42.4%)
Negativa	34(57.6%)
Expressão RKIP	
Positiva	47(85.5%)
Negativa	8(14.5%)

5.3. Expressão imuno-histoquímica de IGF-1R, PKC θ (total e fosforilada) e RKIP e correlação com os dados clínico-demográficos e mutações

A expressão imuno-histoquímica de IGF-1R, PKC θ total, PKC θ fosforilada e RKIP foi positiva em 82,8%, 92,7%, 42,4% e 85,5% dos casos, respectivamente (Tabela 5.1). A Fig. 5.2 ilustra a expressão forte das proteínas citadas. Todos os marcadores apresentaram padrão de expressão citoplasmática.

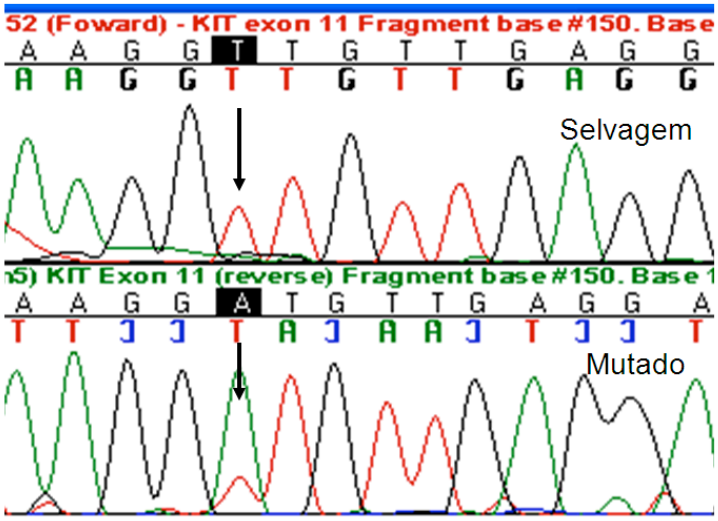


Fig. 5.1- Cromatograma evidenciando mutação no éxon 11 do gene *KIT* / V559D de um caso representativo (caso 36).

A mediana do *score* de expressão de IGF-1R, PKC θ total, PKC θ fosforilada e RKIP foi de 100, 200, 80 e 200, respectivamente. Não houve correlação entre a expressão de IGF-1R, PKC θ (total e fosforilada), RKIP e idade, sitio da metástase ou presença de mutação nos genes *KIT* e *PDGFRA* (a expressão das proteínas citadas ocorreu independente do *status* mutacional dos genes pesquisados). Apenas a expressão de IGF-1R se correlacionou com gênero, ou seja, a presença de expressão de IGF-1R foi mais freqüente no sexo masculino (93,8% versus 69,2%, *p*= 0,014). Além disso, a média do *score* de expressão de IGF-1R foi maior no grupo masculino quando comparado ao feminino, porém estatisticamente não significante (147 versus 130, *p*=0,475). Em anexo, o quadro descritivo referente ao perfil de expressão imuno-histoquimica (Anexo VI).

5.4. Correlação entre expressão imuno-histoquimica e resposta ao imatinibe

Houve correlação estatisticamente significante entre a expressão de IGF-1R e o tipo de resposta ao imatinibe (*p*=0,05), ou seja, a maior expressão de IGF-1R se relacionou à menor taxa de resposta objetiva ao imatinibe. Essa correlação só ocorreu no grupo feminino (*p*=0.015) e não no grupo masculino (*p*=0.5). Não houve correlação entre a expressão das

demais proteínas (PKC θ total, PKC θ fosforilada e RKIP) e a taxa de resposta objetiva ao imatinibe, apresentando valor de *p* de 0,13, 0,48 e 0,30, respectivamente (Tabela 5.2).

Não houve correlação entre a expressão dos marcadores (IGF-1R, PKC θ total e fosforilada e RKIP) na forma de painel com o tipo de resposta objetiva ao imatinibe (Tabela 5.3).

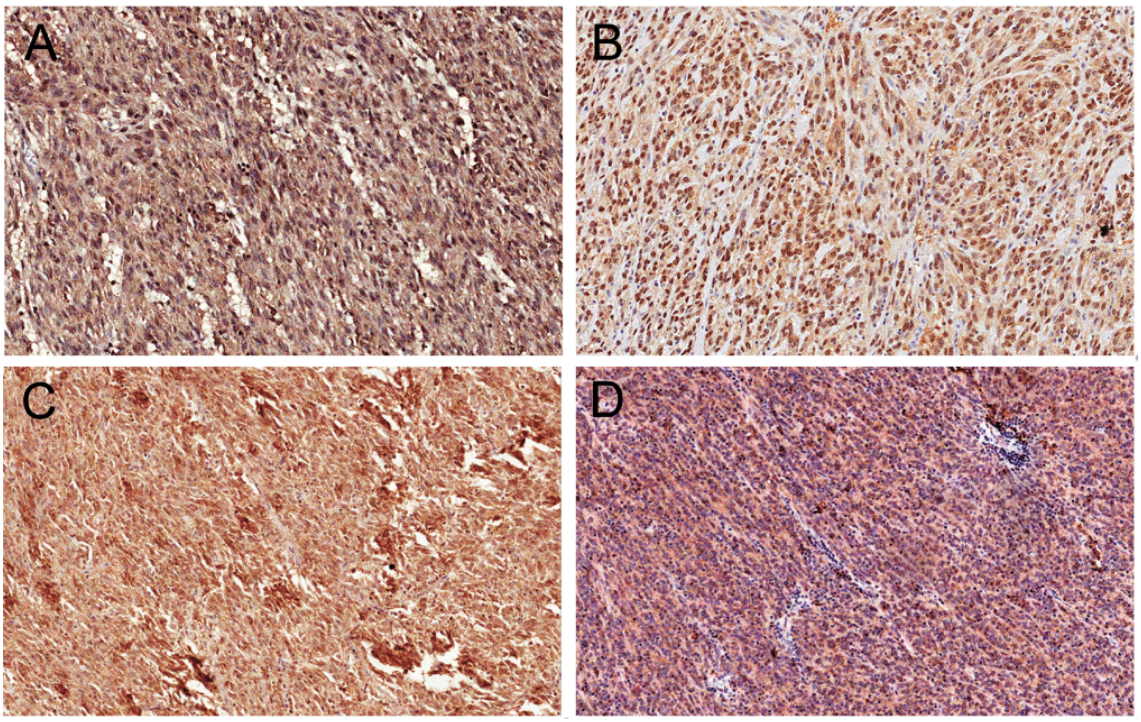
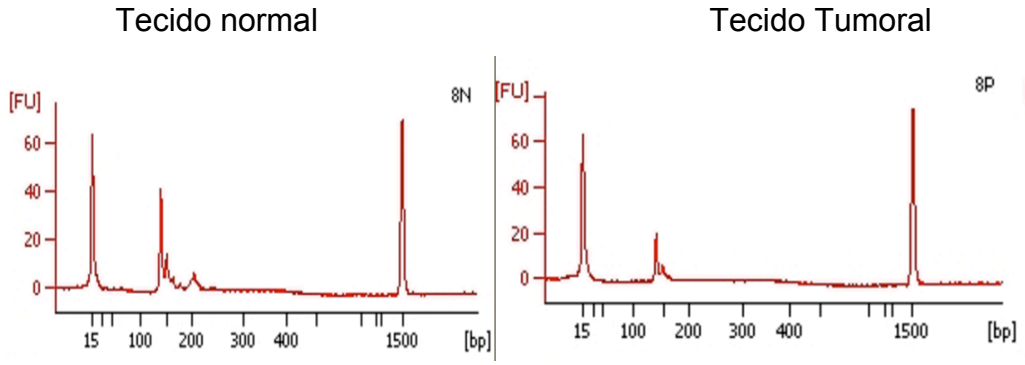


Fig 5.2- Expressão imuno-histoquimica (expressão forte) das proteínas estudadas. A: IGF-1R, B: RKIP, C: PKC θ total e D:PKC θ fosforilada

5.5. Perda de heterozigose do gene *KIT* e das regiões microssatélites nos cromossomos 1p, 14q, 22q e 17p.

Dos casos incluídos no estudo, apenas 25 foram elegíveis para análise da perda de heterozigose, pois é necessário o tecido normal além do tumoral para análise proposta. Foi evidenciada perda de heterozigose do gene *KIT* (HK8810) em apenas 1 caso dentre os 25 analisados. A Fig. 5.3 ilustra o caso em que foi identificada a perda de heterozigose do gene *KIT*. Não foi possível a análise das demais regiões microssatélites situadas nos cromossomos 1p, 14q, 22q e 17p, pois não foi possível a amplificação dessas regiões por

motivos técnicos. Não foi feita a correlação da perda de heterozigose do gene *KIT* com os desfechos estudados por conta da reduzida amostra.



Legenda: FU: Fluorescência; bp: Pares de base;8N:caso 8 tecido normal;8P:caso 8 tumor primário.

Fig. 5.3- Eletroferograma evidenciando a perda de heterozigose do gene *KIT* (Marcador HK 8810) (análise pelo bioanalizador Agilent 2100).

5.6. Desfechos clínicos

O seguimento mediano foi de 31,2 meses (IC 95%, 26,3-36,1) e a estimativa da mediana da sobrevida livre de progressão (SLP) foi de 34 meses (IC 95%, 22,2-45,8). Não houve correlação entre as variáveis idade, gênero, sitio do tumor (primário e metastático) e a sobrevida livre de progressão (SLP) e sobrevida global (SG). Além disso, a análise univariada não evidenciou associação entre a expressão de IGF-1R, PKC θ total, PKC θ fosforilada, RKIP e a SLP e a SG (Tabela 5.2). Da mesma forma, não houve correlação entre a expressão imuno-histoquimica dos marcadores estudados na forma de um painel com a SLP e a SG. Por outro lado, foi evidenciada associação entre mutação do gene *KIT* e SLP. De fato, os portadores de tumores com mutações localizadas no éxon 9 do gene *KIT* apresentaram pior SLP quando comparada às outras mutações (p=0,027), porém sem impacto na SG (p=0,074). A Fig. 5.4 apresenta a curva de sobrevida livre de progressão relacionada a presença da mutação no éxon 9 do gene *KIT.*

Tabela 5.2- Associação entre a expressão de IGF-1R, PKCθ (total e fosforilada), RKIP e Sobrevida Livre de Progressão (SLP), Sobrevida Global (SG) e Resposta Objetiva à terapia com imatinibe.

Variável	SLP* (*P* valor)	SG* (*P* valor)	Resposta Objetiva** (*P* valor)
Expressão IGF-1R	0.63	0.39	0.05
Expressão PKCθ Total	0.49	0.40	0.13
Expressão PKCθ Fosforilado	0.89	0.60	0.48
Expressão RKIP	0.22	0.73	0.30

* Teste Log-Rank ** Teste Qui-Quadrado, SLP: Sobrevida livre de progressão, SG: Sobrevida global.

Tabela 5.3- Associação entre a expressão dos 4 marcadores (IGF-1R, PKCθ total, PKCθ fosforilada e RKIP) em forma de painel e a Resposta Objetiva à terapia com imatinibe

Painel de marcadores	Resposta Objetiva* (*P* valor)
Expressão de apenas 1 marcador	1.00
Expressão de apenas 2 marcadores	1.00
Expressão de apenas 3 marcadores	1.00
Expressão de todos os 4 marcadores	1.00

*Teste Exato de Fisher

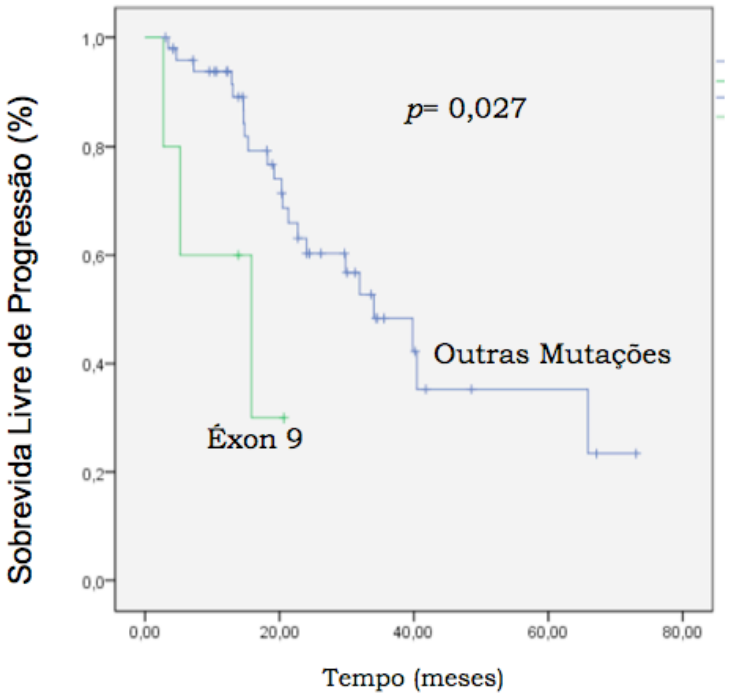


Fig. 5.4- Estimativa da curva de Sobrevida (Kaplan-Meier) relacionando o local da mutação no gene *KIT* e a Sobrevida Livre de Progressão (SLP).

6. Discussão

6. Discussão

O racional para a investigação do papel da expressão imuno-histoquimica de IGF-1R, PKCθ (total e fosforilada) e RKIP como biomarcadores de predição de resposta ao imatinibe em portadores de GIST metastático está baseado nos seguintes pontos: as três moléculas estão envolvidas na via de sinalização da MAPK, cuja via tem sido apontada como importante mecanismo molecular relacionado a patogênese, resistência ao imatinibe e à progressão tumoral no GIST (TARN, C. *et al*, 2008)(GRAMZA, A.; CORLESS, C.; HEINRICH, M., 2009). Além disso, essas moléculas tem sido reconhecidas como marcadores prognósticos (BRACONI, C. *et al*, 2008)(MARTINHO, O. *et al*, 2009) e potenciais alvos terapêuticos no GIST (DUENSING, A. *et al*, 2004)(OU, W. *et al*, 2008)(TARN, C. *et al*, 2008)(GRAMZA, A.; CORLESS, C.; HEINRICH, M., 2009), porém ainda não haviam sido investigadas seu papel como preditoras de resposta ao imatinibe. Os argumentos acima citados combinado com a necessidade de identificação de biomarcadores preditores de resposta ao imatinibe mais acurados, tornam essa investigação um passo promissor no sentido da otimização terapêutica dos portadores de GIST metastático.

Os resultados encontrados estão em concordância com os da literatura no que tange à distribuição da amostra em relação à idade, ao gênero, ao sítio do tumor primário e das metástases, além do perfil de freqüência de mutações nos genes *KIT* e *PDGFRA* (RUBIN, B.; HEINRICH, M.; CORLESS, C., 2007)(BLANKE, C.D. *et al*, 2008)(BRAGGIO, E. *et al*, 2010). O estudo da mutação no gene *BRAF* teve como racional publicações prévias (AGARAM, N. et al, 2008)(MARTINHO, O. *et al*, 2009) (HOSTEIN, I. et al, 2010) que demonstraram a presença de mutações ativadoras desse gene no grupo de GIST selvagens. Esses autores identificaram uma freqüência que variava entre 4% a 13% de mutações no gene *BRAF* em GIST selvagens. No presente estudo, não foi identificada mutação nesse gene, provavelmente pelo reduzido número de casos de GIST selvagem (apenas 4 (6,6%) casos). A presença da mutação do gene *BRAF* no GIST poderia manter ativada a via MAPK, independente da expressão da proteína RKIP (também investigada nesse estudo), fato que poderia trazer conclusões equivocadas se fosse desconhecido o *status* mutacional do gene *BRAF* nesse cenário. Dessa forma,

a pesquisa da mutação do gene *BRAF* foi importante no sentido de evitar conclusões equivocadas a respeito do papel da expressão da proteína RKIP no GIST.

Não houve associação entre a expressão dos marcadores (IGF-1R, PKCθ total, PKCθ fosforilada e RKIP) e as variáveis idade, sitio da metástase e *status* de mutação nos genes *KIT* e *PDGFRA*. Em relação ao gênero, a presença de expressão de IGF-1R foi mais freqüente no sexo masculino (93,8% versus 69,2%, *p*= 0,014), porém não há dados na literatura para comparar esses achados e não há explicação conhecida para essa diferença. Da mesma forma em que evidenciamos média de *score* de expressão maior no sexo masculino, embora sem significância estatística. Estudos prévios evidenciaram que PKCθ e RKIP estão expressas em GIST, independente do *status* mutacional dos genes *KIT* e *PDGFRA* (DUENSING, A. *et al*, 2004) (MARTINHO, O. *et al*, 2009), fato corroborado por nosso resultado. Em relação à expressão de IGF-1R, há dados conflitantes na literatura, uma vez que Tarn *et al* (TARN, C. *et al*, 2008) demonstraram maior expressão de IGF-1R em GIST selvagem quando comparado aos GISTs mutados e, por outro lado, Braconi *et al* (BRACONI, C. *et al*, 2008), detectaram expressão de IGF-1R em todos os casos, independente do *status* mutacional. Vale ressaltar que a casuística do estudo de Braconi *et al* (BRACONI, C. *et al*, 2008) foi maior do que a de Tarn *et al* (TARN, C. *et al*, 2008), fato que pode ter influenciado no resultado. Os achados dos dois estudos citados associada à presente observação indica que tanto o GIST mutado quanto selvagem possam estar submetidos aos mesmos estímulos oncogênicos, embora dirigidos por diferentes mecanismos.

Em relação à expressão de PKC θ total, nossos achados corroboram os dados da literatura no tange à alta freqüência de expressão em GIST *KIT* positivo (DUENSING, A. *et al*, 2004)(OU, W. *et al*, 2008). Porém, a freqüência de expressão de PKC θ fosforilada foi ,curiosamente, inferior que o relatado na literatura (DUENSING, A. *et al*, 2004)(OU, W. *et al*, 2008). Duesing *et al* (DUENSING, A. *et al*, 2004) analisaram 20 casos de GIST e evidenciaram expressão de PKC θ fosforilada (resíduo Th538) em todos os casos, utilizando imunoblot. Ou *et al* (OU, W. *et al*, 2008) analisaram a fosforilação de PKC θ por imunoblot (PKC θ fosforilada resíduo Th538) em 3 linhagens de

GIST KIT-positivo (GIST882, GIST48, GIST430), demonstrando forte expressão de PKC θ fosforilada (resíduo Th538) nas 3 linhagens estudadas. No presente estudo, apenas 42,4% dos casos apresentavam expressão positiva de PKC θ fosforilada. É possível que essa discrepância possa estar relacionada à diferença de métodos utilizados pois Duesing *et al* (DUENSING, A. *et al*, 2004) e Ou *et al* (OU, W. *et al*, 2008) utilizaram imunoblot para detecção da expressão enquanto que nós utilizamos a imuno-histoquimica, além do possível viés relacionado ao número de casos estudados (Duesing *et al* estudaram apenas 20 casos). É possível que esses dados possam ter contribuído para a diferença nos resultados.

Quanto à expressão de RKIP, nossos achados são semelhantes aos encontrados na literatura (MARTINHO, O. *et al*, 2009) no que se refere a alta freqüência de expressão em GIST.

Houve correlação estatisticamente significante entre a expressão de IGF-1R e o tipo de resposta ao imatinibe (p=0,05), ou seja, a maior expressão de IGF-1R se relacionou à menor taxa de resposta objetiva ao imatinibe. Não houve correlação entre a expressão das demais proteínas (PKC θ total, PKC θ fosforilada e RKIP) e a taxa de resposta objetiva ao imatinibe. Esse achado sugere que a expressão de IGF-1R pode representar uma das vias de sinalização no GIST, tendo papel ativo na proliferação celular nos GISTs, contribuindo para o desenvolvimento de resistência ao imatinibe e para a progressão tumoral. A relação entre o aumento da expressão de IGF-1R e a redução da resposta ao imatinibe torna lógico o racional de que o IGF-1R representaria uma via de sinalização diferente de KIT. Dessa forma, a inibição de KIT pelo imatinibe não seria suficiente para controlar a proliferação tumoral uma vez que IGF-1R estivesse expresso, contribuindo, assim, para redução na taxa de resposta objetiva.

Curiosamente, após a estratificação por gênero, a correlação entre a expressão de IGF-1R e a resposta objetiva ao imatinibe ocorreu apenas no grupo feminino (p=0,015). Esse achado nunca havia sido relatado na literatura. Diante desse fato, podemos especular que possivelmente a expressão de IGF-1R tenha um papel biológico mais importante em mulheres do que em homens portadores de GIST. Nesse sentido, existem algumas evidências indiretas na literatura que reforçam essa especulação:

IGF-1R tem sido implicado na regulação da esteroidogênese (MANNA, P. *et al*, 2006); além disso, em células de câncer de mama hormônio-dependente, IGF-1R e IRS-1 (substrato 1 do receptor de insulina) são co-expressos com o ER alpha (receptor de estrogênio alfa) e os sistemas IGF1 e ER (receptores estrogênicos) apresentam uma interconexão funcional estrita (a ativação do ER alpha regula positivamente a expressão de IRS-1, IGF-1R e IGF1, resultando na amplificação da resposta de IGF1) (SURMACZ, E.; BARTUCCI, M., 2004). Com base nesse achado, podemos especular que essa seria uma explicação plausível para o fato de que pacientes do sexo feminino portadoras de GIST metastático tratadas com imatinibe apresentam melhor sobrevida quando comparado ao grupo masculino, como evidenciado no estudo MetaGIST (VANGLABBEKE, M. *et al*, 2010). Ou seja, as características da expressão de IGF-1R no sexo feminino (menor frequência de expressão de IGF-1R associada a menor média de score de expressão) poderia isoladamente explicar o melhor resultado do grupo feminino evidenciado no estudo MetaGIST (VANGLABBEKE, M. *et al*, 2010). Essa hipótese necessita confirmação por meio de estudos com maior casuística.

Nossa análise utilizando a expressão imuno-histoquimica dos 4 marcadores (IGF-1R, PKC θ total e fosforilada e RKIP) na forma de um painel de expressão (expressão de todos os 4 marcadores, expressão de apenas 1 marcador, expressão de 2 marcadores, expressão de 3 marcadores, ausência de expressão dos marcadores) não evidenciou correlação com o tipo de resposta e nem com os desfechos clínicos estudados. O estudo dos marcadores no formato de painel tem um racional interessante, uma vez que as 3 moléculas estudadas participam da mesma via de sinalização (MAPK). Dessa forma, nossa hipótese seria de que a presença de um número diferente (um, dois, três, todos ou nenhum) de marcadores expressos poderia traduzir o grau de ativação dessa via no GIST e, teoricamente, propiciar maior resistência ao imatinibe. Não obtivemos correlação desse painel com os desfechos clínicos, provavelmente devido ao número reduzido da amostra estudada, diminuindo o poder estatístico.

A análise dos resultados referente à pesquisa da perda de heterozigose do gene *KIT* (HK8810) ficou prejudicada pela baixa freqüência do achado (apenas 1 caso apresentava perda de heterozigose dentre os 25 estudados-

freqüência de 4%), o que impossibilitou qualquer análise estatística. Kikuchi *et al* (KIKUCHI, H. *et al*, 2007) analisaram a perda de heterozigose do gene *KIT* (HK8810) em 12 casos de GIST metastáticos, encontrando perda de heterozigose em 7 casos (58,3%). A disparidade dos achados poderia ser explicada por diversos aspectos: o número reduzido de casos e desenho dos 2 estudos poderiam influenciar o resultado (viés de seleção), além do fato de poder haver diferenças genéticas entre as populações estudadas (japonesa versus brasileira). Como não há outras publicações na literatura a esse respeito, as explicações acima são meramente especulativas. Quanto ao estudo das demais regiões microssatélites situadas nos cromossomos 1p, 14q, 22q e 17p, não foi possível a amplificação dessas regiões. Apesar de termos utilizado as mesmas condições para realização dos experimentos que as publicações prévias (FUKASAWA, T. *et al*, 2000)(SCHURR, P. *et al*, 2006), não logramos êxito na amplificação dessas regiões. É possível que a má condição do DNA extraído para essa análise tenha contribuído para não amplificação.

Não houve correlação entre as variáveis idade, gênero, sitio do tumor (primário e metastático) e a sobrevida livre de progressão (SLP) e sobrevida global (SG). Além disso, a análise univariada não evidenciou associação entre a expressão de IGF-1R, PKC θ (total e fosforilada), RKIP e a SLP e a SG. Apesar do achado da expressão de IGF-1R ter se correlacionado com a resposta objetiva ao imatinibe, não houve impacto na sobrevida livre de progressão (SLP) nem na sobrevida global (SG). Alguns aspectos podem ser considerados para elucidação desses achados. Primeiro, o tamanho da amostra (apenas 63 casos) e o tipo de desenho do estudo (estudo retrospectivo) podem ter influenciado no sentido de adicionar viéses. Segundo, a estimativa da mediana da sobrevida livre de progressão (SLP) do presente estudo foi de 34 meses (IC 95%, 22,2-45,8), maior do que os 24 meses descritos em publicações prévias (VERWEIJ, J. *et al*, 2004)(BLANKE, C.D. *et al*, 2008). Essa maior SLP pode ser explicada pela natureza retrospectiva do estudo e pela participação de 3 diferentes centros de câncer com diferentes rotinas de seguimento radiológico desses pacientes. É possível que, em alguns casos, o diagnóstico de progressão de doença poderia ter sido identificado mais precocemente se o seguimento radiológico tivesse sido feito

em um intervalo de tempo mais curto. Outro aspecto a ser levado em consideração diz respeito aos critérios radiológicos utilizados para definir progressão de doença, uma vez que foram utilizados os critérios RECIST (THERASSE, P. *et al*, 2000) e não os critérios de Choi (CHOI, H. *et al*, 2007), pois, só recentemente, os critérios de Choi se tornaram o padrão-ouro para avaliar resposta em GIST (nossos casos foram tratados entre 2002 e 2007 e, apenas as informações relativas aos critérios RECIST estavam disponíveis). É sabido que os critérios de Choi apresentam maior acurácia na detecção de progressão de doença quando comparado aos critérios RECIST (BENJAMIN, R.S. *et al*, 2007) , fato que pode ter contribuído para que não fosse detectado o impacto da expressão de IGF-1R na SLP dessa amostra.

Por outro lado, foi evidenciada associação entre mutação do gene *KIT* e SLP. De fato, os portadores de tumores com mutações localizadas no éxon 9 do gene *KIT* apresentaram pior SLP quando comparada às outras mutações (p=0,027), porém sem impacto na SG (p=0,074). Esses dados corroboram os achados do estudo MetaGIST (VANGLABBEKE, M. *et al*, 2010), confirmando o papel do *status* mutacional do gene *KIT* como fator prognóstico no GIST. Além disso, no estudo MetaGIST (VANGLABBEKE, M. *et al*, 2010), entre os portadores de tumores com mutação no éxon 9 do gene *KIT*, somente àqueles que foram tratados com dose maior de imatinibe (800 mg/dia) apresentaram maior SLP quando comparado aos que receberam dose padrão de imatinibe (400 mg/dia). Nossos pacientes foram tratados com a dose padrão de imatinibe (400 mg/dia) como terapia de primeira linha.

Vale ressaltar que o presente estudo é o primeiro a analisar o papel da expressão imuno-histoquimica de IGF-1R, PKCθ (total e fosforilada) e RKIP e o papel da perda de heterozigose do gene *KIT* como biomarcadores de predição de resposta ao imatinibe em portadores de GIST metastático e que apesar dos viéses inerentes ao estudo, nossos resultados podem ser vistos como uma contribuição, na medida que suscita alguns questionamentos e especulações que poderão influenciar não só no entendimento a respeito da predição de resposta ao imatinibe, como também no tratamento dos portadores de GIST metastático no futuro. Fica claro que as hipóteses suscitadas merecem estudos adicionais com maior poder estatístico (desenho prospectivo, casuística maior) a fim de confirmá-las de forma inequívoca.

7. Conclusões

7. Conclusões

- A expressão imuno-histoquimica de IGF-1R parece ser um biomarcador preditor de resposta ao imatinibe em portadores de GIST metastáticos do sexo feminino.

- A presença da mutação no éxon 9 do gene *KIT* foi considerada fator prognóstico em portadores de GIST metastáticos tratados com imatinibe, tendo impacto adverso na sobrevida livre de progressão.

- Não houve associação entre a expressão imuno-histoquimica de PKCθ total, PKCθ fosforilada (resíduo Thr538) e RKIP e os desfechos estudados (taxa de resposta objetiva ao imatinibe, sobrevida global e sobrevida livre de progressão).

- Não houve associação entre a expressão imuno-histoquimica de PKCθ total, PKCθ fosforilada (resíduo Thr538) e RKIP e as variáveis estudadas (gênero, idade, sitio da metástase, presença de mutação nos genes *KIT* e *PDGFRA*).

- Os resultados referentes à perda de heterozigose do gene *KIT* na presente amostra não permitiram avaliação do seu papel como biomarcador preditor de resposta ao imatinibe no GIST metastático.

- A ausência de mutação no gene *BRAF* na presente amostra impediu a análise de associação com os desfechos estudados.

8. Perspectivas

8. Perspectivas

Apesar do presente estudo ter um caráter mais gerador de hipóteses do que conclusivo (em parte por conta das características do próprio estudo), o mesmo traz uma contribuição significativa, ao propor que a expressão de IGF-1R possa ser um biomarcador preditor de resposta ao imatnibe e que essa proteína possa ter um papel, até então não investigado na literatura, em portadores de GIST do sexo feminino. Deve ficar claro, contudo, que esse trabalho representa o primeiro passo na investigação dessa hipótese. A sua confirmação e validação pode contribuir para o tratamento do GIST metastático, subsidiando a adoção de novas estratégias terapêuticas (utilização de drogas-alvo em tumores que apresentam expressão do biomarcador, combinação de agentes visando bloquear todas as vias de sinalização, além da seleção mais acurada dos pacientes que terão beneficio com a adoção de tratamentos mais agressivos como a cirurgia, dentre outras), otimizando os resultados do tratamento desses pacientes.

Dessa forma, a perspectiva a partir do presente estudo se concentra na investigação adicional do real papel das moléculas estudadas, mais especificamente a expressão de IGF-1R, como biomarcadores preditores de resposta ao imatinibe em GIST metastático. Esse esclarecimento só será possível através de estudos prospectivos com alocação de uma série considerável de casos, a fim de reduzir possíveis viéses e permitir poder estatístico suficiente para responder a questão suscitada por nós.

9. Referências

9.Referências

AGAIMY, A. *et al.* **V600E *BRAF* mutations are alternative early molecular events in a subset of *KIT/PDGFRA* wild-type gastrointestinal stromal tumours**. J Clin Pathol 2009; 62(7): 613-6.

AGARAM, N. *et al*. **Novel V600E *BRAF* mutations in imatinib-naive and imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors.** Genes Chromossomes Cancer 2008; 47(10): 853-859.

ALTMAN, A.; VILLALBA, M. **Protein kinase C-theta (PKC theta): a key enzyme in T cell life and death**. J Biochem 2002;132(6):841-6.

ALTMAN, A.; VILLALBA, M. **Protein kinase C-theta (PKCtheta): it's all about location, location, location.** Immunol Rev 2003;192:53-63.

ANTONESCU, C.R. *et al*. **Acquired resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumor occurs through secondary gene mutation**. Clin Cancer Res 2005;11(11):4182-90.

BELINSKY, M.G. *et al*. **The insulin-like growth factor system as a potential therapeutic target in gastrointestinal stromal tumors.** Cell Cycle 2008;7(19):2949-55.

BENJAMIN, R.S. *et al*. **We should desist using RECIST, at least in GIST**. J Clin Oncol 2007; 25(13): 1760-1764.

BIOMARKERS DEFINITIONS WORKING GROUP. **Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework**. Clin Pharmacol Ther 2001;69(3):89-95.

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

BRACONI, C. *et al*. **Insulin-like growth factor (IGF) 1 and 2 help to predict disease outcome in GIST patients**. Ann Oncol 2008;19(7):1293-8.

BRAGGIO, D. **O papel das proteínas PKCθ, fosfo-PKCθ, DOG1 e IGF1R como potenciais biomarcadores de diagnóstico dos tumores estromais gastrointestinais (GISTs).** 2010. dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Oncologia, Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro, 2010.

BRAGGIO, E. *et al*. **Prognostic relevance of *KIT* and *PDGFRA* mutations in Gastrointestinal Stromal Tumors**. Anticancer Res 2010; 30: 2407-2414.

BUCHDUNGER, E. *et al*. **Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors.** J Pharmacol Exp Ther 2000; 295(1): 139-145.

CARROL, M. *et al*. **CGP 57148, a tyrosine kinase inhibitor, inhibits the growth of cells expressing BCR-ABL, TEL-ABL, and TEL-PDGFR fusion proteins.** Blood 1997; 90(12): 4947-4952.

CHOI, H. *et al*. **Correlation of computed tomography and positron emission tomography in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor treated at a single institution with imatinib mesylate: proposal of new computed tomography response criteria**. J Clin Oncol 2007;25(13):1753-9.

CORLESS, C.; FLETCHER, J.; HEINRICH, M. **Biology of gastrointestinal stromal tumors**. J Clin Oncol 2004;22:3813-25.

CORLESS, C. *et al*. **PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors: frequency, spectrum and in vitro sensitivity to imatinib**. J Clin Oncol 2005;23(23):5357-64.

DAVIES, H.; BIGNELL, G.; COX, C. **Mutations of the *BRAF* gene in human cancer.** Nature 2002;417: 949-954.

DEBIEC-RYCHTER, M. *et al*. **Use of c-KIT/PDGFRA mutational analysis to predict the clinical response to imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumours entered on phase I and II studies of the**

EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. Eur J Cancer 2004;40(5):689-95.

DEBIEC-RYCHTER, M. *et al*. **Mechanisms of resistance to imatinib mesylate in gastrointestinal stromal tumors and activity of the PKC412 inhibitor against imatinib-resistant mutants.** Gastroenterology 2005;128(2):270-9.

DEEDS, L. *et al*. **A p53-independent G1 cell cycle checkpoint induced by the suppression of protein kinase C alpha and theta isoforms**. J Biol Chem 2003;278(41):39782-93.

DEMATTEO, R. *et al*. **Two hundred gastrointestinal stromal tumors: recurrence patterns and prognostic factors for survival**. Ann Surg 2000;231(1):51-8.

DEMETRI, G. *et al*. **Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors**. N Engl J Med 2002;347(7):472-80.

DUENSING, A. *et al*. **Protein Kinase C theta (PKCtheta) expression and constitutive activation in gastrointestinal stromal tumors (GISTs).** Cancer Res 2004;64(15):5127-31.

EISENBERG, B.; JUDSON, I. **Surgery and imatinib in the management of GIST: emerging approaches to adjuvant and neoadjuvant therapy**. Ann Surg Oncol 2004;11(5):465-75.

FLETCHER, C.D. *et al*. **Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: A consensus approach**. Hum Pathol 2002;33(5):459-65.

FUKASAWA, T. *et al*. **Allelic loss of 14q and 22q, NF2 mutation, and genetic instability occur independently of c-kit mutation in gastrointestinal stromal tumor.** Jpn J Cancer Res 2000;91(12):1241-9.

GRAMZA, A.; CORLESS, C.; HEINRICH, M. **Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors in Gastrointestinal Stromal Tumors**. Clin Cancer Res 2009;15(24):7510-8.

GUIMARAES, D.P. *et al*. **Interferon-inducible guanylate binding protein (GBP)-2: a novel p53-regulated tumor marker in esophageal squamous cell carcinomas.** Int J Cancer 2009;124(2):272-9.

HEINRICH, M. *et al*. **Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor**. J Clin Oncol 2003;21(23):4342-9.

HEINRICH, M. **Molecular basis for treatment of gastrointestinal stromal tumor**. Eur J Cancer 2006;4 (suppl 1):S10-8.

HIROTA, S. *et al*. **Gain-of-function mutations of c-Kit in human gastrointestinal stromal tumors**. Science 1998;279:577-80.

HOSTEIN, I. *et al*. ***BRAF* mutations status in gastrointestinal stromal tumors.** Am J Clin Pathol 2010; 133: 141-148.

JOENSUU, H. *et al*. **Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor**. N Engl J Med 2001;344(14):1052-6.

KIKUCHI, H. *et al*. **Immunohistochemical and genetic features of gastric and metastatic liver gastrointestinal stromal tumors: sequential analyses**. Cancer Sci 2006;97(2):127-32.

KIKUCHI, H. *et al*. **Effect of loss of heterozygosity of the c-kit gene on prognosis after hepatectomy for metastatic liver gastrointestinal stromal tumors.** Cancer Sci 2007;98(11):1734-9.

KIM, K. *et al*. **PKCtheta expression in gastrointestinal stromal tumor**. Mod Pathol 2006;19(11):1480-6.

KLYSIK, J. *et al*. **Signaling crossroads: the function of Raf kinase inhibitory protein in cancer, the central nervous system and reproduction**. Cell Signal 2008; 20:1–9.

KOLCH, W. **Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interections.** Biochem J 2000; 351: 298-305.

LEHNERT, T. **Gastrointestinal sarcoma (GIST)--a review of surgical management.** Ann Chir Gynaecol 1998;87(4):297-305.

LINHARES, E.; VALADAO, M. **Atualização em GIST**. Rev Col Bras Cir 2006;33(1):51-4.

MANNA, P. *et al*. **Molecular mechanisms of Insulin-like Growth Factor-I mediated regulation of steroidogenic acute regulatory protein in mouse Leydig cells.** Mol Endocrinol 2006; 20: 362-378.

MARTINHO, O. *et al*. **Loss of RKIP expression is associated with poor survival in GISTs**. Virchows Arch 2009; 455(3): 277-284.

MARTINHO, O. *et al*. **Low frequency of MAP kinase signalling pathway alterations in KIT & PDGFRA wild-type GISTs**. Histopathology 2009; 55:53–62

MILLER, B.; YEE, D. **Type I insulin-like growth factor receptor as a therapeutic target in cancer.** Cancer Res 2005;65(22):10123-7.

MIRANDA, C. *et al*. ***KRAS* and *BRAF* mutations predict primary resistance to imatinib gastrointestinal tumors.** Clin Cancer Res 2012; 18(6): 1769-1776.

MOL, C. *et al*. **Structural basis for the autoinhibition and STI-571 inhibition of c-Kit tyrosine kinase**. J Biol Chem 2004;279(30):31655-63.

MUDAN, S. *et al*. **Salvage surgery for patients with recurrent gastrointestinal sarcoma: prognostic factors to guide patient selection.** Cancer 2000;88(1):66-74.

NG, E. *et al*. **Prognostic factors influencing survival in gastrointestinal leiomyosarcomas. Implications for surgical management and staging.** Ann Surg 1992;215(1):68-77.

OU, W. *et al*. **Protein Kinase C-θ regulates KIT expression and proliferation in gastrointestinal stromal tumors**. Oncogene 2008; 27(42): 5624-5634.

PANTALEO, M. *et al*. **The emerging role of insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1R) in gastrointestinal stromal tumors (GISTs).** J Transl Med 2010; 15(8): 117.

PIDHORECKY, I. *et al*. **Gastrointestinal stromal tumors: current diagnosis, biologic behavior, and management.** Ann Surg Oncol 2000;7(9):705-12.

RUBIN, B. *et al*. **KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors.** Cancer Res 2001;61: 8118-8121.

RUBIN, B.; HEINRICH, M.; CORLESS, C. **Gastrointestinal stromal tumour**. Lancet 2007; 369: 1731-1741.

SAMANI, A. *et al*. **The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights**. Endocr Rev 2007;28(1):20-47.

SCHRECK, R.; RAPP, U. **Raf kinases: oncogenesis and drug discovery.** Int J Cancer 2006; 119: 2261-2271.

SCHURR, P. *et al*. **Microsatellite DNA alterations of gastrointestinal stromal tumors are predictive for outcome**. Clin Cancer Res 2006;12(17):5151-7.

SUN, Z. *et al*. **PKC-theta is required for TCR-induced NF-kappaB activation in mature but not immature T lymphocytes.** Nature 2000;404(6776):402-7.

SURMACZ, E.; BARTUCCI, M. **Role of estrogen receptor alpha in modulating IGF-1 receptor signaling and function in breast cancer.** J Exp Clin Cancer Res 2004; 23(3): 385-394.

TARN, C. *et al*. **Insulin-like growth factor 1 receptor is a potential therapeutic target for gastrointestinal stromal tumors**. Proc Natl Acad Sci U S A 2008;105(24):8387-92.

THERASSE, P. *et al*. **New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors.** J Natl Cancer Inst 2000; 92: 205–1.

TRENT, J. *et al*. **Early effects of imatinib mesylate on the expression of insulin-like growth factor binding protein-3 and positron emission tomography in patients with gastrointestinal stromal tumor**. Cancer 2006;107(8):1898-908.

VALADAO, M. *et al*. **Fatores prognósticos clínicos e anatomopatológicos dos tumores estromais gastrointestinais (GIST) de origem gástrica.** Rev Col Bras Cir 2006;33(5):298-304.

VALADAO, M. *et al*. **Novas perspectivas no tratamento do GIST**. Rev Bras Cancerol 2006;52:373-9.

VALADAO, M.; LINHARES, E. **The role of the surgeon in the management of GIST.** Rev Col Bras Cir 2009;36(3):261-5.

VANGLABBEKE, M. *et al*.**Comparasion of two doses of imatinib for the treatment of unresectable or metastatic Gastrointestinal Stromal Tumors: A meta-analysis of 1,640 patients. Gastrointestinal Stromal Tumor Meta-Analysis Group (MetaGIST).** J Clin Oncol 2010; 28: 1247-1253.

VAN OOSTEROM, A. *et al*. **Safety and efficacy of imatinib (STI571) in metastatic gastrointestinal stromal tumours: a phase I study**. Lancet 2001;358(9291):1421-3.

VERWEIJ, J. *et al*. **Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumours with high-dose imatinib: randomised trial**. Lancet 2004;364(9440):1127-34.

YEUNG, K. *et al*. **Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP.** Nature 1999; 401:173–177.

ZHU, M. *et al*. **KIT oncoprotein interactions in gastrointestinal stromal tumors: therapeutic relevance**. Oncogene 2007;26(44):6386-95.

10. Anexos

10.Anexos

ANEXO I- Ficha clínica utilizada para coleta de dados

GIST		INICIAIS:
		PACIENTE:

1. IDENTIFICAÇÃO

Matrícula

Data de Nascimento (DD/MM/AA)

Sexo ☐ Feminino ☐ Masculino

Centro de Origem _____ Data de inclusão (DD/MM/AA)

2. APRESENTAÇÃO CLÍNICA INICIAL

Sítio ☐ Estômago ☐ Delgado ☐ Outro → _____ Especificar

Metástase ☐ NR ☐ Não ☐ Sim

Sítio da metástase _____

ANÁLISE DE INFORMAÇÃO EM PESQUISA – INCA/MS
Versão 1.0 – 17 de abril de 2008

	INICIAIS:
GIST	PACIENTE:

3. TRATAMENTO CIRÚRGICO

Cirurgia ☐ NR ☐ Não ☐ Sim

Data ☐☐/☐☐/☐☐☐☐ (DD/MM/AA)

Tipo de cirurgia _____

Tipo de ressecção ☐ R0 ☐ R1 ☐ R2 ☐ Irressecável

Rotura tumoral durante a cirurgia ☐ NR ☐ Não ☐ Sim

Metástase no momento da cirurgia ☐ NR ☐ Não ☐ Sim

Sítio da metástase _____

Ressecção da mestástase ☐ NR ☐ Não ☐ Sim

Invasão de órgãos adjacentes ☐ NR ☐ Não ☐ Sim

Nº de linfonodos ressecados ☐☐ Nº de linfonodos positivos ☐☐

EVOLUÇÃO PÓS CIRURGIA

Data da recidiva ☐☐/☐☐/☐☐☐☐ (DD/MM/AA)

Local da recidiva ☐ Locorregional ☐ Á distância → _____ especificar

Tratamento da recidiva ☐ NR ☐ Não ☐ Sim → _____ especificar

Cirurgia de resgate ☐ NR ☐ Não ☐ Sim → ☐☐/☐☐/☐☐☐☐ (DD/MM/AA)

Ressecção Completa ☐ NR ☐ Não ☐ Sim

		INICIAIS:
	GIST	PACIENTE:

4. TRATAMENTO COM IMATINIBE

Indicação ☐ Doença inicialmente metastática ☐ Recidiva à distância ☐ Doença localmente avançada ☐ Outra → _____

Data de início ☐☐/☐☐/☐☐ (DD/MM/AA) Dose Imatinibe ☐☐☐ mg/dia

Interrupção ☐ NR ☐ Não ☐ Sim → ☐☐/☐☐/☐☐ (DD/MM/AA)

Motivo da interrupção _____

Reinício ☐ NR ☐ Não ☐ Sim → ☐☐/☐☐/☐☐ (DD/MM/AA)

RESPOSTA AO IMATINIBE

Primeiro exame de avaliação de resposta ☐ TC ☐ RNM ☐ PET ☐ NR

Data do exame ☐☐/☐☐/☐☐ (DD/MM/AA)

Resposta ☐ Resposta completa ☐ Doença estável ☐ NR ☐ Resposta parcial ☐ Progressão de doença

Segundo exame de avaliação de resposta ☐ TC ☐ RNM ☐ PET ☐ NR

Data do exame ☐☐/☐☐/☐☐ (DD/MM/AA)

Resposta ☐ Resposta completa ☐ Doença estável ☐ NR ☐ Resposta parcial ☐ Progressão de doença

		INICIAIS:
	GIST	PACIENTE:

Aumento da dose ☐ NR ☐ Não ☐ Sim → data (DD/MM/AA)

2ª linha com Sunitinibe ☐ NR ☐ Não ☐ Sim → data (DD/MM/AA)

Cirurgia de resgate Pós-Imatinibe ☐ NR ☐ Não ☐ Sim → data (DD/MM/AA)

Status da cirurgia ☐ Completa ☐ Incompleta

	INICIAIS:
GIST	PACIENTE:

5. PROGRESSÃO PÓS IMATINIBE

☐ NR ☐ Não ☐ Sim

DATA (DD/MM/AA)	SÍTIO	TRATAMENTO		
		Sim	Não	Especificar

6. SEGUIMENTO

Óbito ☐ NR ☐ Não ☐ Sim → ☐☐/☐☐/☐☐ (DD/MM/AA)

Óbito por causa ☐ NR ☐ Não ☐ Sim → _____

Última consulta (Preencher somente se o paciente estiver vivo)

☐☐/☐☐/☐☐ (DD/MM/AA) ☐ Sem doença ☐ Com doença

☐☐/☐☐/☐☐ (DD/MM/AA) ☐ Sem doença ☐ Com doença

☐☐/☐☐/☐☐ (DD/MM/AA) ☐ Sem doença ☐ Com doença

OBSERVAÇÕES: _____

_____

	INICIAIS:
GIST	PACIENTE:

ANEXO. PATOLOGIA (No caso de mais de um bloco, usar outra folha)

Nº do Bloco

Data da coleta (DD/MM/AA)

Procedimento ☐ Cirurgia ☐ Biópsia

Sítio ☐ Primário ☐ Recidiva ☐ Metástase

Sítio _____

Subtipo histológico ☐ Fusiforme ☐ Epitelióide ☐ Misto

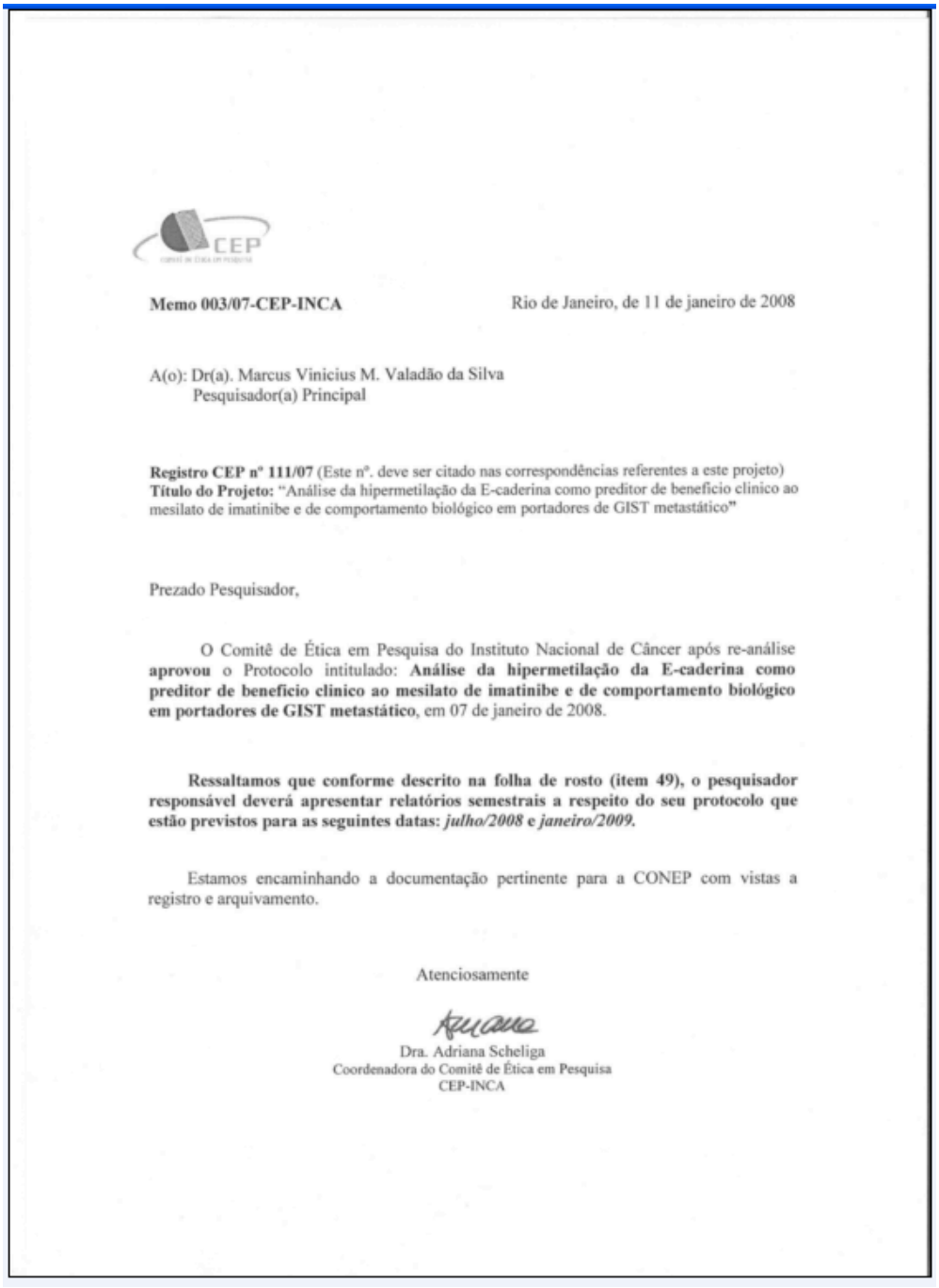
Índice mitótico /50 CGA Tamanho do tumor cm

IHQ KIT ☐ Negativo ☐ Positivo → %

Padrão ☐ Dot ☐ Citoplasmático ☐ Dot e Citoplasmático

Marcadores	Não Realizado	Positivo	Negativo
Vimentina			
Desmina			
CD34			
S100			

ANEXO II – Carta de aprovação do projeto no Comitê de ética em Pesquisa do INCA.



Memo 003/07-CEP-INCA Rio de Janeiro, de 11 de janeiro de 2008

A(o): Dr(a). Marcus Vinicius M. Valadão da Silva
Pesquisador(a) Principal

Registro CEP nº 111/07 (Este nº. deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)
Título do Projeto: "Análise da hipermetilação da E-caderina como preditor de beneficio clinico ao mesilato de imatinibe e de comportamento biológico em portadores de GIST metastático"

Prezado Pesquisador,

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer após re-análise **aprovou** o Protocolo intitulado: **Análise da hipermetilação da E-caderina como preditor de beneficio clinico ao mesilato de imatinibe e de comportamento biológico em portadores de GIST metastático**, em 07 de janeiro de 2008.

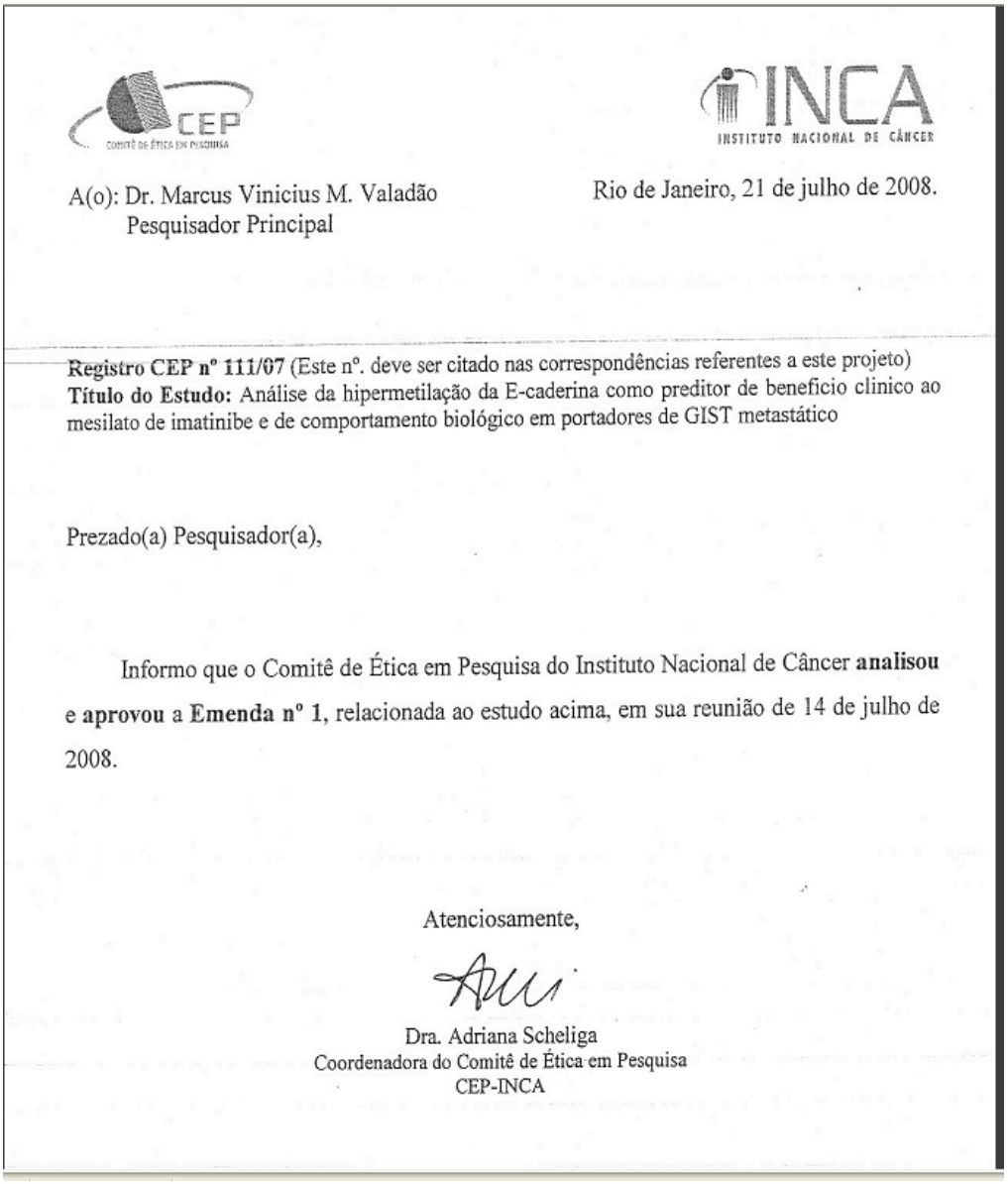
Ressaltamos que conforme descrito na folha de rosto (item 49), o pesquisador responsável deverá apresentar relatórios semestrais a respeito do seu protocolo que estão previstos para as seguintes datas: *julho/2008* e *janeiro/2009*.

Estamos encaminhando a documentação pertinente para a CONEP com vistas a registro e arquivamento.

Atenciosamente

Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA

ANEXO III – Cartas de aprovação das emendas apresentadas



CEP
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

INCA
INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

A(o): Dr. Marcus Vinicius M. Valadão
Pesquisador Principal

Rio de Janeiro, 21 de julho de 2008.

Registro CEP nº 111/07 (Este nº. deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)
Título do Estudo: Análise da hipermetilação da E-caderina como preditor de beneficio clinico ao mesilato de imatinibe e de comportamento biológico em portadores de GIST metastático

Prezado(a) Pesquisador(a),

Informo que o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer **analisou** e **aprovou** a **Emenda nº 1**, relacionada ao estudo acima, em sua reunião de 14 de julho de 2008.

Atenciosamente,

Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA

CEP

INCA
INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

A(o): Dr. Marcus Vinicius M. Valadão
Pesquisador Principal

Rio de Janeiro, 6 de fevereiro de 2009.

Registro CEP nº 111/07 (Este nº. deve ser citado nas correspondências referentes a este estudo)
Título do Estudo: Análise da hipermetilação da E-caderina como preditor de benefício clínico ao mesilato de imatinibe e de comportamento biológico em portadores de GIST metastático

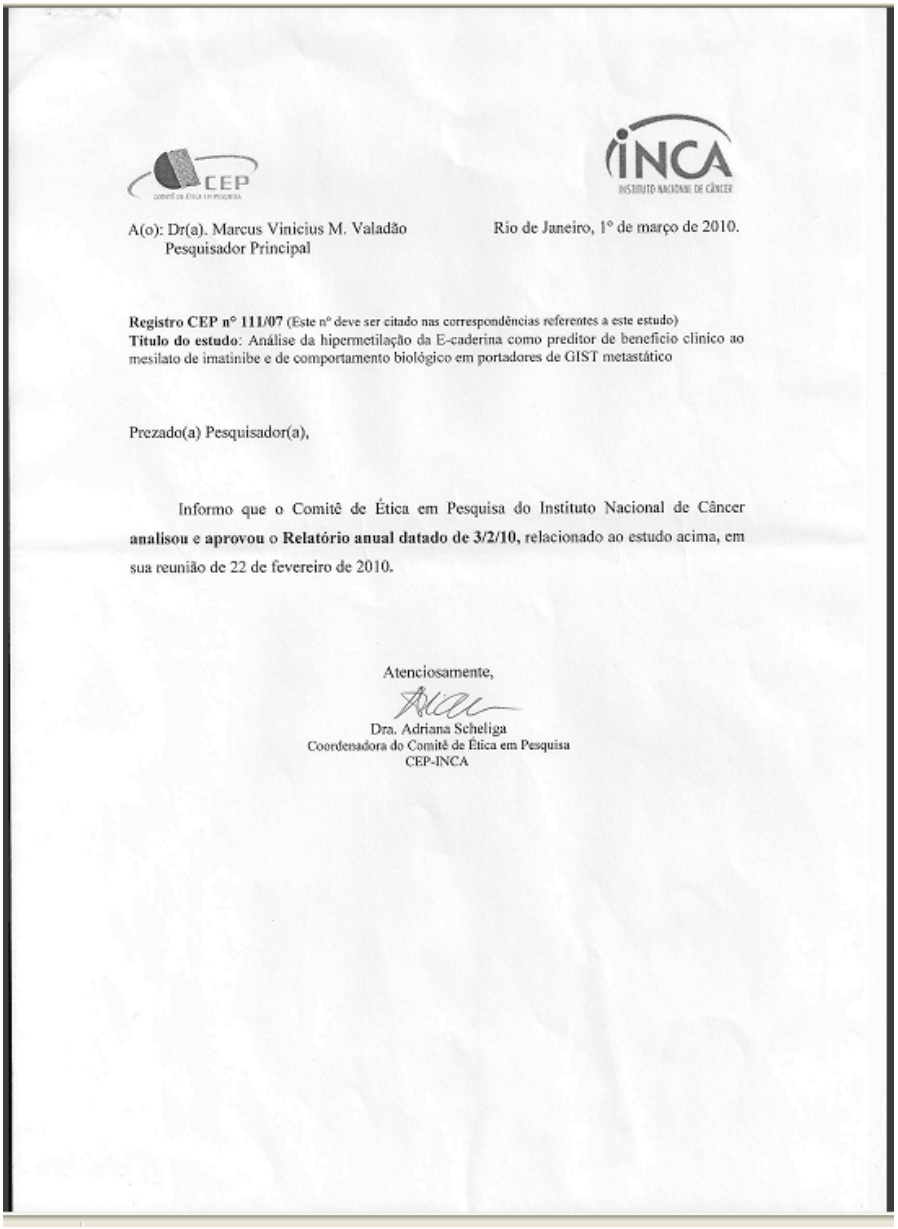
Prezado(a) Pesquisador(a),

Informo que o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer **analisou** e **aprovou** a **Emenda nº 2**, relacionada ao estudo acima, em sua reunião de 26 de janeiro de 2009.

Atenciosamente,

Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA

ANEXO IV- Carta de aprovação relatório anual



CEP

INCA
INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

A(o): Dr(a). Marcus Vinicius M. Valadão
Pesquisador Principal

Rio de Janeiro, 1° de março de 2010.

Registro CEP n° 111/07 (Este n° deve ser citado nas correspondências referentes a este estudo)
Título do estudo: Análise da hipermetilação da E-caderina como preditor de benefício clínico ao mesilato de imatinibe e de comportamento biológico em portadores de GIST metastático

Prezado(a) Pesquisador(a),

Informo que o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer **analisou** e **aprovou** o **Relatório anual datado de 3/2/10,** relacionado ao estudo acima, em sua reunião de 22 de fevereiro de 2010.

Atenciosamente,

Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA

ANEXO V- Perfil mutacional (genes *KIT* e *PDGFRA*) da amostra estudada

Paciente	Status mutacional (genes KIT e PDGFRA)	Tipo da mutação
1	Mutação gene *KIT* éxon 11	W557_K558del
2	Mutação gene *KIT* éxon 11	Q556_L576del
4	Mutação gene *KIT* éxon 11	K558_E561delinsEK
5	Mutação gene *KIT* éxon 11	V559_V560del
8	Mutação gene *KIT* éxon 11	W557_K558del
9	Selvagem	Selvagem
10	Mutação gene *KIT* éxon 11	K550_W557del
11	Mutação gene *KIT* éxon 11	L576P
12	NA	NA
13	Mutação gene *KIT* éxon 9	G499D
14	Mutação gene *PDGFRA* éxon 18	Deleção intrônica (intron 17/18)
17	Selvagem	Selvagem
18	Mutação gene *KIT* éxon 11	Q556_I571del
19	Mutação gene *KIT* éxon 11	W557_K558del
20	NA	NA
21	Mutação gene *KIT* éxon 11	W557_K558del
22	Mutação gene *KIT* éxon 11	Q556_T574del
23	Selvagem	Selvagem
24	Mutação gene *PDGFRA* éxon 18	R817C
26	Mutação gene *KIT* éxon 11	Q556_K558del
29	Mutação gene *KIT* éxon 11	R586K

Paciente	Status mutacional (genes KIT e PDGFRA)	Tipo da mutação
31	Mutação gene *PDGFRA* éxon 12	R554K
33	Mutação gene *KIT* éxon 11	W557_K558del
35	Mutação gene *PDGFRA* éxon 14	E644K
36	Mutação gene *KIT* éxon 11	V559D
37	Mutação gene *KIT* éxon 11	W557_K558del
38	Mutação gene *KIT* éxon 11	P547_E550del
40	NA	NA
41	Mutação gene *KIT* éxon 11	K558_V560del
43	Mutação gene *KIT* éxon 17	I817V
44	Mutação gene *KIT* éxon 11	Y569_L576del
45	Mutação gene *KIT* éxon 11	Duplicação codons 574 e 575(YD)
47	Mutação gene *KIT* éxon 9	K509I
48	Mutação gene *KIT* éxon 11	Q556_K558del
50	Mutação gene *KIT* éxon 11	W557_K558del
51	Mutação gene *KIT* éxon 11	L576P
52	Mutação gene *KIT* éxon 11	W557_K558del
53	Mutação gene *KIT* éxon 11	Q556_K558del
54	Mutação gene *KIT* éxon 11	W557_K558del
55	Mutação gene *KIT* éxon 11	Q575R
57	Mutação gene *KIT* éxon 11	W557_K558del
58	Mutação gene *PDGFRA* éxon 18	C814Y
59	Mutação gene *KIT* éxon 11	W557_K558del

Paciente	Status mutacional (genes KIT e PDGFRA)	Tipo da mutação
60	Mutação gene *KIT* éxon 11	W557_K558del
62	Mutação gene *KIT* éxon 11	P585T
63	Mutação gene *KIT* éxon 11	K558_V559delinsN
64	Mutação gene *KIT* éxon 11	W557_K558del
65	Mutação gene *KIT* éxon 9	A502_Y503dup
66	Mutação gene *KIT* éxon 17	D820Y
67	Mutação gene *KIT* éxon 9	A502_Y503dup
68	Mutação gene *KIT* éxon 11	K550_W557delinsIL
69	Selvagem	Selvagem
70	Mutação gene *KIT* éxon 11	Y553_K558del
71	Mutação gene *KIT* éxon 11	K558delinsNP
73	Mutação gene *KIT* éxon 11	W557_K558del
74	Mutação gene *KIT* éxon 11	W557_V559delinsC
75	Mutação gene *KIT* éxon 11	Q556_E561delinsP
76	Mutação gene *KIT* éxon 11	W557_K558del
78	Mutação gene *KIT* éxon 11	W557_K558del
79	Mutação gene *KIT* éxon 9	A502_Y503dup
80	Mutação gene *KIT* éxon 11	W557_V559delinsC
81	Mutação gene *KIT* éxon 11	D579N
82	Mutação gene *KIT* éxon 11	W557_K558del

ANEXO VI- Perfil imuno-histoquimico (expressão de IGF-1R, PKCθ total, PKCθ fosforilada e RKIP) da amostra estudada

Paciente	Expressão IGF1R	Score de Marcação IGF1R	Expressão PKC Theta Total	Score de Marcação PKC Theta total	Expressão Fosfo PKC Theta	Score de Marcação PKC Theta Fosforilada	Expressão RKIP	Score de Marcação RKIP
1	Não	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA
2	Sim	70	Sim	200	Sim	50	Sim	300
4	Não	-	Não	-	Não	-	Não	-
5	Não	-	Sim	20	Não	-	Sim	200
8	Sim	100	Sim	200	Não	-	Sim	200
9	Sim	100	Não	-	Não	-	Sim	200
10	Sim	200	Sim	300	Não	-	Sim	10
11	Sim	100	Sim	300	Não	-	Sim	300
12	Sim	120	Sim	300	Não	-	Sim	210
13	Sim	200	Sim	300	Sim	70	Sim	200
14	Não	-	Não	-	Não	-	Não	-
17	Sim	50	Sim	240	Sim	30	Sim	20
18	Sim	200	Sim	100	Não	-	Sim	80
19	Sim	100	Sim	200	Não	-	Sim	240

Paciente	Expressão IGF1R	Score de Marcação IGF1R	Expressão PKC Theta Total	Score de Marcação PKC Theta total	Expressão Fosfo PKC Theta	Score de Marcação PKC Theta Fosforilada	Expressão RKIP	Score de Marcação RKIP
20	Sim	200	Sim	300	Sim	70	Sim	70
21	Sim	70	Sim	200	Não	-	Sim	240
22	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
23	Sim	200	Sim	80	Não	-	Sim	20
24	Sim	80	Sim	200	Sim	140	Sim	240
26	Sim	30	Sim	300	Sim	100	Sim	100
29	NA	NA	NA	NA	Não	-	NA	NA
31	Sim	100	Sim	160	Não	-	Não	-
33	Sim	50	Sim	200	Sim	50	NA	NA
35	Não	-	Sim	200	Sim	140	Sim	100
36	Sim	100	Sim	100	Sim	70	Sim	100
37	Sim	100	Sim	300	Não	-	Sim	200
38	Sim	100	Sim	300	Sim	100	Sim	200
40	Sim	80	NA	NA	Sim	60	NA	NA
41	Sim	80	Sim	200	Sim	80	Sim	40
43	Sim	200	Sim	200	Sim	70	Sim	150

Paciente	Expressão IGF1R	Score de Marcação IGF1R	Expressão PKC Theta Total	Score de Marcação PKC Theta total	Expressão Fosfo PKC Theta	Score de Marcação PKC Theta Fosforilada	Expressão RKIP	Score de Marcação RKIP
44	Sim	140	Sim	160	Sim	100	NA	NA
45	Não	-	Sim	100	Não	-	Sim	270
47	Sim	100	Sim	200	Não	-	Sim	100
48	Sim	100	Sim	160	Sim	100	Sim	210
50	Sim	100	Sim	300	Sim	5	Não	-
51	Não	-	Sim	140	Não	-	Sim	40
52	Sim	90	Sim	90	Sim	70	Sim	240
53	Sim	100	Sim	60	Não	-	Sim	270
54	Sim	100	Sim	200	Não	-	Sim	70
55	Sim	200	Sim	200	Sim	70	Sim	300
57	Sim	40	Sim	160	Não	-	Sim	200
58	Não	-	Sim	160	Não	-	Sim	30
59	Não	-	Sim	100	Não	-	Não	-
60	Sim	30	Sim	60	Sim	20	Sim	70
62	Sim	300	Sim	200	Não	-	Sim	300
63	NA	NA	NA	NA	Não	-	Não	-

Paciente	Expressão IGF1R	Score de Marcação IGF1R	Expressão PKC Theta Total	Score de Marcação PKC Theta total	Expressão Fosfo PKC Theta	Score de Marcação PKC Theta Fosforilada	Expressão RKIP	Score de Marcação RKIP
64	Sim	100	NA	NA	Sim	200	Sim	200
65	Sim	200	Sim	200	Sim	300	Sim	300
66	Sim	100	NA	NA	NA	NA	NA	NA
67	Sim	100	Não	-	Não	-	Sim	200
68	Sim	240	Sim	200	Sim	140	Sim	300
69	Sim	300	Sim	300	Sim	100	Sim	300
70	Sim	300	Sim	200	Não	-	Sim	140
71	Sim	300	Sim	200	Sim	100	Sim	140
73	Sim	300	Sim	300	Não	-	Sim	100
74	Não	-	Sim	100	Não	-	Não	-
75	NA	NA	Sim	100	Não	-	Sim	300
76	Sim	200	Sim	300	Não	-	NA	NA
78	Sim	200	Sim	100	Não	-	Sim	20
79	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Sim	200
80	Sim	100	Sim	200	Não	-	Não	-
81	Sim	300	Sim	200	Não	-	Sim	100

Paciente	Expressão IGF1R	Score de Marcação IGF1R	Expressão PKC Theta Total	Score de Marcação PKC Theta total	Expressão Fosfo PKC Theta	Score de Marcação PKC Theta Fosforilada	Expressão RKIP	Score de Marcação RKIP
82	Sim	100	Sim	100	Sim	100	Sim	300

ANEXO VII- Artigo publicado (Journal of Surgical Research)

ARTICLE IN PRESS

JOURNAL OF SURGICAL RESEARCH XXX (2012) 1–6

Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

journal homepage: www.JournalofSurgicalResearch.com

Association for Academic Surgery

Involvement of signaling molecules in the prediction of response to imatinib treatment in metastatic GIST patients

Marcus Valadão, MD,[a,b] Danielle Braggio,[a] Anna Flávia Santos,[a] Haynna Kimie Pimenta-Inada,[a] Eduardo Linhares, MD, PhD,[b] Rinaldo Gonçalves, MD,[b] Sérgio Romano, MD,[c] Bruno Vilhena, MD,[a] Isabele Small,[a] Daniel Cubero, MD,[d] Felipe Cruz, MD,[d] Antônio Talvane Oliveira, MD,[e] Olga Martinho,[f] Rui Manuel Reis, PhD,[f,g] Denise Peixoto Guimarães, MD, PhD,[a,h] and Carlos Gil Ferreira, MD, PhD[a,]*

[a] Coordination of Clinical Research, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil
[b] Division of Abdominal-Pelvic Surgery, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil
[c] Division of Pathology, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil
[d] Department of Oncology, ABC Foundation School of Medicine, Santo André, Brazil
[e] Department of Surgery, Hospital do Câncer de Barretos, Barretos, Brazil
[f] Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), School of Health Sciences, University of Minho, Braga, Portugal
[g] Molecular Oncology Research Center, Hospital do Câncer de Barretos, Barretos, Brazil
[h] Department of Endoscopy, Hospital do Câncer de Barretos, Barretos, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 10 January 2012
Received in revised form
13 March 2012
Accepted 16 March 2012
Available online xxx

Keywords:
GIST
IGF
Imatinib mesylate
Metastatic
Prediction
Response

ABSTRACT

Imatinib therapy has undoubtedly contributed to the treatment of metastatic gastrointestinal stromal (GIST) tumors that were previously untreatable. However, disease progression during treatment with tyrosine kinase inhibitors remains an issue in clinical practice not fully explained by *KIT* and *PDGFRA* mutation status. We investigated the role of three important signaling molecules (insulin-like growth factor 1 receptor [IGF1R], protein kinase C-θ [PKCθ], and Raf kinase inhibitor protein [RKIP]) that have been implicated in GIST pathogenesis as potential biomarkers for prediction of response to imatinib treatment. We retrospectively reviewed 76 patients with metastatic GIST submitted to imatinib treatment between 2002 and 2007, and analyzed 63 of them. Insulin-like growth factor 1, total PKCθ, phosphorylated PKCθ, and RKIP immunohistochemical expression were correlated with objective response to imatinib treatment and progression-free and overall survival. Median follow-up was 31.2 mo (95% confidence interval, 26.3–36.1 mo). There was a statistically significant association between IGF1R expression and type of response to imatinib treatment ($P = 0.05$)—that is, higher IGF1R expression was related to lower objective response. However, IGF1R higher expression did not affect progression-free and overall survival. Insulin-like growth factor 1, but not PKCθ and RKIP, emerges as a potential biomarker for prediction of response to imatinib treatment in metastatic GISTs. Validation studies are warranted.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

* *Corresponding author.* Division of Clinical Research, Instituto Nacional de Câncer, Rua André Cavalcanti, 37- 2° andar-Centro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil-20231-050. Tel.: +55 2132076549; fax: +552132076566.
E-mail address: cferreira@inca.gov.br (C.G. Ferreira).

0022-4804/$ – see front matter © 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.jss.2012.03.031

1. Introduction

Historically, the median survival of patients with metastatic gastrointestinal stromal tumors (GIST) is 18–24 mo [1,2]. Fortunately, the management of advanced GIST has been revolutionized by the implementation of tyrosine kinase inhibitor (TKI) therapy [3], particularly imatinib, which provides better survival outcomes [4,5] and quality of life, even in disseminated disease [6]. Despite all of these benefits, approximately 75% of patients develop disease progression during imatinib treatment owing to drug resistance [5,7], which has become an increasingly relevant problem in clinical practice. Primary resistance is observed in approximately 10% of patients [5,7] and is most likely related to *KIT* exon 9 mutation and *PDGFRA* D842V mutation [4]. Unlike primary resistance, delayed imatinib resistance is most often associated with the expansion of tumor clones carrying secondary *KIT* or *PDGFRA* mutations [8–10]. However, secondary *KIT* mutations do not account for all imatinib-resistance cases, and other mechanisms must be regulating therapy response [6,11]. Recent evidence indicates that a signaling pathway other than *KIT* might be involved in GIST pathogenesis, and has been implicated as potential mechanism of resistance [9]. In particular, three signaling molecules (insulin-like growth factor 1 receptor [IGF1R], protein kinase C-θ [PKCθ], and Raf kinase inhibitor protein [RKIP]) have been implicated in GIST tumorigenesis as potential mechanisms of imatinib resistance and as potential therapeutic targets [9].

Insulin-like growth factor 1 receptor is overexpressed in GIST tumors, and the inhibition of IGF1R activity *in vitro* or down-regulation of IGF1R expression leads to cytotoxicity and induced apoptosis in GIST cell lines via protein kinase B and mitogen-activated protein kinase signaling [12,13]. Protein kinase Cθ can be expressed at higher levels in GIST [14], and PKCθ tyrosine phosphorylation was shown to be inhibited by imatinib and PKC412 (PKCθ kinase inhibitor) in GIST cell lines [15]. Attenuation of RKIP function is implicated in several human cancers [16]. Martinho *et al.* [17] showed that loss of RKIP expression was associated with poor disease-specific survival and with tumor necrosis in GISTs.

The evidence presented above points to multiple protein interactions and multiple layers of crosstalk between the signaling pathways of IGF1R, PKCθ, and RKIP in GIST pathogenesis; thus, it is logical to investigate these three markers together as potential predictive factors for imatinib therapy. Therefore, our aim was to evaluate the role of IGF1R, PKCθ (total PKCθ and phosphorylated PKCθ), and RKIP expression as biomarkers for prediction of the response to imatinib treatment in metastatic GIST.

2. Patients and methods

2.1. Patients and study design

We retrospectively reviewed 76 cases of metastatic GIST treated with imatinib from three Brazilian cancer centers (Instituto Nacional de Câncer, Hospital do Câncer de Barretos, and Faculdade de Medicina do ABC) from 2002 to 2007. All patients had a previous histopathological diagnosis of GIST, confirmed by morphology and immunophenotype, and were treated with imatinib for metastatic GIST. All analyzed samples were extracted from the primary tumors before imatinib therapy. The metastatic tumor sample was available in only four cases. We excluded *KIT*-negative tumors by immunohistochemistry (CD117; 1:100 dilution; Dako Corp, Carpinteria, CA). To assess treatment response, we used standard Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) criteria [18]. We dichotomized this variable (complete or partial response, or stable disease *versus* progression) for purposes of analysis. We used computed tomography and magnetic resonance imaging to assess response. The institutional ethics committees approved the study.

2.2. DNA extraction and mutation analysis

We extracted the genomic DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue blocks (primary tumor) using standard methods. We analyzed *KIT* mutational status by polymerase chain reaction (PCR) amplification and subsequent DNA sequencing of exons 9, 11, 13, and 17. We further analyzed tumors with wild-type *KIT* for *PDGFRA* mutations in exons 12, 14, and 18. Furthermore, we analyzed *KIT*/*PDGFRA* wild-type cases for the presence of *BRAF* mutations. Tables 1 and 2 detail the oligonucleotide sequences and amplification conditions. We purified PCR products using GFX TM PCR DNA and Gel Band Purification Kit H (GE Healthcare, Sao Paulo, Brazil) and subsequently sequenced them with DYEnamyc TM ET Terminator Cycle Sequencing Premix Kit H (GE Healthcare). Products were electrophoresed in ABI PRISM TM 377 or 3130 DNA automatic sequencers (Applied Biosystems, Foster City,

Table 1 – Primers used for PCR and DNA sequencing (KIT and PDGFRA).

Target gene	Primer target	Sequence (5′-3′)
KIT	Exon 9F	TTCCTAGAGTAAGCCAGGGC
	Exon 9R	ACAGAGCCTAAACATCCCCT
	Exon 11F	CCAGAGTGCTCTAATGACTGAGAC
	Exon 11R	AGGTGACATGGAAAGCCCCTG
	Exon 13F	CTGCATGCGCTTTGACATCAG
	Exon 13R	CTAGCATTGCCAAAATCATATT
	Exon 17F	GTTTTCTTTTCTCCTCCAACCT
	Exon 17R	CCTTTGCAGGACTGTCAAGC
PDGFRA	Exon 12F	CTCTGGTGCACTGGGACTTT
	Exon 12R	AAAGGGAGTCTTGGGAGGTT
	Exon 14F	TGGTAGCTCAGCTGGACTGAT
	Exon 14R	GGGATGGAGAGTGGAGGATT
	Exon 18F	ACCATGGATCAGCCAGTCTTGC
	Exon 18R	GTCAGGACGTACACTGCCTTTCGA

Polymerase chain reaction amplification consisted of one initial denaturing step of 2 min at 94°C, followed by 40 cycles of 94°C for 30 s, 60°C for 30 s, 72°C for 60 s, and a final extension step of 10 min at 72°C.

Table 2 – Primers used for PCR and DNA sequencing (BRAF).

Target gene	Primer target	Sequence (5′-3′)
BRAF	Exon 11F	AGGTTTTCTTTTTCTGTTTGGC
	Exon 11R	ACTTGTCACAATGTCACCACATTAC
	Exon 15F	TAATGCTTGCTCTGATAGGA
	Exon 15R	GGCCAAAAATTTAATCAGTGGA

Polymerase chain reaction amplification consisted of one initial denaturing step of 5 min at 95°C, followed by 38 cycles of 95°C for 45 s, annealing (58°C for exon 11 and 60°C for exon 15) for 45 s, extension at 72°C for 45 s, and a final extension step at 72°C for 10 min.

CA) and analyzed by Sequencher version 4.1 software (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI).

2.3. *Immunohistochemistry and tissue microarray*

We used formalin-fixed, paraffin-embedded tumor regions of representative tumor samples for preparation of tumor tissue microarray blocks. We made the tissue microarray block by using a 1.0-mm-diameter core biopsy needle. The tissue microarray block was cut into 4-μm sections followed by section deparaffinization in xylene and subsequently rehydrated in a graded series of ethanol. We performed heat-induced epitope retrieval using a steamer and citrate buffer (pH, 6.0; 10 mol/L) or pressure cooker or waterbath. We allowed the sections to cool and then immersed them in 3% hydrogen peroxide for 20 min to block endogenous peroxidase. The sections were incubated with primary antibody at 4°C overnight. Table 3 lists the primary antibodies used. We incubated the sections with secondary reagents, and then washed them in phosphate-buffered saline. We used the diaminobenzidine chromogen (Dako) for detection. Positive control was used as follows: prostate carcinoma (IGF1R and RKIP) and lymph node (total PKCθ and phosphorylated PKCθ).

We scored immunohistochemical staining, taking into account both staining intensity and extent, as described elsewhere [19]. We graded intensity of staining as follows: negative (score 0), weak (+, score 1), moderate (++, score 2), and strong (+++, score 3). We evaluated the extent of staining as the percentage of cells with cytoplasmic immunoreactivity. A final score was calculated by multiplying intensity by extent scores for each sample. One expert pathologist (S.R.) performed all immunohistochemistry evaluation in a blinded manner.

2.4. *Statistical analysis*

We performed statistical analysis using SPSS, version 18.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL). We used objective response as the primary endpoint of the study. We estimated progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) by the Kaplan-Meier survival method and compared them by log-rank test. Univariate analysis was done to assess the relationship between age, gender, site of the primary tumor, site of the metastases, immunohistochemical expression, *KIT*, and *PDGFRA* mutational status and PFS. Moreover, we investigated the correlation of these variables with OS and type of response to imatinib treatment (according to RECIST criteria) [18]. We assessed the role of immunohistochemical expression by using the absolute score number of each sample and dichotomizing the score in two different ways: below *versus* above the median expression score (we used the median expression score as the cutoff) and positive *versus* negative expression for each marker.

To assess the relationship between variables, we used the t-test (categorical *versus* numeric variable), chi-square or analysis of variance (categorical *versus* categorical variable), and Spearman rank coefficient (numeric *versus* numeric variable). A P value of ≤ 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. *Clinicopathological and demographic data*

Over the course of the study, we excluded from further analysis 13 of 76 patients initially intended for the study, which resulted in a cohort of 63 patients for the final study population. The reasons for exclusion were incomplete clinical information (seven cases) and suboptimal quality of the DNA (six cases). Table 4 shows the distribution of patients' clinicopathological and demographic characteristics.

3.2. *KIT, PDGFRA, and BRAF mutations*

We analyzed 60 patients for mutation status. (It was not possible to perform mutation analysis in three cases owing to the poor quality of the DNA sample.) Table 4 shows the frequency of *KIT*, *PDGFRA*, and *BRAF* mutations.

Table 3 – Antibody specifications.

Antigen	Clone	Dilution	Source	ART	DS
IGF1R	Polyclonal	1:200	Cell Signaling (Beverly, MA)	Pressure cooker	Novolink polymer (Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle, UK)
Total PKCθ	27	1:200	BD Biosciences PharMingen (San Diego, CA)	Steamer	Novolink polymer
Phospho-PKCθ (Thr538)	19	1:200	Cell Signaling	Pressure cooker	Novolink polymer
RKIP	Polyclonal	1:600	Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY)	Water bath	UltraVision Large Volume Detection System Anti-Polyvalent, HRP (Lab Vision Corporation)

ART = antigen retrieval technique; DS = detection system.

Table 4 – Clinicopathological and molecular features of GISTs.

Characteristics	n
Mean age (standard deviation) (y)	56 (±11.6)
Gender	
Male	33 (52.4%)
Female	30 (47.6%)
Site of primary tumor	
Stomach	26 (41.3%)
Small bowel	23 (36.5%)
Other	14 (22.2%)
Site of metastases	
Liver	31 (49.2%)
Peritoneum	20 (31.7%)
Both liver and peritoneum	12 (19.1%)
Mutation	
KIT Exon 11	44 (73.3%)
KIT Exon 9	5 (8.3%)
KIT Exon 17	2 (3.3%)
KIT Exon 13	0
PDGFRA Exon 18	3 (5.0%)
PDGFRA Exon 14	1 (1.6%)
PDGFRA Exon 12	1 (1.6%)
Wild-type	4 (6.6%)
BRAF Exon 11	0
BRAF Exon 15	0
IGF1R expression	
Positive	48 (82.8%)
Negative	10 (17.2%)
Total PKCθ expression	
Positive	51 (92.7%)
Negative	4 (7.3%)
Phosphorylated PKCθ expression	
Positive	25 (42.4%)
Negative	34 (57.6%)
RKIP expression	
Positive	47 (85.5%)
Negative	8 (14.5%)

3.3. *IGF1R, total PKCθ, phosphorylated PKCθ at Thr538, and RKIP immunohistochemical expression*

Table 4 details the frequency of expression of these markers, and Fig. 1 illustrates the immunohistochemical expression (strong staining). Insulin-like growth factor 1 receptor, total PKCθ, phosphorylated PKCθ, and RKIP expression median score were, respectively, 100, 200, 80, and 200. Insulin-like growth factor 1 receptor, total PKCθ, phosphorylated PKCθ and RKIP expression did not correlate with age, site of metastases, or *KIT* and *PDGFRA* mutation status. Only IGF1R expression correlated with gender—that is, IGF1R-positive expression was more common in the male group (93.8% *versus* 69.2%; $P = 0.014$). Moreover, the mean IGF1R expression score was higher in the male group compared with the female group, but not statistically significant (147 *versus* 130; $P = 0.475$).

3.4. *IGF1R, total PKCθ, phosphorylated PKCθ at Thr538, and RKIP expression and response to imatinib*

We observed a statistically significant association between IGF1R expression and the type of response to imatinib treatment ($P = 0.05$). The higher IGF1R expression was related to the lower objective response rate to imatinib therapy. The other tested variables did not correlate with objective response (Table 5).

3.5. *Biomarkers and disease outcomes*

Median follow-up was 31.2 mo (95% confidence interval [CI], 26.3–36.1) and the estimated median PFS was 34 mo (95% CI, 22.2–45.8 mo). Age, gender, site of tumor metastases, and site of the primary tumor did not correlate with PFS and OS. Univariate analysis yielded no significant association of PFS and OS with IGF1R, total PKCθ, phosphorylated PKCθ, and RKIP expression (Table 5).

There was a significant association between *KIT* mutation type and PFS. Indeed, patients with *KIT* exon 9 mutation tumors had worse PFS than did other mutations ($P = 0.027$). The impact of the type of mutation on OS was not statistically different ($P = 0.074$).

4. Discussion

Knowledge of imatinib-related determinants of sensitivity is of paramount importance for the selection of patients likely to derive benefit from imatinib treatment. Moreover, this information could influence the surgical management of these patients once it is known that only responders benefit from surgical approach in the setting of resectable metastatic GIST [20–22]. Insulin-like growth factor 1 receptor, PKCθ (total and phosphorylated), and RKIP are known to have an important role in GIST tumorigenesis. These proteins are involved in the mitogen-activated protein kinase pathway, which has been demonstrated to have an important role in GIST pathogenesis, imatinib resistance, and the mechanism of tumor progression [9,12]. Recently, IGF1R, PKCθ (total and phosphorylated), and RKIP have been recognized as prognostic markers [17,23] and as potential therapeutic targets in GIST tumors [9,12,14]. Yet, so far, these molecules have not been investigated as predictors of the response to imatinib therapy.

The population analyzed here mirrors metastatic GIST series reported elsewhere. First, our demographic findings are in accordance with published data regarding age, gender, site of the primary tumor, and metastases, as well as the *KIT*, *PDGFRA*, and *BRAF* mutation profiles in GIST patients [6,7,24]. Second, our data concerning the worse PFS related to *KIT* exon 9 mutation compared with other mutations corroborates with the MetaGIST findings [25] and confirms the role of *KIT* mutation status as a predictive factor.

On our hands, IGF1R, total PKCθ, phosphorylated PKCθ, and RKIP expression were not associated with age, site of metastases, or *KIT* and *PDGFRA* mutation status. Previous studies have shown that PKCθ and RKIP were expressed in GIST tumors regardless of *KIT* and *PDGFRA* mutation status [14,17]. Concerning IGF1R expression, conflicting data have been reported in the literature. Tarn *et al.* [12] showed higher IGF1R expression in wild-type GISTs compared with mutant GISTs. Conversely, in a larger series, Braconi *et al.* [23] detected IGF1R expression in all cases regardless of mutational status. Taken together with our current observations, these findings suggest

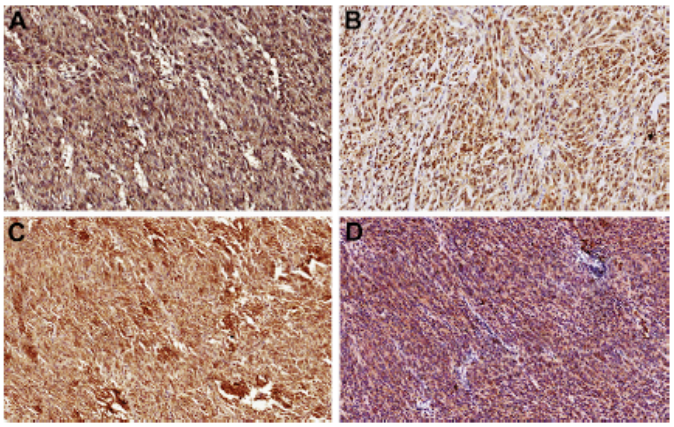


Fig. 1 – Immunohistochemical expression (strong staining) of (A) IGF1R, (B) RKIP, (C) total PKCθ, and (D) phosphorylated PKCθ.

that both wild-type and mutant GISTs may be at least partially under the same oncogenic stimulation.

Our findings showed that higher IGF1R expression was related to a lower objective response rate to imatinib therapy ($P = 0.05$). This finding reinforces the hypothesis that IGF1R expression may be an active oncogenic pathway in GIST and have a role in GIST cell proliferation, thereby contributing to the lower sensitivity of imatinib. Nevertheless, this higher IGFR1 expression was not translated into a worse PFS and OS, which may be due to the small sample size. Moreover, although it would be clinically relevant to evaluate the correlation between objective response and the conversion rate (a prediction from unresectable to resectable disease), it was not possible in our series owing to the retrospective nature of the study; there were different treatment strategies among the participating centers and sample heterogeneity (different percentages of unresectable cases before imatinib therapy, different performance status, and different tumor loads). Some features of this study might have led to bias, because our series estimated median PFS was 34 mo (95% CI, 22.2–45.8), higher than the 24 mo reported in previous publications [5,7]. This higher PFS could be explained by the retrospective nature of the study, and to the participation of three different cancer centers with different imaging follow-up intervals. Probably, some cases of disease progression could have been diagnosed earlier if the imaging follow-up had been done at a shorter interval. Moreover, we used the RECIST criteria [18] to assess disease progression because the criteria of Choi *et al.* [26] have only recently become the standard choice to evaluate disease response in GIST patients. It is well known that Choi *et al*'s. criteria are more accurate for detecting disease progression than the RECIST criteria [27]; this might have influenced the PFS outcomes.

To date, this is the first study to analyze the role of IGF1R, total PKCθ, phosphorylated PKCθ, and RKIP expression as biomarkers for prediction of the response to imatinib therapy in metastatic GIST patients. Our results suggest that IGF1R expression may be a biomarker for prediction of the response to imatinib treatment in metastatic GIST patients. Taking into consideration the need for a biomarker in this context and limits of our study (retrospective analysis, multicenter study, and small sample size), we believe that more studies are warranted to confirm and extend our findings of the role of IGF1R in the predictive response to imatinib therapy. However, the present study draws attention to the promising issue of identifying more reliable biomarkers of response prediction to imatinib and other TKIs, and prompts additional investigations addressing this question in prospective, larger series.

Table 5 – Association of IGF1R, total PKCθ, phosphorylated PKCθ, and RKIP expression with PFS, OS, and objective response to imatinib therapy.

Variable	PFS[a] (P value)	OS[a] (P value)	Objective response[b] (P value)
IGF1R expression	0.63	0.39	0.05
Total PKCθ expression	0.49	0.40	0.13
Phosphorylated PKCθ expression	0.89	0.60	0.48
RKIP expression	0.22	0.73	0.30

a Log-rank test.
b Chi-square test.

Acknowledgments

This work was supported by an unrestricted grant from Novartis Brazil. Financial support was also provided by Fundação do Cancer and Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro–Brazil.

REFERENCES

[1] DeMatteo RP, Lewis JJ, Leung D, et al. Two hundred gastrointestinal stromal tumors: Recurrence patterns and prognostic factors for survival. Ann Surg 2000;231:51.
[2] Ng EH, Pollock RE, Munsell MF, et al. Prognostic factors influencing survival in gastrointestinal leiomyosarcomas. Implications for surgical management and staging. Ann Surg 1992;215:68.
[3] Joensuu H, Roberts PJ, Sarlomo-Rikala M, et al. Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor. N Engl J Med 2001;344:1052.
[4] Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, et al. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. J Clin Oncol 2003;21:4342.
[5] Verweij J, Casali PG, Zalcberg J, et al. Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumours with high-dose imatinib: Randomised trial. Lancet 2004;364:1127.
[6] Rubin B, Heinrich M, Corless C. Gastrointestinal stromal tumour. Lancet 2007;369:1731.
[7] Blanke CD, Rankin C, Demetri GD, et al. Phase III randomized, intergroup trial assessing imatinib mesylate at two dose levels in patients with unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors expressing the kit receptor tyrosine kinase: S0033. J Clin Oncol 2008;26:626.
[8] Antonescu CR, Besmer P, Guo T, et al. Acquired resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumor occurs through secondary gene mutation. Clin Cancer Res 2005;11:4182.
[9] Gramza AW, Corless CL, Heinrich MC. Resistance to tyrosine kinase inhibitors in gastrointestinal stromal tumors. Clin Cancer Res 2009;15:7510.
[10] Negri T, Pavan GM, Virdis E, et al. T670X KIT mutations in gastrointestinal stromal tumors: Making sense of missence. J Natl Cancer Inst 2009;101:194.
[11] Corless C, Fletcher J, Heinrich M. Biology of gastrointestinal stromal tumors. J Clin Oncol 2004;22:3813.
[12] Tarn C, Rink L, Merkel E, et al. Insulin-like growth factor 1 receptor is a potential therapeutic target for gastrointestinal stromal tumors. Proc Natl Acad Sci U S A 2008;105:8387.
[13] Agaram NP, Laquaglia MP, Ustun B, et al. Molecular characterization of pediatric gastrointestinal stromal tumors. Clin Cancer Res 2008;14:3204.
[14] Duensing A, Joseph NE, Medeiros F, et al. Protein kinase C theta (PKCtheta) expression and constitutive activation in gastrointestinal stromal tumors (GISTs). Cancer Res 2004; 64:5127.
[15] Zhu MJ, Ou WB, Fletcher CD, et al. KIT oncoprotein interactions in gastrointestinal stromal tumors: Therapeutic relevance. Oncogene 2007;26:6386.
[16] Klysik J, Theroux SJ, Sedivy JM, et al. Signaling crossroads: The function of Raf kinase inhibitory protein in cancer, the central nervous system and reproduction. Cell Signal 2008; 20:1.
[17] Martinho O, Gouveia A, Silva P, et al. Loss of RKIP expression is associated with poor survival in GISTs. Virchows Arch 2009;455:277.
[18] Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. J Natl Cancer Inst 2000;92:205.
[19] Guimaraes DP, Oliveira IM, Paiva GR, et al. Interferon-inducible guanylate binding protein (GBP)-2: A novel p53-regulated tumor marker in esophageal squamous cell carcinomas. Int J Cancer 2009;124:272.
[20] Raut C, Posner M, Desai J, et al. Surgical management of advanced gastrointestinal stromal tumors after treatment with targeted systemic therapy using kinase inhibitors. J Clin Oncol 2006;24:2325.
[21] DeMatteo R, Maki R, Singer S, et al. Results of kinase inhibitors therapy followed by surgical resection for metastatic gastrointestinal stromal tumor. Ann Surg 2007; 245:347.
[22] Gronchi A, Fiore M, Miselli F, et al. Surgery of residual disease following molecular-targeted therapy with imatinib mesylate in advanced/metastatic GIST. Ann Surg 2007; 245:341.
[23] Braconi C, Bracci R, Bearzi I, et al. Insulin-like growth factor (IGF) 1 and 2 help to predict disease outcome in GIST patients. Ann Oncol 2008;19:1293.
[24] Braggio E, Braggio D, Small I, et al. Prognostic relevance of KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors. Anticancer Res 2010;30:2407.
[25] VanGlabbeke M, Verwiej J, Blay JY, et al. Comparasion of two doses of imatinib for the treatment of unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors: A meta-analysis of 1,640 patients. Gastrointestinal Stromal Tumor Meta-Analysis Group (MetaGIST). J Clin Oncol 2010;28:1247.
[26] Choi H, Charnsangavej C, Faria SC, et al. Correlation of computed tomography and positron emission tomography in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor treated at a single institution with imatinib mesylate: Proposal of new computed tomography response criteria. J Clin Oncol 2007;25:1753.
[27] Benjamin RS, Choi H, Macapinlac HA, et al. We should desist using RECIST, at least in GIST. J Clin Oncol 2007;25:1760.