

António Manuel Ferreira de Gouveia

**Tumores Mesenquimatosos do Tubo Digestivo**

**Estudo de parâmetros clínico-patológicos e de prognóstico,  
com especial ênfase nos Tumores Estromais Gastrointestinais**

Dissertação de candidatura ao grau de Doutor  
apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Fevereiro de 2011

## RESUMO

**Introdução:** Os tumores estromais gastrointestinais (GISTs) são os tumores mesenquimatosos mais frequentes no tracto gastrointestinal (GI), constituindo ~1-3% das neoplasias malignas nesta localização. A maioria dos GISTs é esporádica, mas há formas hereditárias, incluindo algumas famílias com mutações germinativas nos genes *KIT* e *PDGFRA*. O diagnóstico deve ser confirmado pelo estudo imuno-histoquímico dos tumores, integrado no contexto clínico e morfológico. Os GISTs expressam geralmente CD117 (95%) e CD34 (70%). O comportamento biológico é incerto e a classificação (incluindo > dimensão, índice mitótico e localização GI) em categorias de risco é útil para prever o comportamento clínico dos GISTs. Caracterizam-se por mutações activantes nos genes dos receptores tirosina-cinásicos *KIT* (até cerca de 85% dos casos) ou *PDGFRA* (5-8%) nas células tumorais, sendo que 10-15% não apresentam mutações destes proto-oncogenes (GISTs *wild-type*). A ressecção cirúrgica completa, sem linfadenectomia, é considerada o tratamento padrão dos GISTs primários localizados (sem evidência de disseminação peritoneal ou metastização à distância). A inibição *KIT*/*PDGFRA* com terapêuticas inibidoras tirosina-cinásicas (imatinib e sunitinib) permite o controlo de GISTs inoperáveis e/ou metastáticos. A resposta clínica objectiva ao imatinib e sunitinib parece depender da presença e do tipo de mutações nos genes *KIT* e *PDGFRA*.

**Objectivos:** Estudar parâmetros clínico-patológicos, imuno-histoquímicos e moleculares numa série de doentes consecutivos (1989-2006) com GIST, diagnosticados no Hospital de São João: (I) analisar o valor prognóstico da qualidade das margens cirúrgicas no tratamento dos doentes com GIST primário; (II) avaliar os procedimentos de diagnóstico de GIST no esófago (localização rara) e rever as opções terapêuticas mais adequadas nesta localização; (III) avaliar o estado mutacional dos genes *KIT* e *PDGFRA* e a sua correlação com as características clínico-patológicas, e com o prognóstico dos doentes; (IV) identificar alterações moleculares alternativas em GISTs *wild-type*, potencialmente úteis para o diagnóstico e preditivas de resposta a terapêuticas dirigidas a novos alvos moleculares; e (V) avaliar a expressão de *RKIP*, a sua associação com parâmetros clínico-patológicos, e esclarecer o papel deste marcador em doentes com GISTs primários.

**Material e métodos:** Foram reavaliados os registos clínicos e anátomo-patológicos de todos os casos de GIST identificados (n=114). Foi avaliado todo o material anátomo-patológico disponível em cortes corados por HE e o diagnóstico de GIST estabelecido de acordo com a classificação OMS. Realizaram-se estudos imuno-histoquímicos em cortes representativos de cada tumor com o método do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase. Foram utilizados nos diversos trabalhos os seguintes anticorpos: CD117, actina, desmina, proteína S100, CD34, fosfo-*KIT*, SCF, fosfo-ERK e *RKIP*. As amostras para extracção de ADN foram obtidas por dissecação de áreas seleccionadas. O estudo molecular incluiu as seguintes técnicas, consoante os trabalhos: amplificação por PCR ou PCR-SSCP, seguida de sequenciação directa, e análise mutacional dos genes *KIT*, *PDGFRA*, *H-RAS*, *K-RAS*, *N-RAS*, *BRAF* e *RKIP*. A análise da sobrevida global (SG), da sobrevida específica (SE) e da sobrevida livre de recidiva (SLR) dos casos submetidos a cirurgia de ressecção (n=104) foi realizada pelo método de Kaplan-Meier e com o teste *Log rank*. A associação entre variáveis clínico-patológicas, moleculares e a recidiva do tumor foi analisada com o teste Qui-quadrado ou com o teste exacto de Fisher. Na análise univariada foi utilizado o modelo de regressão de Cox

separadamente para cada variável. A análise multivariada foi efectuada com o modelo de riscos proporcionais de Cox.

**Resultados:** (I) Obteve-se ressecção completa macroscópica (R0 ou R1) em 92,3% dos GISTs e margens microscópicas negativas (R0) em 75% dos casos. A ressecção cirúrgica dos GISTs primários associou-se a SE e SLR aos 5 anos de 87,7% e 89,8%, respectivamente. A taxa de recidiva foi significativamente ( $p=0,045$ ) menor nos casos R0. Na análise multivariada, apenas a presença de tumor residual macroscópico (R2) se associou significativamente ( $p=0,013$ ) a SE mais curta dos doentes. (II) Diagnosticou-se um GIST esofágico de alto risco de agressividade, com expressão CD117 e mutação no exão 11 do *KIT* (557del558). O caso (achado radiológico incidental, sem biópsia prévia) foi submetido a esofagectomia transtorácica de tipo *Ivor Lewis*, que permitiu obter margens R0. (III) 92% dos GISTs expressaram CD117, sem associação significativa entre essa expressão e a presença de mutações do *KIT*. Nos 78 doentes com estudo molecular, observou-se 56,4% com mutações do *KIT*, 91% das quais no exão 11 e 9% no exão 9. A presença de mutações do *KIT* associou-se a pior prognóstico e a sobrevida mais curta dos doentes ( $p=0,0460$ ). Na análise do *PDGFRA* identificou-se mutações em 6% dos casos (15% dos GISTs *KIT wild-type*), 80% (4/5) das quais em tumores gástricos. Todos os GISTs com mutações do *PDGFRA* tinham expressão de CD117. De todas as mutações resistentes ao imatinib, identificou-se a mutação D842V em 2 GISTs desta série. (IV) Na reavaliação dos casos *wild-type* ( $n=29$ ) identificaram-se 3 casos com duplicação no exão 11, permitindo ajustar para 33% a percentagem efectiva de GISTs *wild-type* na nossa série. Nos GISTs *wild-type* ( $n=26$ ), identificou-se co-expressão do ligando (SCF) e do receptor *KIT* (CD117) em ~65% dos casos e expressão de fosfo-*KIT* em ~30% dos casos com expressão de *KIT* e SCF. Não se identificaram mutações do *H-RAS*, *K-RAS* ou *N-RAS* (via de sinalização MAPK) nestes GISTs *wild-type*; identificou-se mutação activante V600E do gene *BRAF* num caso (4%) de GIST *wild-type*. Não se identificou qualquer mutação do *BRAF* nos GISTs com mutações do *KIT* ou do *PDGFRA*. A expressão de fosfo-ERK foi identificada em 30% dos casos *wild-type* e em 50% dos tumores sem expressão de fosfo-*KIT*. (V) A ausência de expressão citoplasmática de RKIP [8,5% (6/70) dos casos] associou-se significativamente com a presença de necrose ( $p=0,038$ ) e com SE mais curta ( $p=0,023$ ) dos doentes. Observou-se uma tendência (não significativa) entre a presença de expressão RKIP e a ausência de metastização. Não se identificou metilação do promotor do *RKIP* nos 6 GISTs sem expressão de RKIP.

**Conclusões:** (I) Na nossa série de 104 GISTs submetidos a cirurgia de ressecção, obteve-se ressecção macroscópica completa (R0 ou R1) do tumor em 92,3% dos casos. A SE e a SLR observadas enquadram-se com os resultados de outros estudos publicados. A taxa de recidiva foi significativamente menor nos casos R0, mas na análise multivariada apenas a ressecção R2 se associou significativamente a sobrevida mais curta dos doentes. De acordo com as recomendações de consenso actuais, os nossos resultados sublinham o valor prognóstico da ressecção macroscópica completa dos tumores, com o objectivo de se obterem margens microscópicas negativas e evitar a ruptura do tumor. (II) A opção terapêutica mais adequada para os GISTs do esófago depende da confirmação diagnóstica prévia, da localização no esófago, da dimensão/extensão loco-regional do tumor e do risco cirúrgico do doente. A esofagectomia, seguindo os princípios oncológicos, e sem prejuízo da opção neoadjuvante, é o procedimento cirúrgico indicado na maioria dos casos, para uma ressecção R0. (III) Descrevemos pela primeira vez a frequência de mutações do *KIT* e do *PDGFRA* numa série de doentes portugueses com

GIST. A frequência global de mutações do *KIT* e do *PDGFRA* (63%) é concordante com os resultados de outros estudos, especialmente em populações ibéricas. Foram identificadas mutações do *KIT* em 56% dos casos e mutações do *PDGFRA* em 6% dos tumores. A presença de mutações do *KIT* parece associar-se com sobrevida mais curta dos doentes. A grande maioria (91%) das mutações activantes do *KIT* localiza-se no exão 11, indicando a possibilidade de resposta favorável à terapêutica destes doentes com imatinib. (IV) Este estudo constitui uma análise compreensiva da desregulação da via MAPK em GISTs *wild-type* (*KIT* e *PDGFRA*). Na ausência de mutações *RAS* sugere-se que a via da MAPK pode ser activada através de mecanismos autócrinos/parácrinos de SCF/*KIT* e/ou por mutação do *BRAF* num subgrupo de GISTs *wild-type*. As mutações activantes V600E nos GISTs *wild-type* levantam a possibilidade de terapêutica com inibidores da cínase RAF neste subgrupo de tumores. (V) Descreve-se pela primeira vez a associação significativa entre os níveis de expressão tumoral de RKIP e parâmetros clínico-patológicos em doentes com GIST. Verificou-se que a perda de expressão de RKIP num subgrupo de GISTs parece ser independente da metilação do promotor, e associa-se significativamente a necrose tumoral e a sobrevida mais curta dos doentes. A participação de RKIP na progressão tumoral e no desenvolvimento de metástases sugere que este marcador pode ter potencial prognóstico, e pode permitir novas abordagens terapêuticas específicas, baseadas na modulação da expressão de RKIP em doentes com GIST.

**Palavras-chave:** GIST, tumor estromal gastrointestinal, GIST do esófago, margens cirúrgicas, sobrevida, imuno-histoquímica, análise mutacional, *KIT*, *PDGFRA*, *wild-type*, MAPK, *BRAF*, RKIP.

## ABSTRACT

**Introduction:** Gastrointestinal stromal tumors (GISTs) are the most common gastrointestinal tract (GI) mesenchymal tumors, accounting for ~1-3% of all malignant neoplasms in this location. Most GISTs are sporadic, but there are hereditary forms, including some families with germline *KIT* and *PDGFRA* gene mutations. GIST diagnosis must be confirmed by immunohistochemistry of tumors, and integrated with other clinical and morphological features. GISTs usually express CD117 (95%) and CD34 (70%). Biological behavior is uncertain and classification (including largest size, mitotic rate and GI site) in risk categories is useful for predicting clinical behavior of GISTs. These tumors are characterized by oncogene mutations in *KIT* (up to ~85%) or *PDGFRA* (5-8%) receptor tyrosine kinases (RTKs) genes; 10-15% does not harbor any of the aforementioned gene mutations: so called wild-type GISTs. Complete surgical resection, without lymph node dissection, is considered standard treatment for primary localized GISTs (without peritoneal dissemination or metastatic disease). *KIT*/*PDGFRA* inhibition with tyrosine kinase inhibitors (imatinib and sunitinib) may control inoperable and/or metastatic disease. The objective clinical response to imatinib and sunitinib seems to be dependent on the presence and type of *KIT* and *PDGFRA* mutation.

**Objectives:** Study of clinicopathological, molecular and immunohistochemistry parameters in a series of consecutive (1989-2006) GIST patients, diagnosed at Hospital de S. João: (I) to analyze the prognostic value of surgical margins status in the treatment of primary GISTs; (II) to evaluate diagnostic procedures in esophageal GIST and review major therapeutic options for GISTs occurring in this rare GI site; (III) to assess the mutational status of *KIT* and *PDGFRA* genes and its correlation with clinicopathological parameters, and patient's prognosis; (IV) to identify alternative molecular alterations in wild-type GISTs, which may be useful for diagnosis and as predictive markers of response with novel molecular targeted therapy; and (V) to evaluate RKIP expression, its association with clinicopathological parameters, and clarify the role of this marker in patients with primary GIST.

**Material and methods:** The clinical and pathological files of all identified GIST cases (n=114) were reevaluated. All available pathological material was evaluated with H&E stained sections and the diagnosis of GIST was established according to the WHO classification. Immunohistochemistry analysis was performed in representative sections of each tumor using the streptavidin-biotin-peroxidase complex method. The following antibodies were used in the study: CD117, actin, desmin, S100 protein, CD34, phospho-KIT, SCF, phospho-ERK and RKIP. Samples for DNA extraction were obtained by dissection of selected areas. The study included also the following molecular techniques: PCR amplification or PCR-SSCP, followed by direct sequencing, and mutational analysis of *KIT*, *PDGFRA*, *H-RAS*, *K-RAS*, *N-RAS*, *BRAF* and *RKIP* genes. Overall survival (OS), disease-specific survival (DSS) and recurrence-free survival (RFS) analysis in resection cases (n=104) were analyzed with the Kaplan-Meier method and Log rank test. Association between clinicopathological, molecular parameters and tumor recurrence was analyzed with Qui-square test or the Fisher exact test. The Cox regression model was used in the univariate analysis of each variable. Multivariate analysis was performed with the Cox proportional hazards model.

**Results:** (I) We obtained complete macroscopic resection (R0 or R1) in 92.3% of GISTs and microscopic negative margins (R0) in 75% of cases. 5-year DSS and RFS was 87.7% and 89.8%, respectively, after surgical resection of patient's primary GIST. The recurrence rate was significantly ( $p=0.045$ ) lower in R0 cases. In the multivariate analysis, only the presence of macroscopic residual tumor (R2) was significantly associated ( $p=0.013$ ) with shorter DSS. (II) An esophageal high-risk GIST was diagnosed, expressing CD117 and harboring a *KIT* mutation in exon 11 (557del558). This case (a radiological incidental finding, without previous biopsy) underwent an Ivor Lewis transthoracic esophagectomy, and R0 margins were obtained. (III) 92% of GISTs expressed CD117, without significant association with *KIT* mutation status. Molecular analysis of 78 cases disclosed 56.4% *KIT* mutations, 91% of which in exon 11 and 9% in exon 9. *KIT* mutated cases associated with worst prognosis and shorter survival ( $p = 0.0460$ ) of patients. *PDGFR4* analysis disclosed mutations in 6% of the cases (15% of *KIT* wild-type GISTs), 80% (4/5) of which were gastric. All GISTs with *PDGFR4* mutation displayed CD117 expression. Of all imatinib resistant mutations, only D842V mutation was identified in 2 GISTs of the series. (IV) The reevaluation of wild-type cases ( $n = 29$ ) disclosed 3 cases with duplication in exon 11, allowing the adjustment to 33% of wild-type GISTs in our series. In wild-type GISTs ( $n = 26$ ), co-expression of ligand (SCF) and *KIT* receptor (CD117) was observed in ~65% of the cases, and the expression of phospho-*KIT* in ~30% of the cases expressing *KIT* and SCF. No mutations of *H-RAS*, *K-RAS* or *N-RAS* (MAPK signaling pathway) were identified in our wild-type GISTs; *BRAF* V600E mutation was identified in a wild-type GIST case (4%). No *BRAF* mutation was observed in any *KIT* or *PDGFR4* mutated GIST. Phospho-ERK expression was observed in 30% wild-type cases and in 50% of GISTs without phospho-*KIT* expression. (V) The absence of RKIP cytoplasmic expression [8.5% (6/70) of the cases] was significantly associated with the presence of necrosis ( $p = 0.038$ ) and shorter DSS ( $p=0.023$ ) of patients. A trend (not significant) was observed between RKIP expression and lack of metastases. *RKIP* promoter methylation was not identified in any of the 6 GISTs lacking RKIP expression.

**Conclusions:** (I) In our series of 104 GISTs submitted to resection, complete macroscopic tumor resection (R0 or R1) was obtained in 92.3% of cases. The DSS and RFS values in our patients fit with results published in other studies. The recurrence rate was significantly lower in R0 cases, but in multivariate analysis only R2 resection was significantly associated with shorter survival of patients. According to the actual consensus recommendations, our results underline the prognostic importance of complete macroscopic surgical tumor resection, with the aim of achieving negative microscopic margins, and avoiding tumor rupture. (II) Most appropriate therapeutic option for esophageal GISTs depends on prior diagnostic confirmation, location in the esophagus, tumor size/loco-regional extension, and patient's performance status. An esophagectomy following oncologic principles, considering neoadjuvant option, is the recommended surgical procedure to achieve R0 resection in most cases. (III) We described for the first time *KIT* and *PDGFR4* mutation frequency in a series of Portuguese GIST patients. The overall frequency of *KIT* and *PDGFR4* mutations (63%) is consistent with results from other studies, namely in Iberian patients. *KIT* mutations were identified in 56% and *PDGFR4* mutations in 6% of our GISTs. The presence of *KIT* mutation seems to associate with shorter survival of patients. The large majority (91%) of *KIT* mutations were in exon 11, indicating a favorable response to imatinib therapy. (IV) Our study represents a comprehensive analysis of MAPK pathway deregulation in (*KIT* and *PDGFR4*) wild-

type GISTs. The observed absence of *RAS* mutations suggests that MAPK pathway may be activated by SCF/KIT autocrine/paracrine mechanisms and/or by *BRAF* mutation in a subset of wild-type GISTs. V600E mutation in wild-type GISTs raises the possibility of RAF kinase inhibitor therapy in this sub-group of patients. (V) We described for the first time a significant association between RKIP tumor expression level and clinicopathological parameters in GIST patients. Loss of RKIP expression in a subgroup of GISTs seems to be independent of promoter methylation, and associates significantly with tumor necrosis and shorter survival of patients. RKIP role in tumor progression and metastases development suggests that this marker may hold a potential prognostic value, and may allow new targeted therapy based on the modulation of RKIP expression in GIST patients.

**Key-words:** GIST, gastrointestinal stromal tumor, esophageal GIST, surgical margins, survival, immunohistochemistry, mutational analysis, *KIT*, *PDGFR $\alpha$* , wild-type, MAPK, *BRAF*, RKIP.