

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINA**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**STUDII COMPARATIVE HISTOPATOLOGICE ȘI
BIOMOLECULARE ÎN EVOLUȚIA TUMORILOR STROMALE
GASTROINTESTINALE**

Conducător de doctorat:

Prof. Univ. Dr. Maria SAJIN

Student - Doctorand:

Dr. Andreea Cristina IORGESCU

BUCUREȘTI

2018

CUPRINS

CUPRINS.....	1
Abrevieri	4
INTRODUCERE.....	6
PARTEA GENERALĂ	8
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII.....	8
Capitolul 1. Impactul global al tumorilor stromale gastrointestinale	8
1.1. Istoric și histogeneză	8
1.2. Date epidemiologice.....	9
Capitolul 2. Date clinice si imagistice.....	11
2.1. Localizare	11
2.2. Aspecte Clinice.....	11
2.3. Evaluare imagistică	12
Capitolul 3. Diagnostic histopatologic și imunohistochimic	13
3.1. Aspecte macroscopice ale tumorilor stromale gastrointestinale	13
3.2. Aspecte microscopice ale tumorilor stromale gastrointestinale	14
3.3. Rolul diagnostic al imunohistochimiei.....	16
Capitolul 4. Rolul analizei mutaționale în diagnosticul și managementul pacientului	19
Capitolul 5. Diagnostic diferențial în GIST.....	21
Capitolul 6. Evaluarea riscului de recurență sau metastază si factori de prognostic.....	24
6.1. Utilitatea clinică a analizei mutaționale	26
Capitolul 7. Metode de tratament în GIST	27

7.1. Boala localizată	27
7.2. Boala metastatică.....	29
7.3. Evaluarea raspnsului.....	30
7.4. Urmărirea.....	31
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	32
Capitolul 8. Motivația, scopul si obiectivele studiului doctoral.....	32
8.1. Motivația studiului	32
8.2. Scopul si obiectivele studiului.....	32
Capitolul 9. Materiale și metode de studiu	33
9.1. Criterii de includere.....	34
9.2. Criterii de excludere	36
9.3. Examen histopatologic	37
9.4. Examen imunohistochimic	37
9.5. Analiza statistică.....	39
Capitolul 10. Rezultate și Discuții	42
10.1. Descrierea lotului de participanți – statistici descriptive.....	42
10.1.1. Date clinice și demografice.....	42
Maniera de dezvoltare tumorală	46
10.1.2 Corelații	56
10.1.3 Discuții.....	74
10.2. Caracterizarea imunohistochimică a lotului de pacienți.....	78
10.2.1. Statistici descriptive.....	78
10.2.2. Corelații clinicopatologice - imunohistochimice	79
10.2.3 Corelații histopatologice - imunohistochimice	88
10.2.4 Corelațiile markerilor imunohistochimici.....	107

10.2.5 Corelatii între parametrii imunohistochimici si supraviețuire	117
10.2.6 Discuții.....	121
10.3. Analiza mutațională.....	124
10.3.1. Discuții.....	125
10.4. Caracterizarea grupul de graniță.....	126
10.4.1. Discutii.....	134
10.5. Analiza supraviețuirii pe lotul studiat.....	135
10.5.1. Rezultate	135
10.5.2. Estimarea probabilității de supraviețuire prin metoda Kaplan Mayer	153
10.5.3. Discuții.....	159
Capitolul 11. Concluzii	159
Capitolul 12. Limitări ale cercetării.....	162
Capitolul 13. Puncte forte	163
Capitolul 14. Concluzii finale.....	163
Capitolul 15. Direcții viitoare de cercetare.....	164
Bibliografie	166
Anexe	186
1.Lista lucrărilor științifice publicate și elaborate	186
2.Cinci dintre lucrările științifice elaborate în contextul temei tezei de doctorat și publicate în calitate de autor principal în publicații B+/BDI	189

INTRODUCERE

- Tumorile stromale gastrointestinale reprezintă o patologie rară și sunt un foarte bun exemplu al modului în care știința poate influența prognosticul pacienților cu tumori maligne.
- Tumorile stromale gastrointestinale sunt tumori rare ce provin din celulele interstițiale Cajal sau din celule stem precursorale, celule cu rol în reglarea motilității gastro-intestinale și a funcției nervilor autonomi. Numeroasele cercetări efectuate în ultimii 35 de ani au dus la schimbarea nomenclaturii, clasificării, diagnosticului și tratamentului.
- Aceste tumori au fost recunoscute abia în 1983 atunci când Michael T. Mazur și H. Brent Clark au introdus folosirea termenului neutru de „tumoară gastrică stromală” pentru a caracteriza neoplasmele non-epiteliale gastrointestinale ce nu prezentau trăsături imunohistochimice de celulă Schwann și nici nu avea caracteristici ultrastructurale de celulă musculară netedă.
- Clasificarea lor morfologică a evoluat de-a lungul timpului iar analiza moleculară a dus la o mai bună înțelegere a naturii lor.
- Descoperirea în 1998 a mutațiilor în gena c-KIT și mai târziu în gena PDGFRA a fost un real progres în biologia și tratamentul GIST.
- Diagnosticarea și tratarea lor implică eforturi financiare mari atât pentru pacient cât și pentru sistemul de sănătate.
- Deosebirea lor de alte tumori gastrointestinale mezenchimale are o mare importanță atât în terapia țintită aplicată pacienților cât și în evoluția ulterioară a acestora.
- Posibilitățile de intervenție actuale vizează reducerea frecvenței recurenței bolii și reducerea extensiei rezecției chirurgicale pentru îndepărtarea completă a tumorii.
- Descoperirea inhibitorilor tirozinkinazici precum imatinib mesylate (un inhibitor selectiv al receptorilor tirozinkinazici gen KIT, PDGFRA, BCR-ABL) a îmbunătățit semnificativ prognosticul pentru cei mai mulți dintre pacienți.

- Descoperirea inhibitorilor tirozin kinazici a revoluționat tratamentul acestor tumori și a dus la necesitatea unui diagnostic histopatologic cât mai corect, analiza mutațională devenind esențială în anumite cazuri.
- Studiul de față își propune o mai bună înțelegere a fenomenului GIST și urmărește aspectele morfologice și biomoleculare ale tumorilor stromale gastrointestinale prin cercetarea riguroasă a cazuisticii Institutului Clinic Fundeni. S-au evaluat parametrii clinici, morfologici, biomoleculari (biomarkeri imunohistochimici și nivelul de Hemoglobina din sange la momentul diagnosticului) și s-a urmărit evoluția pacienților în timp. Investigarea biomoleculelor implicate în histogeneza tumorală prin metode imunohistochimice și stabilirea corelațiilor între variabilele studiate precum și influența acestora asupra supraviețuirii pe termen lung a demonstrat îmbunătățirea semnificativă a prognosticului în diagnosticarea precoce.

MOTIVAȚIA STUDIULUI

GIST reprezintă un real succes al translației cercetării biomoleculare în practica medicală curentă și încorporarea datelor biomoleculare în cele clinico-morfologice. Importanța acestui tip rar de cancer este mare datorită faptului că are un potențial curabil, este relativ ușor de tratat și necesită îngrijire continuă la fel ca în cazul unei boli cronice. Inhibitorii de tirozin kinază au revoluționat tratamentul medicamentos și au dus la o îmbunătățire a prognosticului pacientului. Există numeroase cercetări în curs de desfășurare privind posibilitatea găsirii unei terapii eficiente în GIST rezistentă la ITK.

În Romania nu există o bază de date a pacienților cu GIST astfel încât nu există informații oficiale publicate, despre incidența și evoluția acestor pacienți. De asemenea există putine studii efectuate în țara noastră, în general pe cohorte mici și fara o evaluare a evoluției pacienților. Raritatea fenomenului și lipsa studiilor efectuate în populația romanească au fost astfel principalele motive pentru demararea studiului.

SCOPUL SI OBIECTIVELE STUDIULUI

Studiul de față își propune atât identificarea, caracterizarea histopatologică, si biomoleculară cât și urmărirea evoluția pacienților cu tumori stromale gastrointestinal si extragastrointestinale printr-un studiu clinico-statistic în ultimii 14 ani efectuat în Institutul Clinic Fundeni.

Studiul biomolecular este orientat către expresia proteinei KIT în citoplasma celulelor tumorale. Metoda prin care apreciem prezența acestor macromolecule în citoplasma celulelor tumorale este cea imunohistochimică.

Obiectivele studiului sunt urmatoarele:

- stabilirea lotului de studiu prin alcătuirea unui algoritm de diagnostic
- crearea unei baze de date electronice pentru gestionarea analizelor statistice si actualizarea ei periodic
- stabilirea parametrilor de studiu
- evaluarea macroscopică a pieselor chirurgicale
- studierea caracteristicilor demografice și clinice ale pacienților cu tumori stromale gastrointestinale
- examinarea aspectelor histopatologice și imunohistochimice si stabilirea corelațiilor semnificative statistic
- cercetarea expresiei proteinei KIT prin metode imunohistochimice și identificarea factorilor de prognostic si agresivitate.
- analiza supraviețuirii pacienților din lotul studiat și corelarea acesteia cu parametrii histologici și biomoleculari studiați.
- formularea concluziilor

MATERIALE ȘI METODE DE STUDIU

Studiul de față a fost realizat cu aprobarea Comisiei de Etică a Institutului Clinic Fundeni pe un lot de 139 de pacienți.

Din registrele și bazele de date ale Serviciului de Anatomie Patologică din Institutului Clinic Fundeni s-au evaluat toate cazurile de tumori mezenchimale înregistrate între anii

2003 și 2017, cu localizare gastrointestinală (esofag, stomac, intestin subțire, colon, rect) și extragastrointestinală (intraabdominal, retroperitoneal, peritoneal, pelvin, mezenter, pancreas, oment, ficat) . Pacienții au fost operați în Clinica de chirurgie generală și Transplant Hepatic, țesutul excizat fiind analizat în cadrul Serviciului de Anatomie Patologică al Institutului Clinic Fundeni, respectându-se următoarele etape:

- Orientare și fixare în soluție de formaldehidă 10%
- Masurarea tumorii tridimensional și înregistrarea coordonatelor macroscopice inclusiv adâncimea invaziei, ulcerării, margini de rezecție.
- Recoltarea blocurilor tisulare reprezentative (atât țesut tumoral cât și normal) conform protocoalelor adecvate fiecărei localizări anatomice.
- Prelucrarea blocurilor tisulare prin tehnica uzuală de includere la parafină
- Secționarea la microtom a blocurilor de parafină și întinderea secțiunilor pe lamă.
- Colorare cu hematoxilină și eozină
- Pentru colorațiile imunohistochimice s-au folosit lame speciale, pretratate.

Criterii de includere

Studiul a inclus cazuri înregistrate în cadrul serviciului de Anatomie Patologică al Institutului Clinic Fundeni și diagnosticate pe baza examenului la parafină ce a relevat morfologia de tumoră mezenchimală. Examinarea la parafină a fost urmată de studii imunohistochimice care au inclus următorii biomarkeri: CD117, DOG1, PDGFRA, CD34, Desmina, SMA, Vimentina, Ki67, S-100. Rezultatele pozitive obținute în urma colorațiilor imunohistochimice cu CD117, CD34, DOG1 sau PDGFRA coroborate cu datele clinice și histopatologice au dus la stabilirea diagnosticului de tumoră stromală gastrointestinală sau extragastrointestinală. Pentru acest studiu tumorile GIST și EGIST au fost definite ca CD117 pozitive (peste 10% din celule tumorale pozitive) sau CD117 negative dar DOG1 pozitive și/sau CD34 și/sau PDGFRA

În lot au fost incluși pacienți cu tumori primare localizate în tractul gastrointestinal sau adiacent acestuia astfel fiind incluse atât localizări digestive cât și extradigestive. Prin urmare tumorile incluse în studiu au avut următoarele localizări gastrointestinale: stomac, intestin

subțire, colon, rect. Localizarile extragastrointestinale incluse au fost reprezentate de mezenter, oment, peritonu, retroperitonu și pancreas.

Diagnosticul de GIST s-a bazat pe trăsăturile morfologice caracteristice GIST-urilor (celule fuziforme, celule epiteloide, celularitate mixtă) și pe studiile imunohistochimice pentru excluderea anumitor tumori precum tumori epiteliale, tumori de mușchi neted sau tumori de teacă nervoasă.

Criterii de excludere

Au fost excluși din studiu pacienții cu date clinice indisponibile, cu foi de observație deteriorate al caror istoric si evolutie nu a fost disponibil. De asemenea au fost excluși pacienții cu teste imunohistochimice efectuate în alte unități sanitare ai căror blocuri de parafină nu s-au mai regăsit în histotecă. Nu au fost incluse nici cazurile diagnosticate histopatologic doar prin biopsie, fără excizie chirurgicala. Au fost excluse de asemenea tumorile cu localizare renală, vezică urinară , uter si anexe.

În urma testelor imunohistochimice au fost excluși din studiu pacienții cu markeri specifici GIST negativi, leiomiomele, leiomiosarcoamele, melanoamele, schwanoamele.

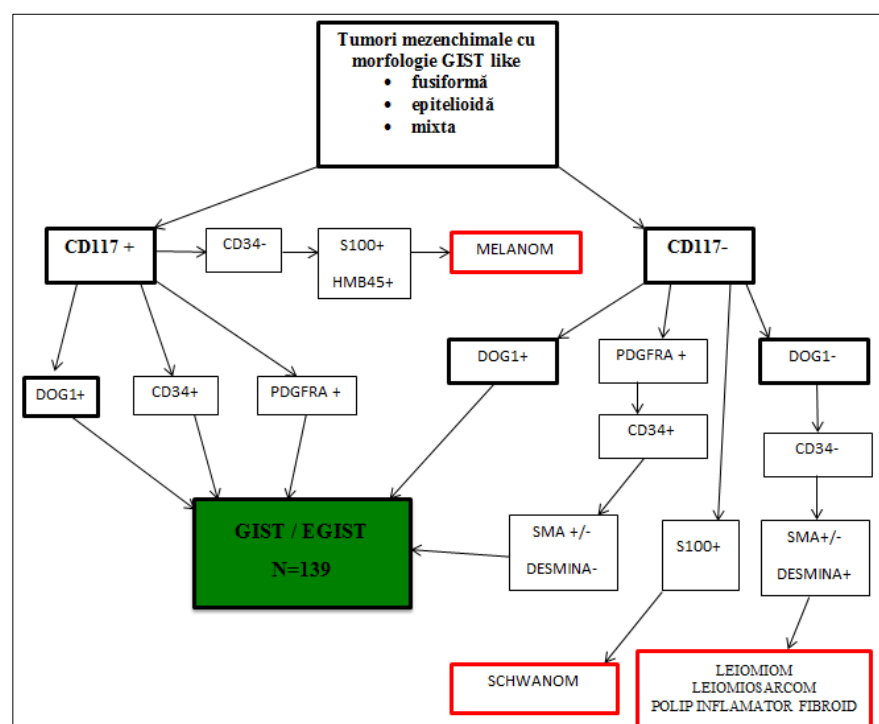


Figura 1. Algoritm de diagnostic si includere in studiu

Baza de date a fost alcătuită folosind programul Microsoft Excel versiunea 14.0.7192.5000 și ulterior importată și analizată cu ajutorul programului SPSS versiunea 21.

REZULTATE

În acest studiu au fost incluși 139 de pacienți cu tumori stromale gastrointestinale dintre care 71 femei (51,1%) și 68 bărbați (48,9%) –Figura 2.

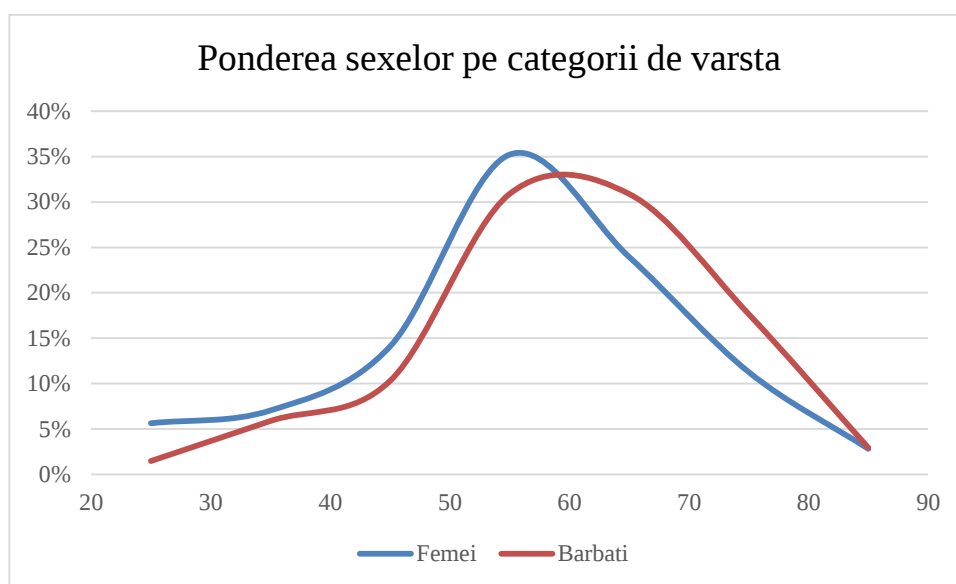


Figura 2. Graficul repartiției lotului de studiu pe grupe de vârstă în funcție de sex

Vârsta minimă a pacienților incluși în lot a fost de 22 ani iar cea maximă de 83 ani, diferența dintre cele două valori fiind de 61 ani. Vârsta medie la diagnostic a fost de 57,26 ani iar deviația standard de 12.770.

Incidența la femeile de peste 45 de ani a fost de 82% comparativ cu 88% în cazul bărbaților. De asemenea, s-a observat și faptul că peste vârsta de 60 de ani incidența la bărbați este mult mai mare, 58% din total pacienților, comparativ cu doar 38% la femei. Sub vârsta de 30 de ani incidența este mult mai mare la femei (6% dintre femei și doar 1% dintre bărbați), cauzată și de faptul că acestea merg mai des la controale medicale decât bărbații.

51 (36.69%) dintre pacienții lotului studiat provin din mediul rural iar 88 (63.3%) din mediul urban, repartitia lor geografică fiind înfățișată în figura 3

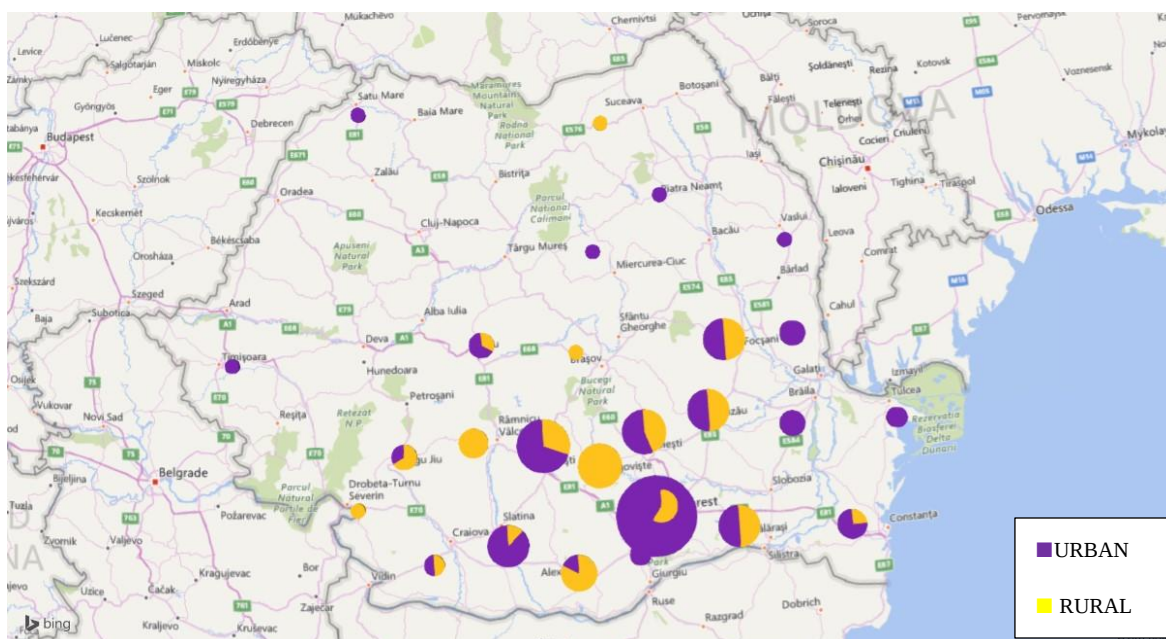


Figura 3. Repartitia geografică a lotului de studiu

Localizarea tumorii primare întâlnită în lotul studiat a fost după cum urmează: stomac 66 (47,5%), intestin subțire 50 (36%), EGIST 16 (11.5%), colon 4 (2.9%), rect 2 (1,4%) și multifocal 1 (0,7%) . Tumora multifocală a fost reprezentată de multipli noduli localizați la nivelul stomacului, intestinului subțire și colonului. Diviziunea pe sub-localizări a fost următoarea: pentru stomac (corp 22, antru 12, mica curbură 13, marea curbură 8, fornix 9); pentru intestin subțire (duoden 15, jejun 21, ileon 13); pentru colon (colon drept 3, colon stâng 1) și EGIST (abdominal (0.7%), interhepato-gastric (0.7%), mezenter (0.7%), oment/peritoneu/mezenter (2.1%), pelvin/pelviabdominal (2.1%), retroperitoneal (3.5%), pancreatic (1.4%)).

Diametrul tumorii primare a variat de la 0,6 la 30 cm, cu o medie de 7.018 cm și o deviație standard de 4.8609cm.

Acuzele cele mai frecvente în rândul pacienților din lotul studiat au fost hemoragia digestivă exteriorizată prin hematemeză și/sau melenă (38.6%) urmată îndeaproape de dureri abdominale (37.1%). De asemenea, 11.4% dintre pacienții lotului studiat au prezentat

simptome nespecifice gen astenie, inapetență și scădere în greutate . Aproximativ 4.5% dintre pacienți s-au prezentat la medic cu simptomatologie ocluzivă/subocuzivă și tot atâția pacienți au fost asimptomatici, descoperiți în cursul unor investigații de rutină. În studiu au mai fost prezenți și 5 pacienți (3.8%) ale căror tumori au fost descoperite în cursul investigațiilor pentru alte patologii tumorale preexistente. Pentru 8 dintre pacienții incluși în studiu nu au fost găsite date cu privire la simptomatologia de debut, acest lucru luându-se în calcul în analizele statistice ulterioare.

Tabel 1. Statistica descriptivă pentru simptomatologia pacienților la momentul diagnosticului

		Frecvență	Procent	Procent valid
Valid	Asimptomatic	6	4.3	4.5
	Hemoragie	51	36.4	38.6
	Greturi/varsaturi/ simptomatologie ocluziva	6	4.3	4.5
	Dureri	48	35.0	37.1
	Simptome nespecifice- scadere in greutate; astenie; inapetenta	15	10.7	11.4
	Incidental-pentru alte afectiuni	5	3.6	3.8
	Total	131	94.3	100.0
Date lipsa		8	5.7	
Total		139	100.0	

De asemenea urmărirea hemoglobinei serice a scos în evidență o scădere a acesteia la 51 (38.1%) dintre pacienți și un nivel normal la 83 (61.9%).

Tabel 2. Statistici descriptive pentru nivelul normal sau scăzut al hemoglobinei serice

		Frecvență	Procent	Procent valid
Valid	normală	83	59.3	61.9
	scăzuta	51	36.4	38.1
	Total	134	95.7	100.0
Date lipsă		5	4.3	
Total		139	100.0	

Din punct de vedere macroscopic cea mai frecventă formă a fost cea nodulara întâlnită la 95 pacienți (68,3%), urmată de chistică la 18 pacienți (12,9%), infiltrativă la 12 pacienți (8,6%), polipoidă la 9 pacienți (6,5%) și vegetantă la 5 dintre aceștia (3,6%).

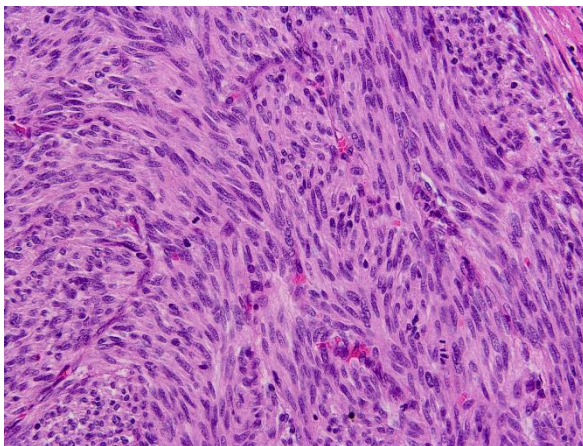
Tabel 3. Statistici descriptive ale formelor macroscopice de GIST

		Frecvență	Procent	Procent valid
Valid	Infiltrativa	12	8.6	8.6
	nodulara	95	68.3	68.3
	polipoida	9	6.5	6.5
	Vegetant	5	3.6	3.6
	Chistic	18	12.9	12.9
	Total	139	100.0	100.0

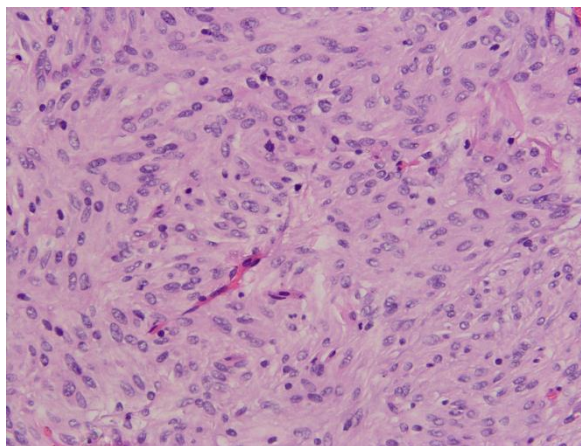
Maniera de dezvoltare tumorală în cadrul lotului a fost următoarea: 71 (50.7%) dintre tumori au prezentat o dezvoltare predominant intramurală, 26 (18.6%) predominant extramurală, 19 (13.6%) transmurală, 13 (9.3%) alte dezvoltări și 2 (1.4%) predominant intraluminală.

În ceea ce privește parametrii histologici evaluați, aceștia au avut următoarele rezultate:

- *Ulcerarea mucoasei* a fost detectată la 68 (48,6%) de pacienți și a lipsit la 56 (39.5%) dintre pacienții cu GIST de tub digestive.
- *Celularitatea* a fost crescută în 70 de cazuri (50,04%), medie în 55 cazuri (43,2%) și scăzută în 9 cazuri (6,5%);
- *Necroza* a fost prezentă la 49 pacienți (35%) și a lipsit la 89 pacienți (63,6%).
- *Pleomorfism celular* a fost minim la 47 pacienți (33,8%), moderat la 74 pacienți (53,2%) și sever la 18 pacienți (12,9%);



**Figura 4. GIST localizat la nivelul intestinului subțire cu celularitate crescută
HEx400**



**Figura 5. GIST localizat la nivelul intestinului subțire cu celularitate medie
HEx400**

- *Emboli tumorali vasculari* au fost absenți în marea majoritate a cazurilor (N = 137, 98,6%) și prezenți la 2 pacienți (1,4%);
- *Arhitectura microscopică* cea mai frecventă a fost fasciculată și storiformă (N = 114; 82%), urmat de insule (N = 13; 9,4%) și plaje (N = 12; 8,6%);
- *Morfologia* a inclus fibre skenoide (N = 2; 1,4%), palisadare (N = 11, 7,9%), arii mixoide și hialinizari (N = 10, 7,1%); datele pentru această variabilă au lipsit pentru majoritatea pacienților (N = 116; 83,6%) neîntâlnindu-se astfel aspecte morfologice particulare față de cele clasice;
- *Tipul celular* cel mai frecvent întâlnit a fost cel fuziform (N = 99; 71,2%), urmat de cel mixt (N = 28, 20,1%) și epiteloid (N = 12, 8,6%);
- *Numarul de mitoze atipice* a fost în medie 6,66 cu o deviație standard de 9,77. Dintre tumorile studiate 47 (33,8%) au prezentat >5 mitoze/50 HPF iar 92 (66,1%) au prezentat <5/50 HPF.

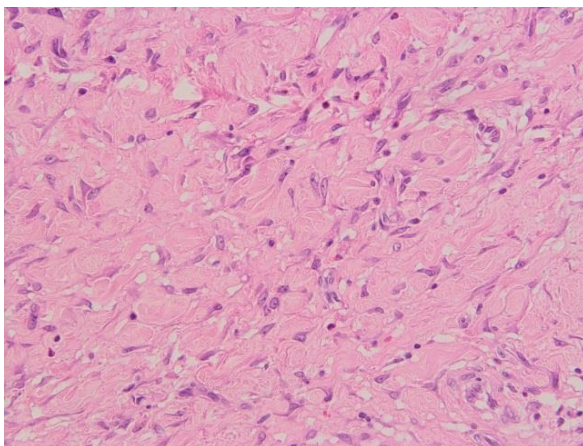


Figura 6. GIST de intestin subțire cu prezența „fibrelor skenoide” HEx400

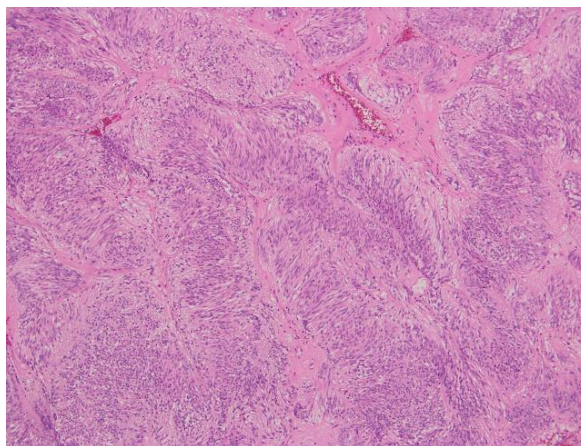


Figura 7. GIST gastric cu celule fusiforme și palisadare HEx100

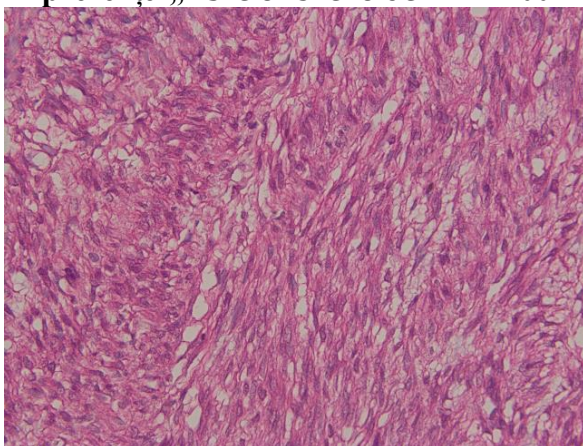


Figura 8. GIST gastric-celule fuziforme cu nuclei alungiti și vacuolizari paranucleare HE x 400

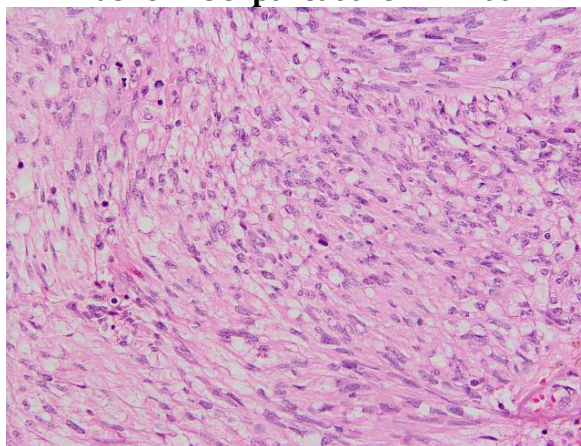


Figura 9. GIST gastric-celule fuziforme cu nuclei alungiti și vacuolizari paranucleare HE x 400

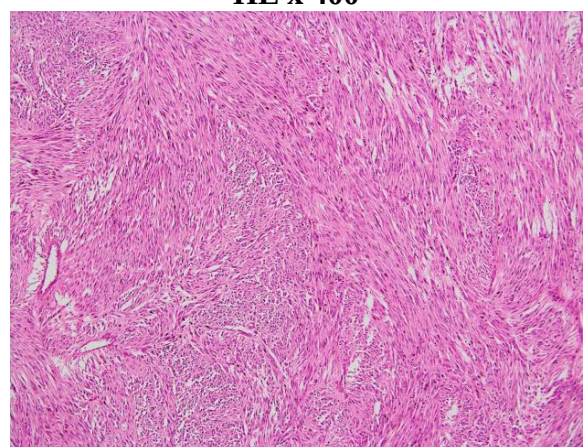


Figura 10. GIST de intestine subțire cu celule fuziforme dispuse în fascicule HE x 400

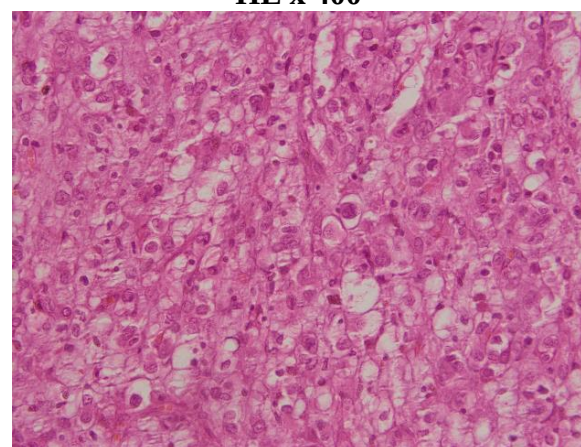


Figura 11. GIST gastric cu celule epitelioides HE x400

Riscul de recurență tumorală calculat conform metodei NIH modificate a avut următoarea distribuție: foarte scăzut (N = 10; 7,1%), scăzut (N = 45; 32,1%), intermediar (N = 31; 22,1%) și înalt (N = 47; 33,6%).

Grupul prognostic a fost calculat conform criteriilor AFIP, cel mai frecvent întâlnit în lot fiind grupul 2 (N = 51; 36,4%), urmat de grupul 3a (N = 21; 15%). Grupurile prognostice 6a și 6b au avut un număr egal de cazuri (N = 16; 11,4%) și au fost urmate în ordine descrescătoare a frecvenței de grupul 3b (N = 13; 9,3%), grupul 5 (N = 8; 6,4%), grupul 1 (N = 6; 4,3%). În lot nu a existat niciun caz cu grup prognostic 4 (N = 0).

Frecvența stadiu tumoral conform UICC 2010 a fost următoarea: stadiul I (N = 27; 19,3%), stadiul IA (N = 28; 20,0%), stadiul IB (N = 10; 7,1%), stadiul II (N = 16; 11,4%), stadiul IIIA (N = 8; 5,7%), stadiul IIIB (N = 20; 14,3%) și stadiul IV (N = 22; 15,7%).

Dintre cei 139 de pacienți, 7 (5%) au prezentat metastaze limfoganglionare iar restul de 132 (95%) au evoluat fără acestea.

În ceea ce privește metastaza la momentul diagnosticului, aceasta a fost prezentă la 32 (23%) pacienți în timp ce la restul de 107 pacienți (77%) a lipsit. Pe durata desfășurării studiului, 14 pacienți au prezentat recidivă (10%) iar restul de 117 (83,6%) au evoluat fără prezența recidivei. Diametrul cel mai frecvent al tumorii recidivate a fost de 11-12 cm.

Din totalul de 139 de pacienți luați în studiu s-a constatat că 9 (6,5%) au prezentat ruptură tumorală iar restul de 130 (93,5%) nu au prezentat.

În rândul pacienților cu GIST s-a înregistrat un număr de 28 de cazuri (20,14%) ce au prezentat leziuni tumorale asociate. Alte leziuni întâlnite au fost: hemangiom hepatic cavernos (2), chistadenom seros renal stâng (1), melanom (1).

În ceea ce privește **tratatamentul**, au fost calculate frecvențele pentru rezecție completă/incompletă și tratament cu imatinib mesylat. Marea majoritate a pacienților (N = 124; 89,1%) au avut rezecție completă iar 15 (10,9%) rezecție incompletă. Referitor la tratamentul cu Imatinib, 22 (15,7%) pacienți au beneficiat de acesta, în timp ce la 107 (76,4%) pacienți nu a fost utilizat.

La urmărirea pacienților pe termen lung s-a constatat că 34 dintre cei incluși în studiu (24,5%) au decedat datorită tumorii și complicațiilor generate de aceasta iar 100 (71,9%) erau încă în viață la momentul încheierii studiului. De asemenea, au existat 5 pacienți (3,6%) care au decedat datorită patologiilor asociate și nu datorită prezenței GIST.

În urma efectuării testelor imunohistochimice s-au constatat cateva corelatii semnificative statistic. Astfel:

- corelația între CD34 și recidiva (da/nu) a fost semnificativă, $r(35) = -0,37$, $p < 0,05$; de asemenea tot semnificativă a fost și corelația lui CD34 cu pleomorfismul celular $r(37) = -0,34$, $p < 0,05$.

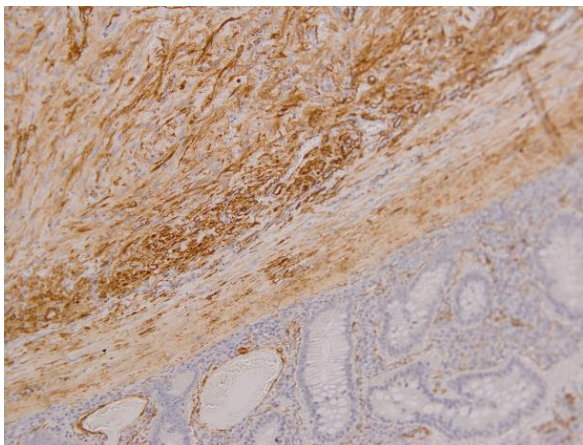


Figura 12. GIST de intestin subțire cu tip celular fuziform- SMA pozitiv x 200

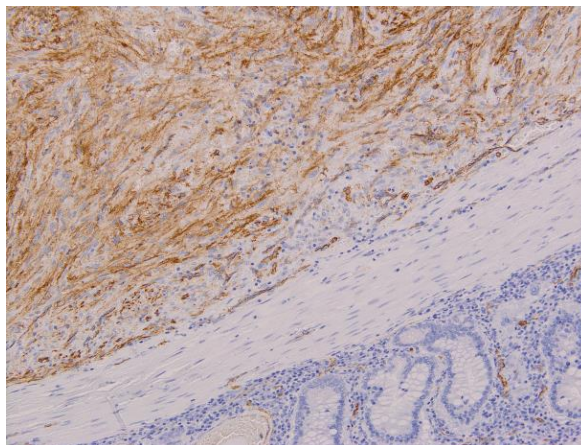


Figura 13. GIST de intestin subțire cu tip celular fuziform- CD34 x 200

Folosind testul chi pătrat au fost urmărite corelațiile semnificative la testele non-parametrice. Prin urmare asocierea lui SMA cu dimensiunea tumorii primare deși corelată la teste non-parametrice, la testul chi pătrat coeficientul nu a fost semnificativ.

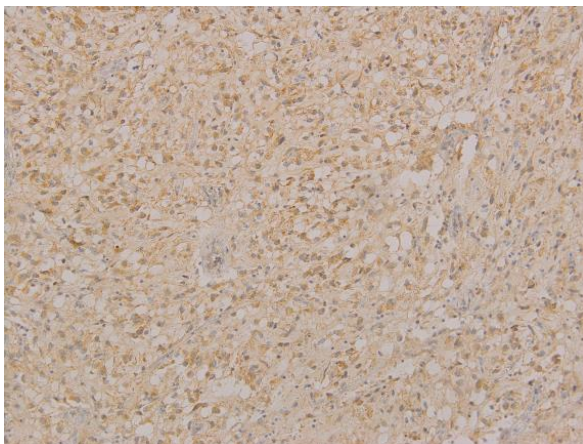


Figura 14. GIST gastric - tip celular epitelioid –PDGFRαx200

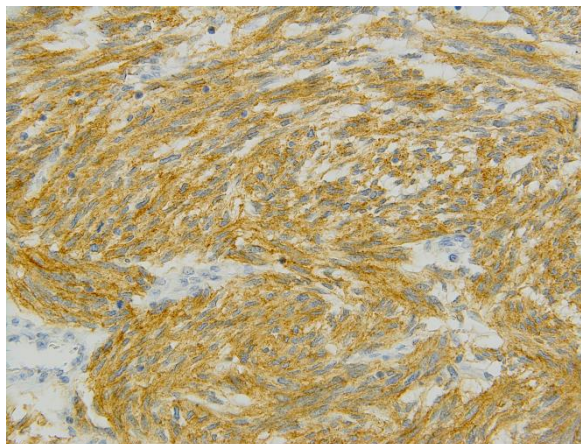


Figura 15. GIST gastric – tip celular fuziform CD117 x 400

- **CD117 cu CD34:** au existat diferențe semnificative între subgrupuri, $\chi^2 (1, N = 99) = 7.11$, $p < .01$ în sensul că atunci când CD117 a fost pozitiv, CD34 a fost mai probabil pozitiv de asemenea.

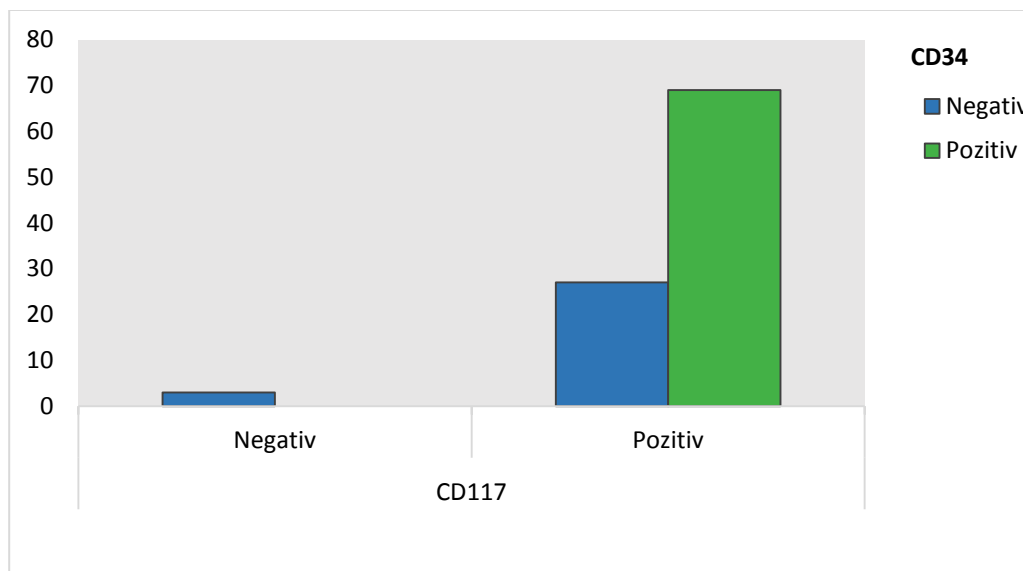


Figura 16. Graficul distribuției CD117 în funcție de CD34

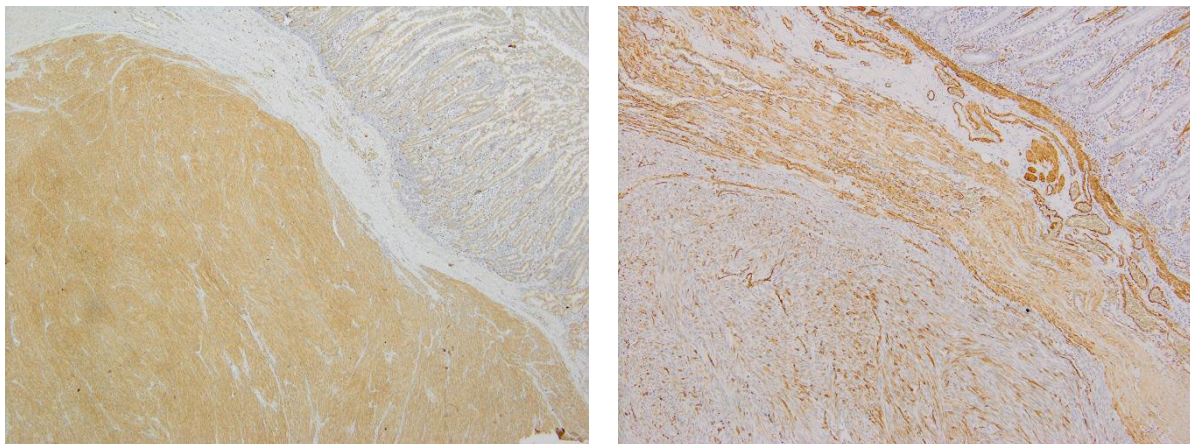


Figura17. GIST de intestine subțire cu CD117 pozitiv x 40 (stânga) și SMA pozitiv (dreapta) x 100

- **DOG1 cu CD34:** au existat diferențe semnificative între subgrupuri, $\chi^2 (1, N = 34) = 3.76$, $p < .05$ în sensul că atunci când DOG1 este pozitiv și CD34 tinde să fie pozitiv de asemenea.

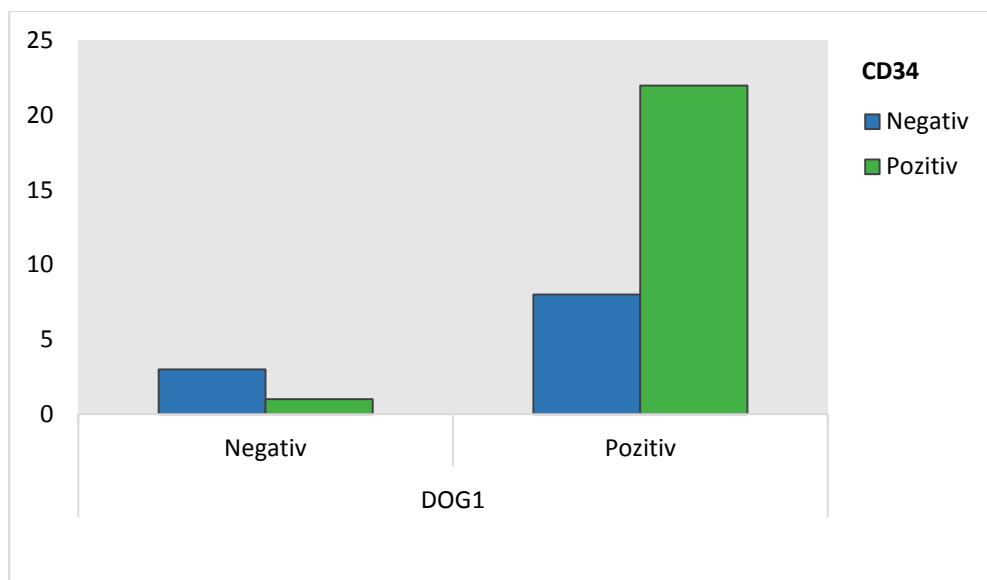


Figura 18. Graficul distribuției DOG1 în funcție de CD34

DISCUȚII

Așa cum se poate observa în Figura 3, majoritatea pacienților provin din sudul și sud-estul țării, în special din mediul urban acolo unde nivelul de educație este superior celui din mediul rural iar accesul la sistemul de sănătate este mai facil.

Tumorile GIST se întâlnesc mai frecvent la persoanele de peste 50 ani, în special în jurul vârstei de 60 ani. Vârsta medie tinde să ascensioneze cu cca. 10 ani în studiile ce includ pacienți diagnosticați direct la necropsie. În lotul studiat nu au existat pacienți diagnosticați post-mortem (la necropsie) astfel putem observa o vârstă medie de 57.26 în concordanță cu datele din literatură. În lotul studiat, deși repartitia pe sexe a fost aproximativ egală totuși s-a înregistrat o preponderență feminină la vârste sub 45 de ani și masculină la vârste de peste 60 ani. De asemenea, sub vârsta de 30 de ani incidența a fost mult mai mare la femei (6% dintre femei și doar 1% dintre bărbați), cauzată probabil și de faptul ca acestea merg mai des la controale medicale decât bărbații.

Deși se pot întâlni la orice nivel al tractului gastrointestinal, stomacul este cel mai frecvent afectat segment, urmat de intestinul subțire. În lot au fost incluși și 16 pacienți cu tumori extragastrointestinale. Acestea, deși rare, sunt prezente în lotul studiat într-o proporție

ușor crescută (11.5%) față de studiile clinice din literatură unde se regăsesc într-un procent de cca. 5-10%.

GIST-urile au în general dimensiuni variabile, de la „micro”GIST (<1cm) la tumori gigante de peste 30 cm. Studiul de față a inclus 6 tumori până în 2 cm iar dimensiunea medie tumorală a fost de 7.01 cm, ușor mai crescută față de valorile medii raportate de Tryggvason (4,5 cm) și Miettinen (6 cm). Un diametru tumoral mai crescut presupune și un diagnostic tardiv ce poate fi datorat și lipsei unei simptomatologii specifice. Un alt element cheie în diagnosticul tardiv este și adresabilitatea întârziată a pacientului către medic, lucru cauzat în parte și de nivelul socio-economic scăzut, deloc neglijabil în special din mediul rural. Din cei 6 pacienți cu tumori sub 2 cm, 3 au fost descoperite incidental în cursul investigațiilor pentru patologia de bază reprezentată de tumori maligne asociate iar celelalte 3 cazuri de asemenea asimptomatice și descoperite în cursul investigațiilor de rutină. Într-un studiu populațional, Nillson și co. au arătat că dimensiunea tumorii este de 8,9 cm la pacienții cu simptomatologie clinică (~ 69% din GIST-urile studiate) și de 2.7 cm la pacienții fără simptome clinice (21% din tumorile studiate) subliniind astfel faptul că simptomatologia zgomotoasă se declanșează tardiv, de obicei la dimensiuni mari ale tumorii.

În studiul de față, cei mai mulți pacienți au prezentat hemoragii și dureri abdominale. În grupul pacienților cu simptomatologie dureroasă și un diametru mediu al tumorii de 8,2 cm a predominat nivelul normal de Hb în timp ce în rândul pacienților cu hemoragie și un diametru mediu de 6,2 cm a predominat nivelul scăzut al Hb. O treime din pacienții cu simptomatologie nespecifică și diametrul mediu tumoral de 7,2 cm au prezentat un nivel de Hb scăzut explicând astfel parțial acuzele nespecifice. În ceea ce privește pacienții asimptomatici, în rândul acestora s-a întâlnit un diametru tumoral mediu de 5 cm, aproape dublu față de cel menționat în studiul de mai sus. Astfel rezultatele obținute subliniază încă o dată faptul că simptomatologia debutează tardiv, sugerând în acest fel necesitatea perfecționării prevenției primare.

Rezecția chirurgicală efectuată incomplet în 15 cazuri s-a realizat paliativ fie datorită extensiei tumorale mari fie datorită lipsei de răspuns la terapia cu imatinib. Pacienții au fost tratați conform protocolului anexat, astfel cei care nu figurează cu tratament cu imatinib sunt fie cei care au decedat prematur, fie cei încadrați în grupurile prognostice 1 sau 2 ale caror conduită terapeutică nu impunea folosirea lui ci urmărirea pacientului. De asemenea,

au existat 10 pacienți care s-au pierdut din evidență după rezecția chirurgicală, astfel încât nu există date despre schemă de tratament aplicată.

În ceea ce privește corelarea *localizării tumorii primare* cu modul de dezvoltare al acesteia, testul chi pătrat a fost semnificativ statistic, χ^2 (24, N = 131) = 97,53, $p < .0001$. Astfel dezvoltarea predominant intramurală s-a întâlnit preponderent la nivelul stomacului și intestinului subțire spre deosebire de alte localizări.

Rezultatele arată ca cca. o treime din pacienții cu tumori de intestin subțire și cca. jumătate din EGIST au prezentat metastaze încă din momentul diagnosticului, aceasta explicându-se în parte și datorită simptomatologiei mai estompate.

Cele mai multe recidive s-au înregistrat în rândul pacienților cu EGIST, astfel putem spune că probabilitatea de recidivă este mai mare în rândul pacienților cu EGIST decât în rândul pacienților cu GIST gastric sau de intestin subțire.

De asemenea, asocierea metastazei cu recidivă a fost semnificativă statistic χ^2 (1, N = 131) = 10,41, $p < .005$. și s-a observat faptul că dintre pacienții cu metastază la momentul diagnosticului, un procent mare a recidivat. De asemenea în rândul pacienților cu metastaze încă de la diagnostic s-a înregistrat și o celularitate crescută.

Pe baza rezultatelor semnificative obținute la testul chi pătrat (prezentate mai sus) în ceea ce privește diferențele între grupurile cu și fără metastază la momentul diagnosticului, în continuare s-a folosit testul t pentru a examina diferențe între aceste grupuri în ceea ce privește diametrul tumorii și numărul de mitoze atipice (variabile continue). În ambele cazuri au fost obținute rezultate semnificative. Pentru mitoze atipice, $t(137) = 2,14$, $p < 0,05$, cu o diferență medie de 4,17 astfel concluzionând că în grupul cu metastaze întâlnim mai multe mitoze atipice. În ceea ce privește dimensiunea tumorii primare, $t(129) = 3,34$, $p < 0,05$ (diferența medie = 3,42) prin urmare în grupul cu metastaze încă de la diagnostic întâlnim de asemenea și o dimensiune mai mare a tumorii.

În ceea ce privește decesul, în lotul studiat s-a observat că acesta este mai frecvent întâlnit în rândul pacienților cu EGIST decât în rândul celor cu GIST gastric sau intestinal. Decesele au fost mai frecvente în rândul pacienților cu celularitate crescută față de cei cu celularitate medie sau scăzută.

Corelațiile între dimensiunea tumorii și numărul de mitoze au fost examinate și coeficientul de corelație a fost semnificativ, $r(131) = 0,28$, $p < 0,01$. Acest lucru ne arată că

deși asocierea între cei doi parametri este scăzută totuși prin prezența ei putem spune ca o creștere a diametrului tumoral se asociază cu o creștere a numărului de mitoze.

Dimensiunea tumorii primare s-a corelat semnificativ cu numărul de mitoze astfel putem spune că atunci când numărul de mitoze crește și diametrul tumoral crește.

Celularitatea crescută este întâlnită mai frecvent în rândul pacienților cu metastaze și se asociază cu o probabilitate de deces. Celularitatea nu s-a asociat cu localizarea tumorii primare.

Printre cei cu celularitate crescută proporția prezenței metastazei a fost mult mai crescută (aproximativ o treime) în timp ce printre cei cu celularitate scăzută sau medie proporția metastazei a fost mult mai scăzută.

Pleomorfismul s-a asociat cu o metastază: chi pătrat semnificativ statistic χ^2 (2, N = 139) = 9,02, $p < .05$. În grupul pacienților cu pleomorfism celular sever proporția celor care au avut metastaze încă de la diagnostic a fost mult mai crescută; în același timp pacienții cu pleomorfism celular moderat și minim au prezentat un procent mai scăzut de metastaze.

Pleomorfism celular – recidiva: asociație semnificativă, χ^2 (2, N = 131) = 6,53, $p < .05$. Recidiva a fost mai frecventă în grupurile cu pleomorfism moderat și sever comparativ cu grupul cu pleomorfism minim.

Necroza nu s-a asociat cu localizarea tumorii primare, de asemenea nici pleomorfismul celular. Necroza s-a asociat cu recidiva astfel în rândul pacienților ce au prezentat tumori cu necroză, recidiva tumorală a fost mai frecventă. Prezența necrozei tumorale ca și marker de agresivitate fiind întărită de această asociere.

Dezvoltarea tumorii primare se poate observa și din datele obținute că se face preponderent intramural la nivelul stomacului și intestinului subțire

În ceea ce privește forma macroscopică, aceasta s-a asociat semnificativ cu *ruptura tumorală*: asociația nu a fost semnificativă la un prag de semnificație statistică $p < 0,05$.

CD117, anticorpul ce marchează receptorul KIT, este folosit în mod obișnuit în diagnosticarea GIST, cu o rată de pozitivitate ce variază între 85-95%. În studiul de față se poate observa faptul că 95.1% dintre tumori au fost pozitive, rezultate concordante cu cele din literatura de specialitate. Paternul de colorare întâlnit a fost citoplasmatic, membranar, paranuclear sau, cel mai frecvent în combinație, iar intensitatea a fost variabilă, cu o distribuție focală sau difuză.

CD117 este util nu numai pentru diagnostic dar și pentru terapia țintită cu ITK. El însă nu are specificitate absolută astfel încât există cca. 5% GIST cu reacție negativă la CD117. Conform anumitor studii, frecvența mai crescută a CD117 negativ se întâlnește în rândul GIST cu mutații PDGFRA (72%), KIT (16%) și WT KIT/PDGFRA (8%), cu fenotip epitelioid, ce sunt localizate cu precădere la nivelul stomacului și omentului/peritoneului.

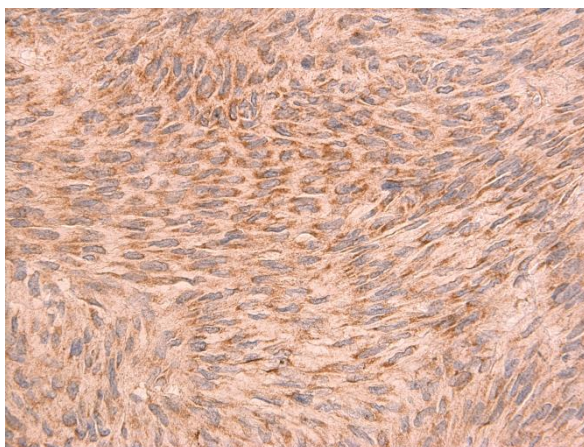


Figura 19. GIST gastric-CD117cu pattern granular, paranuclear x 400

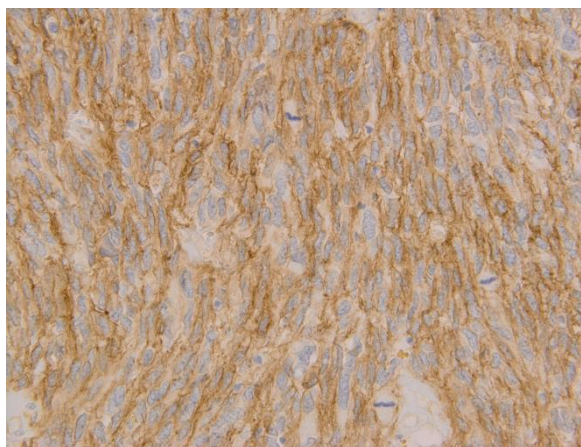


Figura 20. EGIST - CD117 cu pattern membranar si citoplasmatic x 400

Reacția negativă se poate datora de asemenea și problemelor apărute în tehnica utilizată și aici mă refer în special la modul de fixare al țesutului și vechimea blocului de parafină ce pot influența negativ imunoreacția. De asemenea este important de urmărit anticorpul și clona folosită, fiind știut faptul că anticorpii monoclonali dau reacție inconstantă în GIST astfel preferându-se cei policlonali. În lotul studiat 4.3% (6/139) din cazuri au prezentat reacție negativă la CD117, diagnosticul fiind dificil și necesitând markeri suplimentari precum DOG 1, PDGFRA și CD34.

DOG 1 este un marker imunohistochimic cu o specificitate și sensibilitate mai mare decât cea a lui CD117. Această proteină transmembranară ce este prezentă și în celulele Cajal pare să fie în relație cu activarea receptorilor KIT și PDGFRA însă acest lucru nu este pe deplin cunoscut. Într-un studiu efectuat de West și col. s-a demonstrat că 97.8% din cazuri au prezentat imunoreacție pentru DOG1 și că această reacție pozitivă a fost prezentă și în cazurile cu mutații PDGFRA ce prezentau imunoreacție negativă pentru CD117. Într-un alt studiu Espinosa și col. demonstrează o sensibilitate și o specificitate ridicată a lui DOG 1 și o imunoreacție de 87%.

Cei mai folosiți anticorpi și cei mai dezbătuți în studiile internaționale au fost DOG1.1 și DOG 1 K9, ambii anticorpi monoclonali. Conform acestora DOG 1 K9 are o sensibilitate mai mare față de DOG1.1. Clona utilizată în studiul de față a fost DOG1 K9 iar modelul de colorare obținut a fost membranar și citoplasmatic, difuz în toate cazurile. Gradul de pozitivitate a fost de 88.9% fiind inferior celui de 95.7% al lui CD117. Deși DOG 1 nu este pozitiv exclusiv în GIST, specificitatea și sensibilitatea sa înaltă îl fac extrem de util în panelul de anticorpi utilizați în evaluarea acestor tumori, în asociere cu CD117 în special în cazurile CD117 negative.

Miettinen și col. au observat în două studii simultane efectuate pe 1765 tumori gastrice și 906 tumori de intestine subțire o pozitivitate a lui CD34 de 80-85% la nivelul stomacului și de 50% la nivelul intestinului subțire. De asemenea s-a observat și că variantele cu celule fuziforme au probabilitate mai mare de pozitivitate în ceea ce privește CD34, decât variantele epitelioide.

În lotul studiat, CD34 a înregistrat o pozitivitate în 69,7% și 30,3% negativitate din cazurile studiate. Deși cele mai multe cazuri de CD34 pozitiv s-au înregistrat printre tumorile cu tip celular fusiform această asociere nu a prezentat semnificație statistică pe lotul studiat. Însă pozitivitatea lui CD34 s-a corelat cu localizarea gastrică și intestinală iar negativitatea sa cu EGIST. La nivelul stomacului s-a observat o corelație negativă atât între numărul de mitoze și pozitivitatea lui CD34 cât și între pleomorfismul celular și pozitivitatea lui CD34. Astfel, cu cât tumora este mai pleomorfă și cu cât numărul de mitoze este mai mare, cu atât CD34 are tendința să fie negativ.

De asemenea, în lotul studiat s-a observat și o asociere marginală între pozitivitatea lui CD117 și CD34 precum și între DOG1 și CD34.

Procentul celor care au decedat a fost mai crescut în rândul grupului cu CD34 negativ comparativ cu grupul CD34 pozitiv. De asemenea s-a observat și corelarea cu supraviețuirea cu boala reziduală.

În ceea ce privește PDGFRA acesta este un marker nespecific, întâlnit în cca. 80% din cazurile evaluate în acest studiu. Pauls și col. sunt de părere că distribuția paranuclear se întâlnește mai frecvent în tumorile cu mutații PDGFRA în timp ce distribuția citoplasmatică este ubicuitară, independent de statusul mutațional. Modelul de colorare întâlnit în cazurile studiate a fost citoplasmatic difuz.

Tendința de a exprima imunohistochimic CD117 și PDGFRA este mai pronunțată în cazul tumorilor cu mutații KIT decât în cele cu mutații PDGFRA. Astfel prin asocierea lui PDGFRA cu CD117 în panelul de anticorpi diagnostici el poate oferi informații valoroase, știut fiind faptul că tumorile KIT mutante au tendința să exprime ambii markeri (CD117 și PDGFRA) conform studiului efectuat de Pauls și col.

În lotul studiat, la nivelul stomacului s-a constatat o asociere pozitivă, moderată a lui PDGFRA cu nivelul hemoglobinei serice. Astfel, PDGFRA negativ a fost exclusiv prezent în rândul celor cu hemoglobina normală.

Miettinen și col., într-un studiu din anul 2000 au evidențiat prezența lui SMA în cca. 30% din GIST, în special în cele gastrice și de intestin subțire iar pozitivitatea sa are tendința de a se corela cu negativitatea lui CD34. Pe lotul de studiu s-a constatat o pozitivitate a lui SMA de 60,7% și o negativitate de 39,3% fără a se putea stabili o corelație semnificativă statistic între cei doi markeri. SMA s-a corelat cu localizarea tumorală înregistrându-se la nivelul stomacului o pozitivitate de 41%, la nivelul intestinului subțire de 23,6% și EGIST de 4.3%. S-a observat de asemenea și că SMA pozitiv tinde să fie asociat cu un procent mai crescut de tumori cu celule fusiforme. SMA pozitiv s-a asociat și cu o frecvență crescută a metastazelor tumorale în EGIST.

Pozitivitatea desminei este destul de rară în GIST, sub 5%, mai frecvent întâlnită la nivelul esofagului și omentului. În studiul de față, s-a remarcat o pozitivitate de 10.9% a Desminei, procentul ridicat fiind probabil influențat și de frecvența mai crescută a EGIST din cadrul lotului. S-a evidențiat de asemenea în rândul EGIST și o asociere marginal semnificativă între Desmina și forma macroscopică existând astfel o tendință ca Desmina negativă să fie mai frecventă în rândul tumorilor nodulare.

Studiile arată o corelare strânsă între indexul mitotic și indexul de proliferare Ki67. Unele studii propun chiar folosirea lui Ki 67 ca o alternativă la numărătoarea mitozelor. În ceea ce privește riscul de recurență, clasificarea actuală are la bază stratificarea pacienților pe baza parametrilor clinici histologici, neincluzând astfel teste imunohistochimice. Valoarea diagnostică a lui Ki 67 este utilă în special acolo unde numărul mitozelor este la limită (5/50 HPF) în special în cazurile în care încadrarea în grupul prognostic schimbă atitudinea terapeutică.

Pentru doi dintre pacienții lotului studiat a fost disponibilă testarea mutațiilor genetice pentru c-KIT și PDGFRA. Secvențierea ADN-ului a fost utilizată pentru identificarea mutațiilor somatice la nivelul exonilor 9, 11, 13 și 17 ai genei c-KIT și la nivelul exonilor 12, 14, 15 și 18 ai genei PDGFRA.

Cea mai frecventă mutație KIT întâlnită în GIST este cea la nivelul exon 11. Aceasta se produce în cca. 64-67% din cazuri și poate fi constituită din deleții, inserții substituții sau combinații. Dintre acestea, delețiile se asociază cu o supraviețuire totală mai mică în comparație cu celelalte mutații. Mai mulți autori au demonstrat că tumorile ce implică deleții la nivelul codonilor 557 sau 558 se asociază cu potențial metastatic crescut, lucru observat și în cazul celui de-al doilea pacient.

Künstlinger și col. au raportat în 2013 o frecvență a mutației Exonului 9 de cca. 9.2% și de asemenea faptul că 20% dintre tumorile cu mutație la nivelul Exon 9 s-au înregistrat la nivelul stomacului și rectului. De asemenea, s-a demonstrat că tumorile Exon 9 pozitive metastazează mai frecvent la nivelul peritoneului decât la nivel hepatic, lucru observat și în cazul primului nostru pacient. Totuși trebuie subliniat faptul că prezența mutației la nivelul exonului 9 nu are relevanță prognostică. Rata de răspuns la Imatinib în cazul tumorilor cu mutații la nivelul Exonilor 11 și 9 a fost evaluat într-un studiu de Faza III efectuat pe 768 de GIST-uri genotipate. Timpul mediu de progresie tumorală la pacienții cu mutații în Exon 11 este mai mare cu cel puțin 1 an decât la cei cu mutații în Exon 9. Acest lucru poate fi observat și la cei doi pacienți din studiul de față prin urmărirea supraviețuirii fără boala reziduală evidentă ce este mai mare cu 32 de luni la pacientul cu mutație în exonul 11 față de pacientul cu mutație în exonul 9.

În concluzie, analiza mutațională este utilă în cazurile rare ce pun probleme de diagnostic diferențial, precum tumorile CD117 negative. De asemenea este utilă în prezicerea răspunsului la Imatinib, știut fiind faptul că intensitatea colorației imunohistochimice pentru CD117 nu poate prezice răspunsul. Analiza mutațională poate fi utilă în ghidarea terapiei prin selecția de către oncolog a dozelor corespunzătoare pentru obținerea răspunsului optim, însă nu este necesară de rutină datorită faptului că implică niste costuri ridicate.

Caracterizarea grupul de graniță

Pacientii cu leziuni de granita au fost selectati ca fiind un grup aparte pe care au fost efectuate analize statistice in mod special. Leziunile de granita au inclus atât tumori cu diametrul între 4,5 cm și 5,5cm cat si tumori cu numarul de mitoze între 4 si 6/50 HPF. Din analizele legate de deces si supravietuire in randul pacientilor cu leziuni de granite au fost exclusi 3 pacienți care au decedat din alte cauze.

Astfel s-a constituit un grup alcătuit din 47 de pacienti, 29 (61,7%) femei si 18 (38,3%) bărbați, din care 36 (76,6%) au avut vârste de peste 50 de ani. Aproximativ două treimi din pacienți 32(68,1%) au provenit din mediul urban si circa o treime din mediul rural 15(31,9).

Marea majoritate a tumorilor au fost localizate la nivelul stomacului 25(53,2%) si intestinului subtire 14(29,8%). De asemenea 38/47 (80.9%) au prezentat metastaze încă de la momentul diagnosticului. La sfârșitul studiului 41 (87,2%) dintre pacienti decedaseră

Diferențierea între un comportament mai agresiv și unul indolent se face atât pe baza localizării cât și pe baza numarului de mitoze si al dimensiunea tumorii. Atunci cand acestea din urmă se apropie de valorile cut-off estimarea riscului de recurenta a bolii devine dificilă.

Alcătuirea grupului de granita ce a inclus tumorile cu dimensiuni si numar de mitoze apropiate de valorilecut-off pentru fiecare a avut drept scop urmarirea comportamentului si a evolutiei pacientilor in timp si stabilirea existentei diferentelor fata de prognosticul asteptat.

În randul pacientilor cu necroza decesul a fost mai frecvent comparativ cu grupul pacientilor fara necroza. Decesul a fost mai frecvent intalnit si in randul pacientilor cu tumori infiltrative si polipoide. Rata decesului pare sa fie mai crescuta de asemenea in cazul tipului celular epitelioid; totusi lotul de participant a fost destul de scazut ceea ce a facut dificila compararea subgrupurilor.

Folosirea markerilor ihc suplimentare pentru determinarea cu exactitate a numarului de mitoze si de asemenea importanta masurarii minuțioase a tumorii la examenul macroscopic este importanta pentru determinarea grupului prognostic. Necroza, aspectul macroscopic si tipul celular epitelioid sunt factori de prognostic prost ce ar trebui luați in calcul atunci cand evaluam riscul de recurenta al pacientului cu GIST.

Estimarea probabilității de supraviețuire prin metoda Kaplan Mayer

Pentru examinarea diferențelor între localizările primare (gastrică, intestin subțire și EGIST) în ceea ce privește rata supraviețuirii (supraviețuire totală, supraviețuire fără boală reziduală, supraviețuire cu boală reziduală) s-a folosit testul chi pătrat (Fischer) precum și curbele Kaplan Meier.

În ceea ce privește **supraviețuirea totală**: numărul mediu de zile de supraviețuire totală pentru fiecare localizare primară a fost după cum urmează: 4576 zile gastric (cca. 152 luni), 3509 (cca. 117 luni) zile intestinal și 2147 zile (cca. 71 luni) EGIST. Acestea au fost statistic diferite, pe baza tuturor celor trei parametri ai testului Kaplan Meier (Mantel-Cox, Breslow, și Tarone-Ware), care au avut valorile chi pătrat de: 32,40; 23,27; și respectiv 27,25 la un prag $p < 0,0001$.

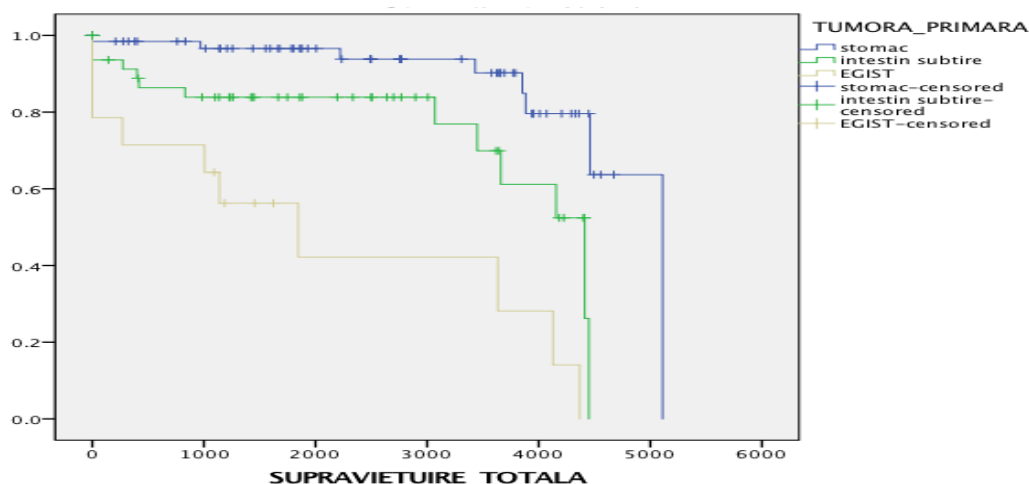


Figura 21. Estimarea Kaplan Meyer a supraviețuirii totale în funcție de localizarea tumorii primare

Și în ceea ce privește **supraviețuirea fără boală reziduală** rezultatele au fost semnificative. Numărul mediu de zile de supraviețuire totală pentru fiecare localizare primară a fost: 4089 zile gastric, 3134 zile intestin subțire și 1236 zile EGIST. Testele de semnificație au fost semnificative statistic.

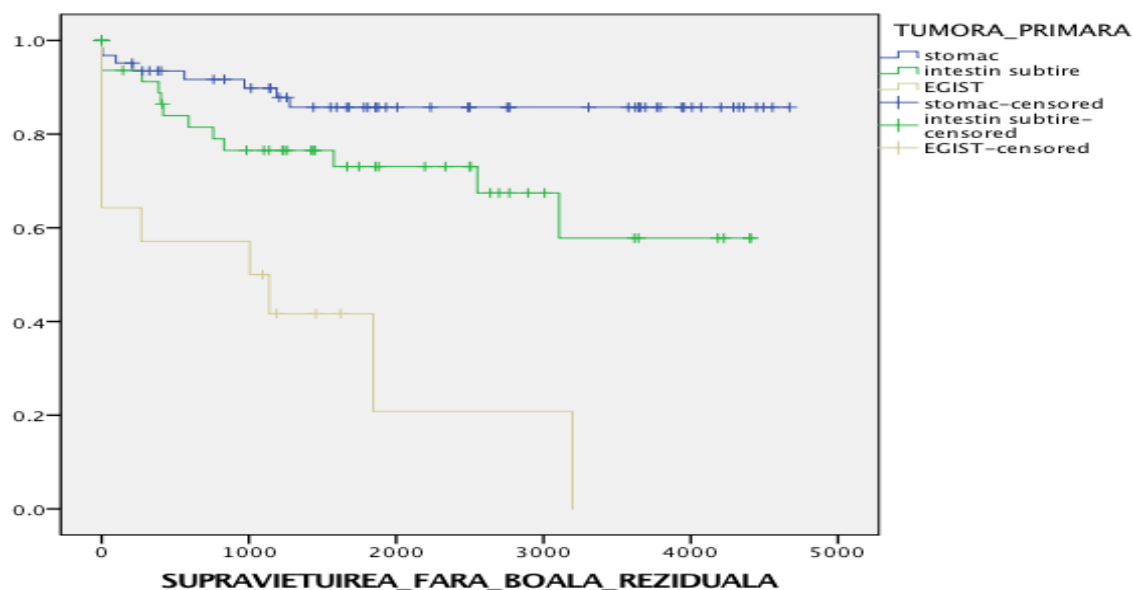


Figura 22. Estimarea Kaplan Meyer a supraviețuirii fara boală reziduală pentru pacienții cu GIST gastric, de intestin subțire și EGIST

Supraviețuirea cu boala reziduală nu a fost diferită între cele trei grupuri de localizări primare. Numărul mediu de zile de supraviețuire totală pentru fiecare localizare primară a fost: 2272 zile gastric, 1842 zile intestinale subțire și 984 zile EGIST.

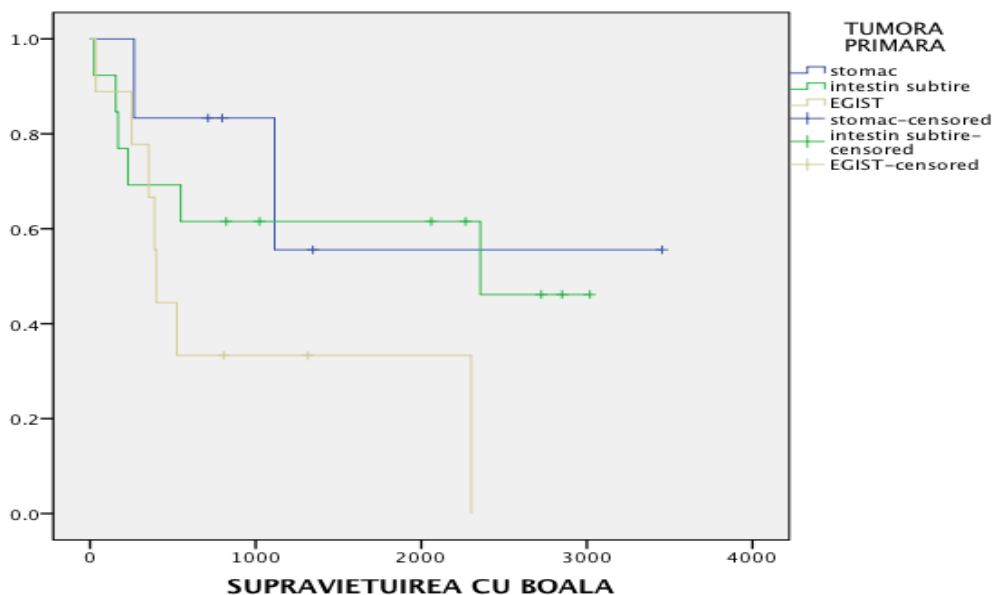


Figura 23. Estimarea Kaplan Meyer a supraviețuirii cu boală reziduală pentru pacienții cu GIST gastric, de intestin subțire și EGIST

Analizele Kaplan-Meier au fost completate cu regresia Cox hazard-proporțională.

Supraviețuirea totală, supraviețuirea fără boală reziduală și supraviețuirea cu boală reziduală au fost folosite ca variabile dependente și cu următorii predictorii - variabile independente: localizare tumoră primară și vârstă (variabila categorială sub 50 ani și peste 50 ani). Inițial au fost incluse și următoarele variabile covariate în ecuația de regresie: ulcerarea mucoasei, necroză, emboli vasculari, macroscopie, celularitate, pleomorfism celular, dezvoltare și arhitectura microscopică.

Rezultatele au confirmat următoarele: nu au existat diferențe semnificative în funcție de vârstă ($p > 0,39$; fracția de hazard FH = 0,56; interval de încredere IC 95%: 0,150, 2,109) și nici în funcție de localizare tumoră primară ($p > 0,06$; FH = 0,23 și 0,70; 95% IC: 0,044, 1,207 pentru intestinal versus gastric și IC: 0,146, 3,356 pentru EGIST versus gastric).

Pacienții cu ulcerarea mucoasei au avut o supraviețuire totală semnificativ scăzută ($p < 0,05$; fracția de hazard FH = 3,26; interval de încredere IC 95%: 1,098, 9,713); pacienții cu necroză au avut o supraviețuire semnificativ scăzută ($p > 0,05$; fracția de hazard FH = 3,32; interval de încredere IC 95%: 1,242, 8,887) și pacienții cu emboli vasculari au avut o supraviețuire semnificativ scăzută ($p > 0,01$; fracția de hazard FH = 10,97; interval de încredere IC 95%: 1,828, 65,865).

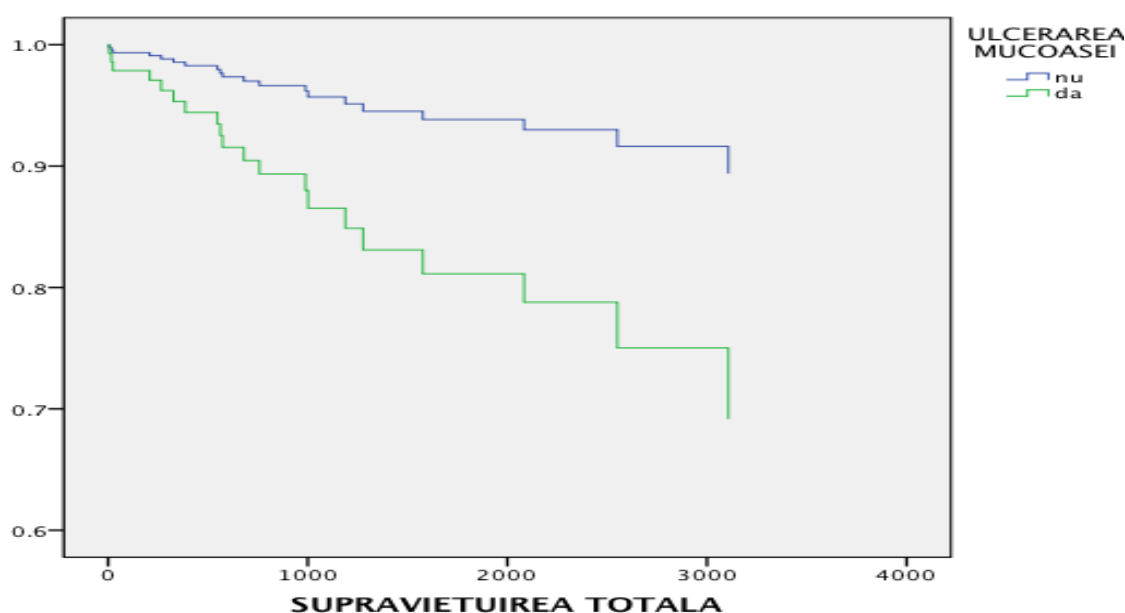


Figura 24. Estimarea supraviețuirii totale la pacienții cu sau fără ulcerarea mucoasei

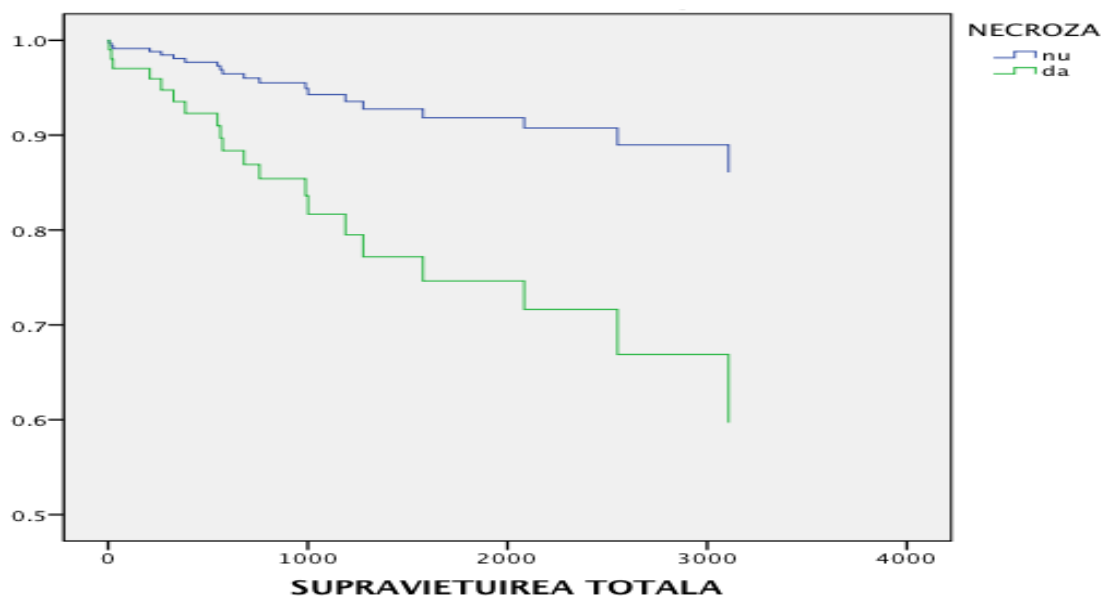


Figura 25. Estimarea supraviețuirii totale la pacienții cu sau fără necroză

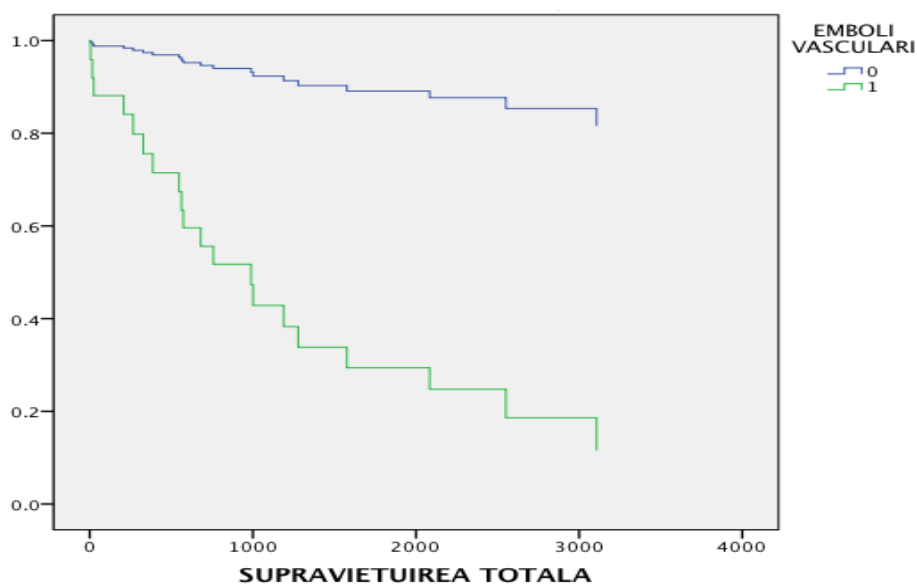


Figura 26. Estimarea supraviețuirii totale la pacienții cu sau fără emboli tumorali vasculari (0- fara emboli tumorali; 1- cu emboli tumorali)

Analizele pentru **supraviețuire fără boală reziduală**: localizarea tumorii primare a fost semnificativ asociată cu durata supraviețuirii fără boală reziduală ($p < 0,05$; fracția de hazard FH = 2,52; interval de încredere IC 95%: 1,151, 5,553) (a se vedea graficul pentru Kaplan-Meier). Pacienții cu necroză au avut o supraviețuire fără boală/recurență semnificativ scăzută ($p < 0,01$; fracția de hazard FH = 0,23; interval confidență IC 95%: 0,076, 0,697).

Pacienții cu ulcerare a mucoasei au avut supraviețuire fără boală reziduală mai scăzută ($p < 0,05$; fracția de hazard FH = 0,21; interval confidență IC 95%: 0,061, 0,734).

Pentru **supraviețuire cu boală reziduală** nu a existat nici o diferență semnificativă.

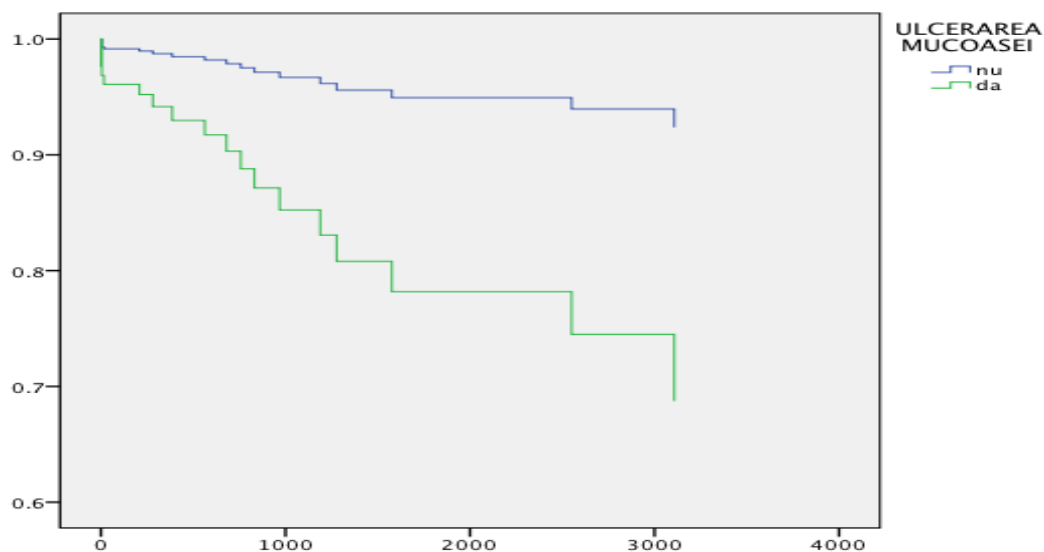


Figura 27. Estimarea supraviețuirii fără boală reziduală la pacienții cu sau fără ulcerarea mucoasei

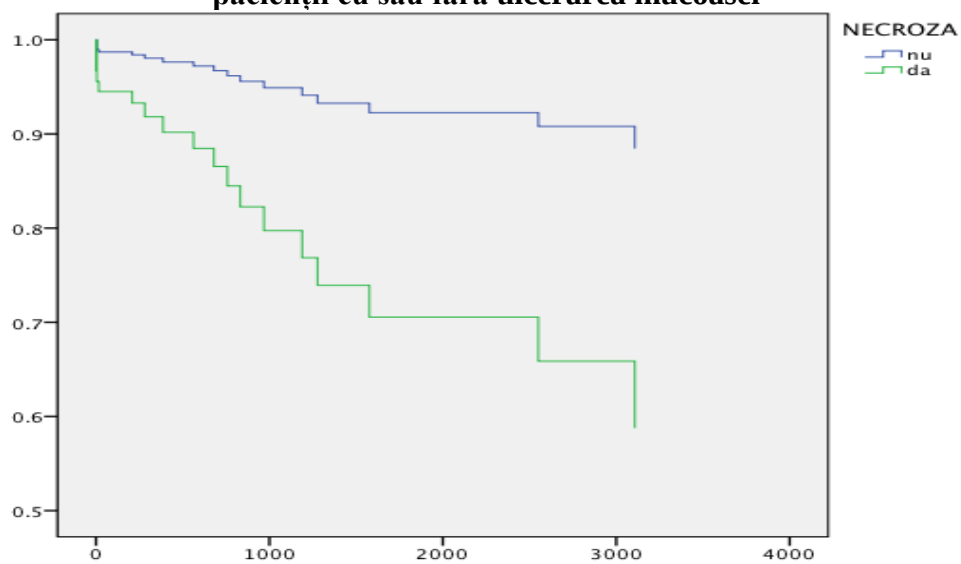


Figura 28. Estimarea supraviețuirii fără boală reziduală la pacienții cu sau fără necroză

Atât supraviețuirea cu boala reziduală cât și cea fără boala reziduală s-au corelat cu grupul prognostic, astfel cu cât grupul prognostic este mai mic cu atât crește supraviețuirea fără boală reziduală

Pacienții cu celularitate medie au avut o supraviețuire fără boală reziduală în medie cu 640.35 zile mai mult decât pacienții cu celularitate crescută

Pacienții din grupul cu pleomorfism moderat au avut o supraviețuire cu boală reziduală în medie cu 1183 zile mai mare decât cei cu pleomorfism sever.

Timpul de supraviețuire s-a corelat cu grupul prognostic în lotul de studiu, subliniind încă o dată importanța evaluării corecte a parametrilor histologici.

La pacienții cu GISTuri gastrice s-a constatat o supraviețuire totală mai mare în rândul celor cu CD34 pozitiv. Această corelație nu s-a menținut însă la nivelul întregului lot și nici în cadrul EGISTurilor. La testul t s-a înregistrat o corelație marginal semnificativă între CD34 pozitiv și supraviețuirea totală.

CONCLUZII

Lotul de studiu a cuprins 139 de pacienți diagnosticați cu tumori stromale gastrointestinale, cu vârste cuprinse între 22 ani și 83 ani, cu o vârstă medie la momentul diagnosticului de 57,26 ani și cu repartiție aproximativ egală pe sexe la nivelul întregului lot - bărbați:femei = 68:71 - (48,9%): (51,1%) . S-a constatat faptul că peste vârsta de 60 de ani incidența la bărbați este mult mai mare (B:F= 58% :38%) iar sub vârsta de 30 de ani incidența este mult mai mare la femei (F:B=6%: 1% dintre bărbați), cauzat și de faptul că acestea merg mai des la controale medicale decât bărbații.

Din analiza distribuției în funcție de mediul de proveniență s-a constatat o incidență mai crescută la pacienții proveniți din mediul urban 88 (63.3%) față de cei proveniți din mediul rural 51 (36.69%), acest rezultat putând fi consecința unui nivel mai scăzut de educație medicală și a unei adresabilități tardive către medic, a pacienților proveniți din mediul rural.

Majoritatea tumorilor s-au localizat la nivelul stomacului 47.5% și intestinului subțire 36.1% urmate fiind de localizări extragastrointestinale (11,5%) colonice(2.8%) și rectale (1.4).

Diametrul tumorii primare a variat de la 0,6 la 30cm, cu o medie de 7.018 cm.

Acuzele cel mai frecvent întâlnite în rândul pacienților din lotul studiat au fost hemoragiile și durerile abdominale.

Rezultatele arată că cca. o treime din pacienții cu tumori de intestin subțire și cca. jumătate din EGIST au prezentat metastaze încă din momentul diagnosticului, aceasta explicându-se parțial și datorită simptomatologiei mai estompate.

Din analiza distribuției recidivelor s-a constatat că în rândul pacienților cu EGIST există o frecvență mai mare decât în rândul pacienților cu GIST gastric sau de intestin subțire.

Dintre pacienții cu metastază în momentul diagnosticului 27% (8/22) au recidivat.

În grupul pacienților cu metastaze tumorale încă de la momentul diagnosticului s-a înregistrat o dimensiune mai mare a tumorii primare, un număr mai mare de mitoze atipice ($>5/50$ hPF) și o celularitate mai crescută, toți reprezentând factori de agresivitate.

În ceea ce privește decesul, în lotul studiat s-a observat că acesta este mai frecvent întâlnit în rândul pacienților cu EGIST decât în rândul celor cu GIST gastric sau intestinal.

Decesele au fost mai frecvente în rândul pacienților cu celularitate crescută față de cei cu celularitate medie sau scăzută.

Celularitatea crescută este întâlnită mai frecvent în rândul pacienților cu metastaze și se asociază cu o probabilitate de deces. Aceasta însă nu diferă și în funcție de localizarea tumorii primare.

Creșterea diametrului tumoral se asociază cu o creștere a numărului de mitoze în lotul studiat.

Pleomorfismul celular crescut s-a înregistrat mai frecvent în tumorile pacienților cu metastaze încă de la diagnostic dar nu și în rândul celor care au recidivat.

În rândul pacienților ce au prezentat tumori cu necroză, recidivă tumorală a fost mai frecventă, prezența necrozei tumorale ca și marker de agresivitate fiind întărită de această asociere.

În ceea ce privește investigațiile imunohistochimice, CD117 - biomarker diagnostic - a exprimat o pozitivitate de 95.1% iar paternul de colorare cel mai frecvent întâlnit a fost cel combinat - membranar, citoplasmatic și paranuclear – cu o intensitate variabilă și o distribuție focală sau difuză.

În lotul studiat 4,3% (6/139) din cazuri au prezentat reacție negativă la CD117, diagnosticul fiind dificil și necesitând biomarkeri suplimentari precum DOG1 și PDGFRA.

DOG1 a prezentat un grad de pozitivitate de 88.9%, fiind inferior celui de 95.7% al lui CD117, acest lucru explicându-se prin numărul mai mic de cazuri din lot, testate cu acest biomarker (36/139).

În lotul studiat, CD34 a înregistrat pozitivitate în 69,7% din cazurile studiate și 30,3% negativitate. Pozitivitatea lui CD34 s-a corelat cu localizarea gastrică și intestinală iar negativitatea sa cu localizările extragastrointestinale(EGIST). De asemenea la nivelul stomacului CD34 tinde să fie pozitiv în rândul pacienților cu mai puține mitoze (<5/50HPF) dar și în rândul pacienților cu un pleomorfism minim și moderat.

De asemenea în lotul studiat s-a observat și o asociere marginală între pozitivitatea lui CD117 și CD34 precum și între DOG1 și CD34.

Procentul celor care au decedat a fost mai crescut în rândul grupului cu CD34 negativ comparativ cu grupul CD34 pozitiv. De asemenea s-a observat și corelarea cu supraviețuirea cu boală reziduală.

În ceea ce privește SMA s-a constatat o pozitivitate de 60,7%, cea mai mare înregistrându-se la nivelul stomacului (41%), urmată de intestin subțire 23,6% și EGIST 4.3%. De asemenea SMA s-a înregistrat mai frecvent în rândul tumorilor cu celule fusiforme.

SMA pozitiv s-a asociat și cu o frecvență crescută a metastazelor tumorale în EGIST.

În privința Desminei s-a remarcat o pozitivitate de 10.9% a procentul ridicat fiind probabil influențat și de frecvența mai crescută a EGIST din cadrul lotului. S-a evidențiat de asemenea în rândul EGIST și o asociere marginal semnificativă între Desmina și forma macroscopică existând astfel o tendință ca Desmina negativă să fie mai frecventă în rândul tumorilor nodulare.

Analiza mutațională, efectuată la cei doi pacienți (bărbați) din studiu a relevat mutații la nivelul Exonului 11, respectiv Exonului 9, și a fost utilă ghidarea tratamentului și selectarea dozelor terapeutice.

Rezecția tumorală incompletă, ulcerarea mucoasei, prezența necrozei și numărul crescut de mitoze sunt elemente ce pot prezice decesul sau recidiva tumorală.

În ceea ce privește supraviețuirea totală și supraviețuirea fără boală reziduală acestea au fost net superioare în cazul tumorilor localizate la nivel gastric urmate de cele de intestin subțire și EGIST.

Supraviețuirea cu boală reziduală însă nu a fost diferită între cele trei grupuri de localizări primare (stomac, intestin subțire și EGIST), acest lucru sugerând indirect implicarea terapiei și efectul pozitiv pe care îl au inhibitorii de tirozin kinază asupra prelungirii supraviețuirii.

S-a constatat de asemenea că pacienții cu necroză sau cei cu ulcerarea mucoasei au avut o supraviețuire fără boală reziduală semnificativ scăzută.

Rolul major al anatomopatologului este de a stabili un diagnostic corect, lucru ce poate fi extrem de dificil în special în cazurile rare cu CD117 negativ. Estimarea recurenței prin stratificarea riscului conform AFIP este crucială pentru managementul pacientului ; analiza mutațională pentru evaluarea impactului asupra prognosticului și prezicerea răspunsului la tratament.

CONCLUZII FINALE

- Diagnosticul anatomopatologic trebuie să conțină informații exacte privind gradul tumoral și prognosticul pacientului. Diametrul tumoral, indexul mitotic, localizarea tumorală, ruptura tumorală, intervalul fără boală sunt parametrii clasici folosiți pentru prezicerea evoluției clinice a pacientului care suferă o intervenție chirurgicală de îndepărtare completă a tumorii.
- Diametrul peste 5 cm și numărul de mitoze peste 5/50 hpf sunt factori ce predispun la metastazare
- Tumorile de intestin subțire au tendința să aibă un prognostic mai prost față de cele cu localizare gastrică
- Emboli tumorali vasculari și numărul crescut de mitoze atipice sunt de asemenea predictorii buni pentru deces

- Stratificarea riscului clinicopatologic se corelează cu supraviețuirea pe termen lung
- Panelul minim de anticorpi pentru un diagnostic și o predicție relativă a mutațiilor este compus din: CD117, DOG, PDGFRA, CD34, SMA, Desmina.
- Analiza mutațională, deși costisitoare, este necesară în cazurile în care testele imunohistochimice nu conferă un diagnostic clar (CD117 negativ) sau în cazurile rezistente la terapia cu imatinib.

Bibliografie selectiva

- Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, et al. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science*. 1998; 279:577–580.
- Kindblom LG, Remotti HE, Aldenborg F, Meis-Kindblom JM. Gastrointestinal pacemaker cell tumor (GIPACT): gastrointestinal stromal tumors show phenotypic characteristics of the interstitial cells of Cajal. *Am J Pathol*. 1998; 152:1259–1269.
- Joensuu H. Gastrointestinal stromal tumor (GIST). *Ann Oncol* 2006; 17(suppl 10): 280–6.
- Agaimy A, Wunsh PH: Gastrointestinal stromal tumours: a regular origin in the muscularis propria, but an extremely diverse gross presentation. A review of 200 cases to critically re-evaluate the concept of so-called extra-gastrointestinal stromal tumours. *Langenbecks Arch Surg* 2006; 39:322-329.
- Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors. *Gastroenterol. Clin North Am* 2013; 42(2):399–415.
- Nilsson B, Bümming P, Meis-Kindblom JM, et al. Gastrointestinal stromal tumors: The incidence, prevalence, clinical course, and prognostication in the preimatinib mesylate era-a population based study in western Sweden. *Cancer* 2005; 103(4):821–9.
- Miettinen M, Sobin LH, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors of the stomach: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 1765 cases with long-term follow-up. *Am J Surg Pathol* 2005; 29:52- 68.
- ESMO/European Sarcoma Network Working Group. Gastrointestinal stromal tumours: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2014; 25 suppl 3:iii21–26.
- Nishida T, Hirota S, Yanagisawa A, Sugino Y, Minami M, Yamamura Y, Otani Y, Shimada Y, Takahashi F, Kubota T. Clinical practice guideline for gastrointestinal stromal tumor (GIST) in Japan. *Int J Clin Oncol*. 2008;13:416–30.

- Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: review on morphology, molecular pathology, prognosis, and differential diagnosis. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130(10):1466-78
- Fletcher C D M, Berman J J, Corless C et al. Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: a consensus approach. *Hum Pathol* 2002; 33: 459-465.
- DeMatteo RP, Lewis JJ, Leung D, Mudan SS, Woodruff JM, Brennan MF. Two hundred gastrointestinal stromal tumors: recurrence patterns and prognostic factors for survival. *Ann Surg.* 2000; 231:51–58.
- Rubin BP, Blanke CD, Demetri GD, et al. . Protocol for the examination of specimens from patients with gastrointestinal stromal tumor , *Arch Pathol Lab Med*, 2010, vol. 134 (pg. 165 -170)
- Tryggvason G, Gislason HG, Magnusson MK, et al. Gastrointestinal stromal tumors in Iceland, 1990-2003: the icelandic GIST study, a population-based incidence and pathologic risk stratification study. *Int J Cancer* 2005;117:289-93
- Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: review on morphology, molecular pathology, prognosis, and differential diagnosis. *Arch Pathol Lab Med.* 2006; 130(10):1466–1478.
- Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: pathology and prognosis at different sites. *Semin Diagn Pathol* 2006; 23:70–83.
- Miettinen M, Wang ZF, Lasota J. DOG1 antibody in the differential diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: a study of 1840 cases. *Am J Surg Pathol* 2009; 33:1401–1408
- Lee HE, Kim MA, Lee HS, et al. Characteristics of KIT-negative gastrointestinal stromal tumours and diagnostic utility of protein kinase C theta immunostaining. *J Clin Pathol* 2008; 61:722–729.
- Joensuu H, Hohenberger P, Corless CL. Gastrointestinal stromal tumour. *Lancet* 2013; 382:973-983.
- American Joint Committee on Cancer. Gastrointestinal Stromal Tumor. In: *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. New York, NY: Springer; 2017:523.
- Fletcher CD, Hogendoorn P, Mertens F, Bridge J. *WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone*. 4th ed. Lyon, France: IARC Press; 2013.

- Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors. *Gastroenterol Clin North Am* 2013; 42(2):399–415.
- Fletcher, C. D., Bridge, J. A., Hagendoorn, P. C., & Mertens, F. (2013). WHO classification of tumors of soft tissue and bone (ed. 4th). Lyon: IARC.
- Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C, et al, eds. *TNM Classification of Malignant Tumours*. 8th ed. Oxford, UK: Wiley Blackwell; 2017.
- National Comprehensive Cancer Network (NCCN). NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Soft Tissue Sarcoma. V.2.2017. Accessed at www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/sarcoma.pdf on April 17, 2017.
- International union against cancer (UICC) Sobin LH, Wittekind Ch, editors. 7th Ed. New York: Wiley; 2010. *TNM classification of malignant tumours*.
- Demetri GD, von Mehren M, Antonescu CR, et al. NCCN Task Force report: update on the management of patients with gastrointestinal stromal tumors. *J Natl Compr Canc Netw*. 2010 Apr. 8 Suppl 2:S1-41; quiz S42-4.