

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TORINO

Dipartimento di Scienze Mediche

**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE
BIOMEDICHE ED ONCOLOGIA**

Ciclo XXVIII

TITOLO:

**NUOVI FATTORI PROGNOSTICO-
PREDITTIVI NEI TUMORI STROMALI
GASTROINTESTINALI (GIST): STUDIO
SUL RUOLO DI CAVEOLINA-1 E p130CAS**

TESI PRESENTATA DA: Dott.ssa Antonella Barreca

TUTOR: Prof. Paola Cassoni

COORDINATORE DEL DOTTORATO: Prof. E. Hirsh

ANNI ACCADEMICI: 2013/2017

SETTORE SCIENTIFICO-DISCIPLINARE DI AFFERENZA: MED/08-MED/06

SOMMARIO

1. PARTE I-I TUMORI STROMALI GASTROINTESTINALI

- 1.1 INTRODUZIONE
- 1.2 CARATTERISTICHE CLINICHE
 - a) Epidemiologia e presentazione clinica
 - b) Sindromi familiari
- 1.3 PATOGENESI MOLECOLARE
 - a) Struttura e funzione di c-KIT
 - b) Struttura e funzione di PDGFRA
 - c) Mutazioni di c-KIT e PDGFRA
 - d) Mutazioni di NF1, KRAS E BRAF
 - e) GIST con perdita di funzione del complesso SDH
 - f) Progressione tumorale
- 1.4 CARATTERISTICHE PATOLOGICHE E DIAGNOSI
 - a) Istologia e stratificazione del rischio
 - b) Immunoistochimica
 - c) I “microGIST”
 - d) Criteri diagnostici e diagnosi differenziale
- 1.5 TERAPIA
 - a) Terapia chirurgica
 - b) Terapia molecolare con inibitori delle tirosina-chinasi
 - c) Follow-up

2. PARTE II-“KIT AND PDGFRA MUTATIONS AND PDGFRA IMMUNOSTAINING IN GASTROINTESTINAL STROMAL TUMORS” Barreca et al *Molecular Medicine Reports* 4:3-8, 2011

3. PARTE III-LA CAVEOLINA-1 E p130CAS

- 3.1 LA CAVEOLINA-1
- 3.2 p130Cas

4. PARTE IV-SPERIMENTALE

- 4.1 OBIETTIVO DELLO STUDIO
- 4.2 MATERIALI E METODI
- 4.3 RISULTATI
- 4.4 DISCUSSIONE

5. PARTE V

- 5.1 RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

PARTE I

1.1 INTRODUZIONE

I tumori stromali gastrointestinali (GIST) sono un gruppo eterogeneo di tumori mesenchimali, che insorgono prevalentemente nella parete del tubo digerente.

La prima descrizione accurata al microscopio ottico dei GIST risale al lavoro di *Golden e Stout*¹ del 1941, che definì erroneamente questi tumori come leiomioblastomi, leiomiomi o leiomiosarcomi, data la presenza in alcuni di essi di miofibrille citoplasmatiche, la morfologia cellulare prevalentemente fusata e l'apparente origine dalla muscolatura digerente. La microscopia elettronica, tuttavia, alla fine degli anni '60 rivelò la presenza di differenziazione muscolare liscia solo in una minoranza di questi tumori, e l'immunoistochimica negli anni '80 dimostrò un'espressione molto variabile dei marker muscolari actina e desmina^{2,3}.

In considerazione di ciò *Mazur e Clark*⁴ nel 1983 preferirono definirli "gastrointestinal stromal tumor" (GIST) per indicare genericamente un gruppo di sarcomi gastrointestinali, senza specificare una precisa linea di differenziazione. Inoltre individuarono in alcuni casi una parziale positività immunoistochimica alla proteina S-100, marcatore delle cellule derivate dal neuroectoderma e dalla cresta neurale, in assenza però degli aspetti ultrastrutturali delle cellule di Schwann. Ipotizzarono quindi che questi tumori originassero da elementi nervosi diversi dalle cellule di Schwann, come le cellule del plesso nervoso mioenterico di Auerbach, e chiamarono questo gruppo di tumori: "myenteric nerve sheath tumor". *Herrera et al.*⁵ introdussero nel 1984 il concetto di plexosarcoma per definire una piccola parte di questi tumori con differenziazione in senso neuronale autonomico e li chiamarono successivamente "gastrointestinal autonomic nerve tumour" (GANTs)⁶.

Nel 1995 *Miettinen et al.*⁷ rilevarono la positività al CD34 nel 73% dei GIST, ma questo marker era caratterizzato da una bassa specificità, essendo espresso in una grande varietà di tumori a cellule fusate.

Nel 1998 *Hirota et al.*¹¹ riportarono la presenza di mutazioni attivanti il proto-oncogene KIT in alcuni GIST; inoltre dimostrarono che le cellule interstiziali di

Cajal, in analogia con le cellule dei GIST, erano le uniche nella parete gastrointestinale normale a presentare doppia positività per KIT e CD34.

Le cellule interstiziali di Cajal condividono aspetti immunofenotipici e ultrastrutturali sia delle cellule muscolari lisce sia delle cellule neuronali⁹.

Esse funzionano come “cellule pacemaker” interposte tra il sistema nervoso autonomo e gli strati muscolari della parete dell’apparato digerente, per la coordinazione della peristalsi. L’espressione di KIT ha un ruolo fondamentale nell’indirizzare la differenziazione delle cellule primitive mesenchimali in cellule di Cajal; infatti i topi knock-out per KIT sono privi del sistema di cellule interstiziali e presentano un tubo digerente aperistaltico¹⁰.

KIT è un recettore tirosina-chinasi di tipo III (RTK) transmembrana⁸, codificato dal protooncogene c-kit, espresso sulle cellule emopoietiche staminali, sui mastociti, sui melanociti e sulle cellule interstiziali di Cajal.

L’espressione di KIT è stata proposta come il marker fenotipico più sensibile e specifico dei GIST, che sono pertanto definiti come un gruppo distinto di neoplasie mesenchimali del tratto gastrointestinale esprimenti KIT e originate dalle cellule interstiziali di Cajal¹².

In realtà alcuni GIST originano primitivamente dal mesentere o dall’omento, che sono privi di cellule di Cajal, suggerendo un’origine da cellule staminali mesenchimali multipotenti¹³.

Inoltre è stata dimostrata la presenza di identiche mutazioni e espressione di KIT anche a livello dei GANT¹⁴, che non sono stati quindi più considerati come un’entità clinicopatologica separata ma come una variante morfologica dei GIST.

Nel 2003^{15,16} sono state descritte mutazioni attivanti a livello del gene codificante “*platelet-derived growth factor receptor alfa*” (PDGFRA) nei GIST privi di mutazioni di KIT, introducendo così un nuovo elemento fondamentale nella patogenesi molecolare di questi tumori. Successivamente Agaram *et al.*²⁴⁷ hanno riportato la presenza di mutazioni nel gene BRAF nel 5% dei pazienti “wild-type” per KIT e PDGFRA e nel 2% dei GIST con mutazioni in KIT/PDGFRA che avevano acquisito resistenza al trattamento con imatinib.

Nel 2007 sono state inoltre descritte in pazienti con forme famigliari di GIST mutazioni in alcuni geni del complesso enzimatico SDH (SDHB, SDHC, SDHD)³²⁷.

1.2 CARATTERISTICHE CLINICHE

a) EPIDEMIOLOGIA E PRESENTAZIONE CLINICA

La mancanza, fino ad alcuni anni or sono, di criteri diagnostici accreditati per i GIST ha determinato una grande variabilità nella stima dell'incidenza della malattia.

Kindblom et al.^{72,76} hanno completato un'analisi retrospettiva di tutti i tumori inquadrabili come GIST, identificati durante gli anni 1983-2000 in una popolazione di 1,5 milione di abitanti nella Svezia sud-occidentale. Sulla base di questo studio, che includeva la determinazione immunoistochimica di KIT, l'incidenza annuale di GIST primitivi in Svezia è stata stimata di 14,5 casi per milione di abitanti e la prevalenza di 129 casi per milione di abitanti; in analogia con una precedente valutazione condotta su un campione di popolazione nel sud della Finlandia, che aveva riportato un'incidenza annuale di 10-20 casi per milione di abitanti²⁰.

Il primo studio di popolazione condotto negli USA⁷⁸ ha identificato nei "SEER cancer registries" tutti i casi di GIST maligni diagnosticati dal 1992 al 2000 e ha stimato un'incidenza annuale di 6,8 casi per milione di abitanti, con valori più elevati negli individui di sesso maschile (8,3) e di razza nera (11,6).

La differenza rispetto agli studi sopra riportati⁷⁶ è dovuta al fatto che i dati dei "SEER cancer registries" includevano solo i tumori definiti maligni.

Un altro studio a livello nazionale è stato condotto nei Paesi Bassi⁷⁹, in cui sono stati selezionati dal registro nazionale tumori "PALGA" tutti i GIST presenti nel 1995 e tra il 1998 e il 2003. I risultati hanno dimostrato un aumento dell'incidenza annuale dei GIST dai 2,1 casi per milione di abitanti del 1995 ai 12,7 per milione di abitanti del 2003, probabilmente per il miglioramento dell'accuratezza diagnostica.

I GIST sono comunque una neoplasia relativamente rara, rappresentando il 5% di tutti i sarcomi e meno dell'1% di tutti i tumori primitivi maligni del tratto gastrointestinale, ma sono i tumori mesenchimali più frequenti (80%) in tale sede^{16,24,68,71} e il 13,9% dei tumori dell'intestino tenue, il 2,2% di quelli gastrici e meno dell'1% di quelli dell'esofago, colon e retto^{61,75,77}.

La loro incidenza sembra essere indipendente dall'area geografica, dalla razza e dal sesso: gli uomini e le donne ne sono equamente affetti⁶⁸, anche se alcuni studi dimostrano un lieve aumento di prevalenza negli uomini^{73,74}.

L'incidenza reale dei GIST, compresi i tumori asintomatici e di piccole dimensioni non biopsiati o resecati, è difficile da determinare, perchè richiede complicate analisi retrospettive di autopsie e "file" di patologia chirurgica su base regionale.

L'età media alla diagnosi è circa 60 anni e il 75% dei casi si verificano in individui di età superiore ai 50 anni⁶¹, mentre sono infrequenti prima dei 40 anni e molto rari nei bambini.

Non sono stati identificati fattori eziologici dei GIST, anche se è stata rilevata un'apparente associazione con l'infezione del virus di Epstein-Barr^{93,94}, non ancora validata.

I GIST possono insorgere in qualsiasi punto del tratto gastrointestinale dall'esofago al retto; il 50-60% di questi tumori è situato nello stomaco²⁶, il 20-30% nell'intestino tenue^{82,83}, il 10% nell'intestino crasso^{84,85}, il 5% nell'esofago⁴⁵. Un altro 5-10%^{13,39,88} colpisce sedi addominali extragastrointestinali quali peritoneo, mesentere, retroperitoneo o pelvi e molto raramente la vescica⁸⁰; rari casi sono descritti a livello della colecisti⁸¹, del pancreas⁸⁶ e dell'appendice⁸⁷.

Lo studio immunoistochimico della KIT-positività è fondamentale per confermare la diagnosi dei tumori stromali al di fuori del tubo digerente.

I tumori stromali gastrointestinali sono multicentrici in meno del 5% dei casi²⁴².

I tumori stromali extra-gastrointestinali, anche chiamati EGIST, sono morfologicamente, immunoistochimicamente e molecolarmente identici ai GIST^{13,39}. Gli EGIST omentali sono approssimativamente comparabili ai GIST gastrici, con prognosi più favorevole, mentre quelli mesenterici sono simili morfologicamente e biologicamente a quelli dell'intestino tenue.

In realtà i veri EGIST sono estremamente rari⁸⁸, e la maggior parte dei tumori definiti EGIST sono probabilmente GIST con una crescita extramurale verso la cavità peritoneale, con l'eventuale perdita della loro connessione alla parete digerente.

*Emory et al.*⁸⁹ hanno rilevato che la localizzazione anatomica è di per sé un fattore prognostico, indipendente dalla dimensione tumorale, dall'indice mitotico e

dall'età del paziente: migliore per i GIST esofagei, peggiore per quelli ad origine dall'intestino tenue, ma le basi di queste differenze rimangono incerte²⁶.

Inoltre i GIST gastrici hanno una prognosi migliore rispetto a quelli dell'intestino tenue di simili dimensioni e indice mitotico^{25,216}.

Altri autori come *Miettinen et al.*²⁰ giudicano invece la maggior parte dei tumori esofagei e del colon come maligni.

Approssimativamente il 20-30% dei GIST sono francamente maligni al momento della diagnosi, per le caratteristiche biologiche delle lesioni, perchè hanno già dato metastasi o hanno invaso le strutture o gli organi adiacenti^{19,20,90,91}. I sintomi iniziali sono spesso aspecifici, anche se rappresentativi del tratto gastrointestinale di origine. Nel 50%⁷⁵ dei casi l'esordio avviene con sanguinamento gastrointestinale, per erosione della mucosa, che può essere cronico con anemizzazione o acuto fino a rendere necessario un trattamento di emergenza.

La percentuale di pazienti che si presentano alla diagnosi con malattia metastatica varia dal 10%⁹² fino al 50% dei casi^{19,71}; la sede più frequente di metastasi è il fegato seguita dalle membrane sierose addominali.

Il coinvolgimento dei linfonodi e di siti extra-addominali si verifica in meno dell'1% dei casi³⁷ e solitamente sono interessati i polmoni, soprattutto nei casi avanzati⁶¹.

I GIST scoperti incidentalmente, durante esami o procedure chirurgiche per altre malattie, un terzo di tutti i casi, sono solitamente di dimensioni inferiori ai 2 cm⁷⁵.

Lo di popolazione di *Nilsson et al.*⁷⁶ ha rilevato che la diagnosi di GIST era stata fatta per sintomi nel 69% dei casi, casualmente nel 21% e al tavolo autoptico nel 10% e che le dimensioni medie tumorali erano rispettivamente di 8,9 cm, 2,7 cm e 3,4 cm.

Nel 5% dei pazienti con GIST si manifestano altre neoplasie maligne, di origine mammaria, cutanea, dell'utero e della prostata⁶¹.

b) SINDROMI FAMILIARI

In alcune sindromi i GIST si presentano in forma di tumore ereditario.

GIST FAMILIARI

La sindrome dei GIST familiari è caratterizzata dalla presenza di GIST multipli in diversi membri di ciascuna famiglia^{95,96,97}, ereditati con modalità autosomica dominante.

In questi casi le lesioni sono multifocali e l'età media alla diagnosi è più precoce rispetto ai GIST sporadici (46 anni versus 60 anni).

Le analisi molecolari hanno dimostrato negli individui affetti la presenza di mutazioni germinali attivanti KIT o PDGFRA, dello stesso tipo di quelle osservate nei GIST sporadici.

Le mutazioni (Tab. 1.1) sono state identificate a livello dell'esone 11 di KIT^{95,97,98,99}, dell'esone 13 di KIT o dominio chinasi^{1100,101}, dell'esone 17 di KIT⁹⁶ e dell'esone 18 di PDGFRA¹⁰².

I pazienti con mutazioni germinali di KIT a livello del codone 559 dell'esone 11 sviluppano anche iperpigmentazione e orticaria pigmentosa (mastocitosi); possono presentarsi fin dall'infanzia lesioni pigmentate cutanee quali lentiggini, nevi melanocitici benigni, macchie caffè-latte, ma anche melanoma maligno⁹⁷.

Tabella 1.1 Stato mutazionale e altre lesioni presenti nei GIST familiari⁹⁷

MUTAZIONE	ALTRE LESIONI			
	IPERPIGMENTAZIONE	ORTICARIA PIGMENTOSA	NEVI	ACALASIA
KIT esone11 (Val ⁵⁵⁹ →Ala ⁵⁵⁹)	presente	presente	presente	assente
KIT esone 11 (Trp ⁵⁵⁷ →Arg ⁵⁵⁷)	assente	assente	assente	assente
KIT esone 13 (Lys ⁶⁴² →Glu ⁶⁴²)	assente	assente	assente	assente
KIT esone 17 (Asp ⁸⁴⁶ →Tyr ⁸⁴⁶)	assente	assente	assente	presente
PDGFRA esone18 (Asp ⁸⁴⁶ →Tyr ⁸⁴⁶)	assente	assente	assente	assente

Nella maggioranza delle forme ereditarie di cancro una mutazione è stata trasmessa per via germinale ma sono necessarie mutazioni addizionali somatiche per iniziare il processo di trasformazione neoplastica. Nel caso dei GIST familiari l'attivazione germinale di KIT determina l'iperplasia delle cellule interstiziali di Cajal¹⁰³ e le successive mutazioni somatiche, in particolare la tipica delezione dei cromosomi 14 e 22, potrebbero promuovere la transizione da iperplasia a neoplasia. Questa conclusione è supportata dagli studi di clonalità condotti da *Chen et al.*¹⁰⁴ nelle lesioni di due differenti famiglie; in cui l'iperplasia diffusa delle cellule interstiziali di Cajal della tonaca muscolare del tratto gastrointestinale, era policlonale, mentre le lesioni diagnosticate come GIST erano monoclonali e i diversi tumori prelevati dallo stesso paziente derivavano da cloni indipendenti.

I meccanismi della progressione citogenetica e della segnalazione cellulare sono uguali nei GIST familiari e nei casi sporadici.

TRIADE DI CARNEY E SINDROME DI CARNEY-STRATAKIS

Carney^{105,106,107} identificò nel 1977 una piccola coorte di pazienti (7 giovani donne non imparentate) con una sindrome tumorale consistente in paraganglioma extra-surrenalico funzionante multicentrico, condroma polmonare e GIST epitelioidi multifocali dello stomaco (all'epoca definiti come leiomioidi gastrici). Per definire la sindrome è sufficiente la presenza di due dei tre tipi di neoplasia, evento che si verifica nel 78% dei casi descritti; la combinazione più frequente (53%) era di un GIST gastrico e un condroma polmonare. Solo il 22% dei pazienti presentano tutti i tre tipi di tumori, anche se i paragangliomi extrasurrenalici e i condromi polmonari si sviluppano molti anni dopo la comparsa dei GIST¹²².

Vi è una predominanza nel sesso femminile (85% dei casi) e l'età di presentazione è inferiore ai 30 anni.

Anche se non sono parte della triade iniziale, i tumori della corticale surrenale sono presenti nel 13% dei pazienti¹⁰⁷.

Esistono diversi dati pubblicati sullo stato mutazionale di KIT e PDGFRA, ma finora non sono state identificate mutazioni nei pazienti con la triade di Carney^{19,108,109}. Recentemente è stata dimostrata la presenza di perdita di funzione del complesso Succinato deidrogenasi-SDH nei casi di sindrome di Carney³²⁵.

I GIST nei casi di sindrome di Carney hanno caratteristiche simili a quelli pediatrici sporadici, che sono tipicamente localizzati nello stomaco, multifocali, epitelioidi e spesso caratterizzati da metastasi nei linfonodi regionali.

La sindrome rappresenta una malattia cronica, persistente e indolente; infatti dopo un follow-up medio di 20 anni l'81% dei pazienti sono ancora vivi¹⁰⁷.

Anche la sopravvivenza relativamente lunga dei pazienti con la triade di Carney, pur in presenza di metastasi linfonodali o epatiche, rispecchia la biologia dei GIST pediatrici sporadici; infatti la mortalità correlata alla malattia è solo del 13%²².

I tumori gastrici multipli presenti in questa associazione richiedono numerosi interventi chirurgici fino alla gastrectomia totale per ottenere la loro eradicazione. E' importante effettuare controlli periodici per tutta la vita di questi pazienti, dal momento che i tumori della triade possono insorgere dopo un lungo intervallo dalla diagnosi.

*Carney e Stratakis*¹¹⁰ hanno descritto nel 2002 una nuova sindrome familiare (Sindrome di Carney-Stratakis) coinvolgente 12 pazienti provenienti da cinque famiglie, affetti da paraganglioma del collo, mediastino o retroperitoneo e GIST multifocali gastrici. Anche in questa sindrome familiare sono state identificate mutazioni germinali della subunità SDH^{348, 374}.

A differenza della triade di Carney le lesioni erano ereditate con modalità autosomica dominante a penetranza incompleta, non vi erano differenze di incidenza tra i sessi e i pazienti non presentavano condromi polmonari.

NEUROFIBROMATOSI DI TIPO I (VON RECKLINGHAUSEN'S NEUROFIBROMATOSIS)

La neurofibromatosi di tipo I è una malattia ereditaria autosomica dominante, con una prevalenza di un caso ogni 3000 bambini nati vivi nei paesi occidentali¹¹⁵.

La sindrome è causata da mutazioni germinali ereditate o spontanee del gene NF localizzato nel cromosoma 17q11.2, che codifica per la neurofibromina, un gene soppressore tumorale^{116,117}.

Oltre ai multipli neurofibromi cutanei, i pazienti con NFI sviluppano lesioni cutanee (macchie caffè-latte, lentiggini ascellari), disordini neurologici (deficit cognitivi e convulsioni), neoplasie extra-intestinali (feocromocitomi, tumori del sistema nervoso centrale) e del tratto gastrointestinale (adenomi e adenocarcinomi

ampollari, somatostatinomi, paragangliomi gangliocitici, carcinomi colon-rettali e GIST^{111,112,113}).

L'associazione tra i GIST e la NFI è stata ampiamente dimostrata, ma la frequenza dell'evento non è completamente definita. In uno studio autoptico il 25% dei pazienti con NFI presentava GIST multipli, mentre gli studi clinici riportano un'incidenza del 5-25%^{111,118,119,120}.

Le lesioni sono multifocali, localizzate prevalentemente nell'intestino tenue, in presenza di iperplasia delle cellule interstiziali di Cajal; l'esordio è più precoce¹²¹. Circa il 15-20% dei GIST associati a NF1 sono clinicamente maligni (^{249, 114,331}). I tumori presentano le tipiche caratteristiche istologiche e immunoistochimiche dei GIST, ma nel 60% dei casi sono S100-positivi e circa l'85% possiedono fibre scheinoidi¹¹².

Le analisi molecolari hanno rivelato che la maggioranza dei GIST nella NFI non presentano mutazioni di KIT o PDGFRA^{112,113}, mentre nei GIST sporadici non è mai mutato NF1¹¹⁴. Verosimilmente i due diversi gruppi di tumori stromali si sviluppavano attraverso due meccanismi patogenetici mutualmente esclusivi.

Nel 2005 *Yantiss et al.*¹¹³ hanno rilevato in uno dei tre casi analizzati la presenza della mutazione puntiforme V559D nell'esone 11 di KIT (sostituzione della valina in 559 con l'acido glutammico), corrispondente a quella precedentemente riportata in due differenti studi di GIST multipli in pazienti con mutazioni di KIT germinali^{98,99}.

I più recenti studi condotti da *Miettinen et al.*¹²¹ e da *Maertens et al.*¹²² hanno confermato l'assenza di mutazioni di KIT o PDGFRA nei GIST associati a NFI e hanno dimostrato che l'evento molecolare è l'inattivazione somatica dell'allele wt della NF1 nel tumore. L'inattivazione della neurofibromina è un meccanismo alternativo all'iperattivazione della pathway della MAP-chinasi, mentre le vie di JAK-STAT3 e PI3K-AKT sono meno coinvolte a differenza dei GIST sporadici.

1.3 PATOGENESI MOLECOLARE

a) STRUTTURA E FUNZIONE DI c-KIT

L'oncogene virale v-Kit è stato identificato nel 1986 come il gene trasformante del virus del sarcoma felino Hardy-Zuckerman 4 (HZ4-FeSV)¹²⁷; poco dopo il suo omologo cellulare c-Kit è stato clonato e sequenziato¹²⁴.

Inizialmente descritto come prodotto dal locus murino W dominante determinante il pelo bianco nei topi^{123,134}, solo successivamente si è dimostrato che le mutazioni di kit erano la causa di tumori nell'uomo¹²⁸, in particolare GIST¹¹.

La glicoproteina transmembrana Kit, di 145 kDa, è codificata dal gene c-kit localizzato sul cromosoma 4q11-21 ed è un recettore tirosina-chinasi di terzo tipo (RTK), strutturalmente simile a “*platelet-derived growth factor receptors*” (PDGFRs) alfa e beta, a “*colony stimulating factor-1R*” (CSF-1R) e “*FMS-like tyrosine kinase 3*”(Flt-3)^{123,124,125}.

Questo recettore tirosina-chinasi (Fig.1.1) possiede caratteristiche uniche: un dominio extracellulare (EC) con il sito di legame per il ligando, costituito da cinque sequenze ripetute simili alle immunoglobuline e un dominio intracellulare tirosina chinasi (TK), suddiviso da una sequenza di variabile lunghezza in due regioni (TK-I e TK-II).

La struttura e la sequenza amminoacidica di Kit sono ben conservate nell'uomo, nei topi e nei ratti¹²⁹.

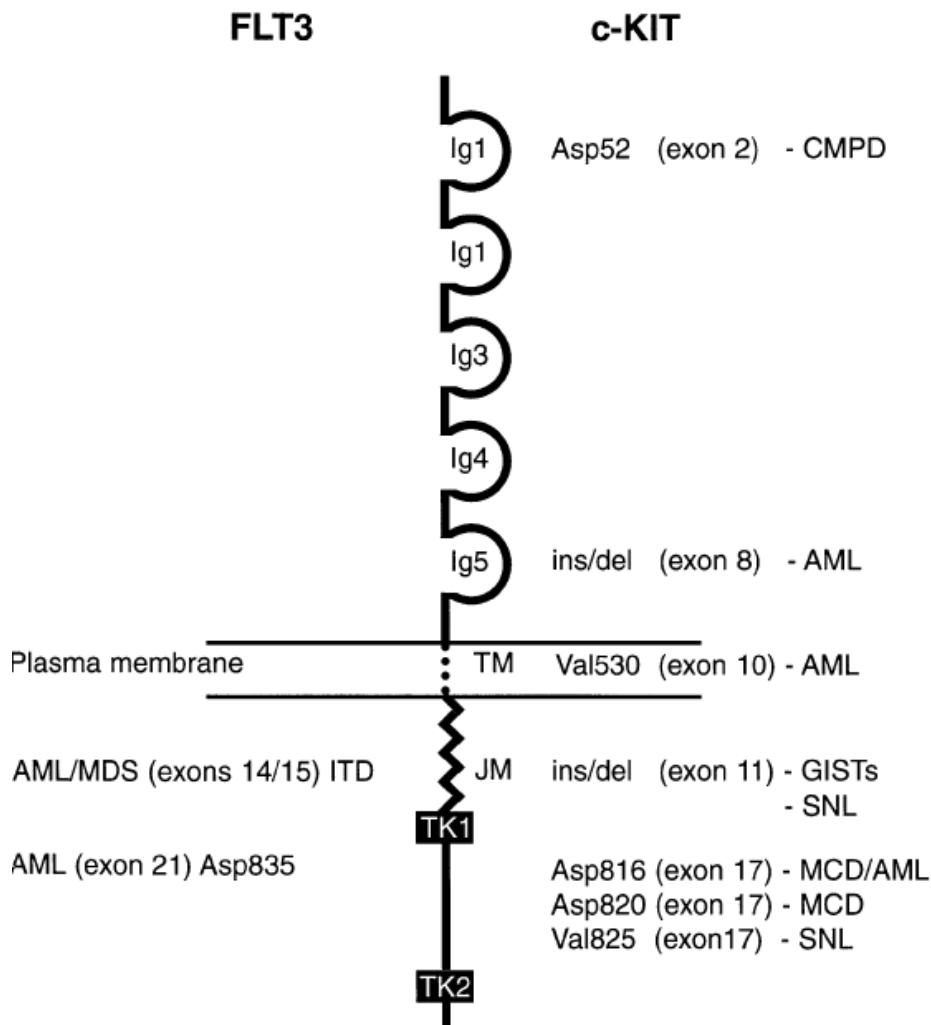


Figura 1.1 Struttura dei RTK di classe III con dominio extracellulare (Ig1-5), una singola regione transmembrana (TM), un dominio iuxtamembrana (JM) e due domini intracellulari chinasi (TK-I e TK-II). Sono inoltre indicate la posizione delle mutazioni nelle diverse patologie. CMPD, “chronic myeloproliferative diseases”; AML, “acute myeloid leukaemia; SNL, “sinonasal lymphomas”; MCD, “mast cell disease”; MDS, myelodysplastic syndrome.

La perdita di funzione di Kit, descritta nei topi mutanti W/W^v , dà anemia per ridotta produzione di eritrociti, il pelo bianco per la mancanza dei melanociti, sterilità per deplezione di cellule germinali in entrambi i sessi, mancanza di mastociti e di cellule interstiziali di Cajal.

La perdita completa dell’espressione di c-kit conduce a morte intrauterina o perinatale, per grave anemia.

Nel 1990 Witte¹³⁰ identificò il ligando di Kit (KitL), chiamato anche “stem cell factor” (SCF).

LA VIA DI TRASDUZIONE DEL SEGNALE

L'attivazione da parte di SCF induce la dimerizzazione di due recettori monomerici Kit, cui consegue l'innescò della attività intrinseca tirosina-chinasica, l'autofosforilazione delle tirosine di Kit e il legame con vari substrati (Fig. 1.2).

I residui tirosinici sono localizzati soprattutto all'esterno del dominio chinasico e funzionano da siti di legame per le molecole di trasduzione del segnale contenenti "Src homology 2" (SH2) o domini di legame per fosfotirosine (PTB).

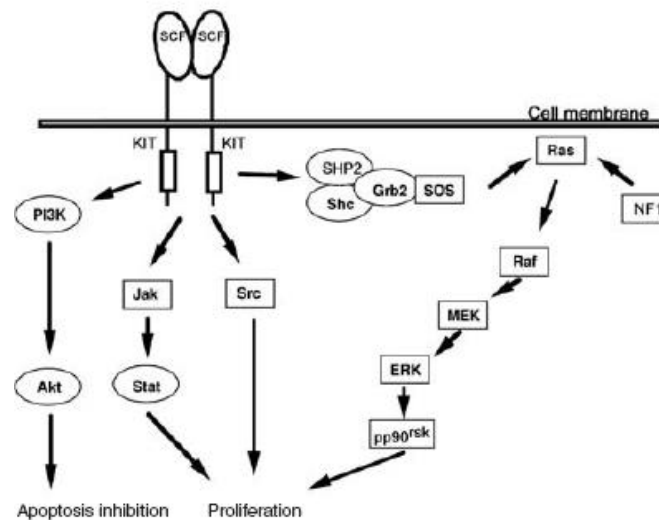


Figura 1.2 Vie di trasduzione del segnale di Kit¹²⁹

SCF è una proteina glicosilata transmembrana, che presenta due isoforme con o senza un particolare sito proteolitico; l'isoforma contenente il sito di clivaggio subisce la proteolisi e diventa solubile.

Le due isoforme dimostrano diversa capacità di trasduzione del segnale: la forma solubile conduce ad un'attivazione di c-kit rapida e transitoria, mentre quella associata alla membrana determina un'attivazione più prolungata. Inoltre la forma legata alla membrana induce un'attivazione di Erk1/2 e "mitogen-activated protein kinase" (MAPK) più persistente rispetto a quella del ligando solubile.

Le differenze di segnalazione potrebbero in parte derivare dal fatto che l'ancoraggio del ligando alla membrana previene l'internalizzazione del complesso ligando-recettore.

La "downregulation" dei recettori di membrana cellulare, indotta dal ligando è un importante meccanismo di regolazione della loro attività ed è mediata

dall'ubiquitina, che rende i recettori soggetti a internalizzazione e degradazione nei lisosomi.

L'internalizzazione di c-Kit è dipendente dalla proteina adattatrice Cbl, una ligasi E3 che lega covalentemente l'ubiquitina alle proteine bersaglio ed è attivata dalla fosforilazione in risposta alla stimolazione di SCF.

La fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K) è una classe di chinasi lipidiche che fosforila il gruppo idrossilico 3' del fosfatidilinositolo-4,5-bisfosfato (PIP2) producendo fosfatidilinositolo-3,4,5-trifosfato (PIP3). PIP3 è in grado di associarsi a proteine contenenti un dominio omologo (PH), determinando il loro ancoraggio alla membrana plasmatica dove possono essere attivate.

PI3K è costituita da una subunità regolatoria di 85 kDa e da una subunità catalitica di 110 kDa. La subunità regolatoria è associata con Kit attivato tramite un dominio SH2 ed è successivamente fosforilata a livello delle tirosine.

La subunità catalitica di PI3K attivato produce fosfatidilinositolo-3,4-bisfosfato, che è usato per la fosforilazione di Akt, una serina-treonina chinasi.

Il sistema PI3K/Akt è uno delle più importanti vie di trasduzione del segnale recettoriale. L'attivazione di PI3K indotta da c-Kit è implicata in fondamentali funzioni cellulari quali la mitosi, la differenziazione, l'adesione, la secrezione e la riorganizzazione dell'actina del citoscheletro.

C-Kit promuove la sopravvivenza cellulare tramite l'attivazione PI3K dipendente di Akt e la fosforilazione di Bad, una molecola pro-apoptotica; una via alternativa consiste nella fosforilazione-Akt mediata e inattivazione del fattore trascrizionale Fox O3a.

Un'altra via fondamentale di trasduzione del segnale di KIT è la cascata Ras/MAP chinasi.

Ras è una piccola proteina G che può oscillare tra la forma attiva legata a GTP e quella inattiva con GDP.

Kit attivato recluta SH2, contenente proteine quali Grb2, Shc e SHP2; Grb2 può legare Kit direttamente o indirettamente tramite l'interazione con Shc o SHP2.

Dal momento che Grb2 è costitutivamente associata a Sos, un fattore di scambio guanino nucleotidico che favorisce lo scambio di GDP con GTP, il reclutamento di Grb2 da Kit attivato risulta nella colocalizzazione di Sos e Ras e nella conseguente attivazione di Ras.

Questo promuove l'interazione di Ras con la serina-treonina chinasi Raf-1 e la successiva attivazione di MEK 1 e 2, una MAP chinasi chinasi.

MEK fosforila ERK, una MAP chinasi, che a sua volta trasloca nel nucleo, dove fosforila diversi fattori trascrizionali, incluso pp90^{tsk}.

Alternativamente Kit può anche attivare JNK chinasi, una MAP chinasi collegata alla risposta allo stress.

NFI, una proteina attivante le GTPasi, si ritiene coinvolta nella modulazione dell'attivazione Ras tramite il segnale di Kit; infatti la carenza di NFI che si verifica nella neurofibromatosi potrebbe indurre un aumento dell'attività della MAP chinasi.

Le “*Janus kinases*” (JAK) sono tirosina-chinasi citoplasmatiche che sono attivate tramite la stimolazione dei RTK dal ligando¹³¹. A valle delle JAK vi sono i “*signal transducers and activators of transcription*” (STAT), che sono fosforilati dalle JAK.

Gli STAT sono una classe di fattori trascrizionali costituiti da domini leganti il DNA, un dominio SH2 e un dominio transattivante carbossiterminale.

Successivamente alla fosforilazione delle tirosine, gli STAT dimerizzano tramite l'interazione delle fosfotirosine con i loro domini SH2 e quindi traslocano nel nucleo, dove regolano l'espressione di geni responsivi.

La via JAK/STAT è attivata dalla stimolazione di SCF, con una rapida e transitoria fosforilazione di JAK2. L'attivazione di c-kit conduce all'associazione fisica e all'attivazione di STAT1 α , STAT3, STAT5A e STAT5B.

La “*Src family kinase*” (SFK) prende il nome dal suo membro prototipo c-Src, che è l'omologo cellulare della proteina trasformante del virus del sarcoma di Rous, v-Src.

SFK comprende una serie di tirosina-chinasi, alcune espresse ubiquitariamente come Src, Yes e Fyn, altre presenti soprattutto nelle cellule emopoietiche, quali Lck, Hck, Fgr, Lyn¹³² e Blk.

La SFK è implicata in diverse funzioni cellulari, tra cui l'adesione, la chemiotassi, la sopravvivenza, la proliferazione e il traffico di proteine.

Il legame di SCF con c-kit conduce ad un rapido aumento dell'attività tirosina-chinasica di SFK.

L'attività tirosina-chinasica di c-Kit può essere inibita dalle "protein kinase C" (PKC), una famiglia di serina-treonina chinasi attivate dal diacilglicerolo liberato dalla via PI3K.

TUMORI ASSOCIATI AD ANORMALITA' DI KIT

L'anomala espressione di c-Kit è implicata in differenti malattie umane, in particolare tumorali.

Sono stati identificati circuiti autocrini con stimolazione autonoma costituiti dalla coespressione di SCF e c-kit in alcuni tipi di tumori, quali i microcitomi polmonari¹³³, il carcinoma colon-rettale¹³⁵, il carcinoma della mammella femminile¹³⁶, i tumori ginecologici, i neuroblastomi e i seminomi.

Mutazioni attivanti KIT sono presenti nei tumori delle cellule mastocitarie, nei GIST (sporadici e familiari) e nei tumori delle cellule germinali (Fig. 1.3). Nella maggioranza dei tumori le mutazioni attivanti sono localizzate vicino al sito di attivazione, cioè a livello di D816 nella seconda parte del dominio chinasico di c-kit (TK-II), mentre nei GIST la sede più frequente di mutazioni è la regione iuxtamembrana del recettore¹³⁷.

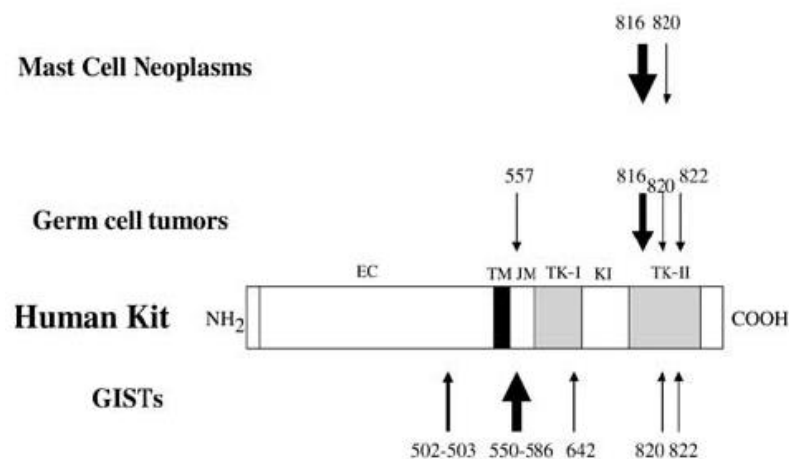


Figura 1.3 Mutazioni di Kit nelle neoplasie umane¹²⁹

Anche la perdita dell'espressione di c-kit è stata associata ad alcune forme tumorali, come il cancro tiroideo, il melanoma e il carcinoma mammario.

b) STRUTTURA E FUNZIONE DI PDGFRA

Il sistema “*platelet derived growth factor receptor*” (PDGFR)/ “*platelet-derived growth factor*” (PDGF) è costituito da due recettori, PDGFR α e PDGFR β , e quattro ligandi, PDGF-A, B, C e D.

I recettori sono composti da un dominio extracellulare per legare il ligando costituito da cinque regioni simili a immunoglobuline, da un singolo dominio transmembrana, da un dominio regolatore iuxtamembrana e da un dominio catalitico intracellulare.

PDGFR α e PDGFR β hanno in comune il 30% della sequenza amminoacidica¹³⁸ e sono membri della classe III dei RTK.

PDGFR α è codificato dal gene PDGFRA localizzato nella banda cromosomica 4q12 ed è trascritto come mRNA di 6,4 kb; PDGFR β è codificato da PDGFRB in 5q33 ed il suo messaggero è di 5,5 kb.

Dopo il clivaggio dei peptidi di segnale, i precursori proteici sono convertiti nel reticolo endoplasmatico nelle forme da 140 kDa (PDGFR α) e da 160 kDa (PDGFR β), quindi ogni recettore è glicosilato.

I quattro ligandi PDGF-A, B, C e D sono codificati da geni localizzati rispettivamente nelle bande cromosomiche 7p22, 22q13, 4q31 e 11q22.

Le isoforme A e B possono formare omodimeri o eterodimeri e le loro attività sono ben caratterizzate; invece sono poco conosciute quelle C e D.

PDGFR β è capace di legare fortemente PDGF-BB e DD omodimeri, ma debolmente gli eterodimeri AB e per nulla PDGF-AA.

PDGFR α lega gli omodimeri PDGF-A, B e C e gli eterodimeri AB con eguale affinità, ma scarsamente gli omodimeri DD.

I ligandi differenti sono capaci di indurre segnali diversi; ad esempio PDGF-AA e BB sono potenti mitogeni, ma solo BB trasforma i fibroblasti murini in vitro.

Queste diverse capacità di segnale e il fatto che l'espressione dei due recettori e dei quattro ligandi è regolata da un controllo indipendente conferiscono al sistema PDGFR/PDGF un alto grado di flessibilità combinatoria.

LA VIA DI TRASDUZIONE DEL SEGNALE

Il legame del ligando PDGF dimerico induce la dimerizzazione del recettore e i cambiamenti conformazionali che rendono possibile l'autofosforilazione di specifici residui di tirosina nei domini citoplasmatici (Fig.1.4).

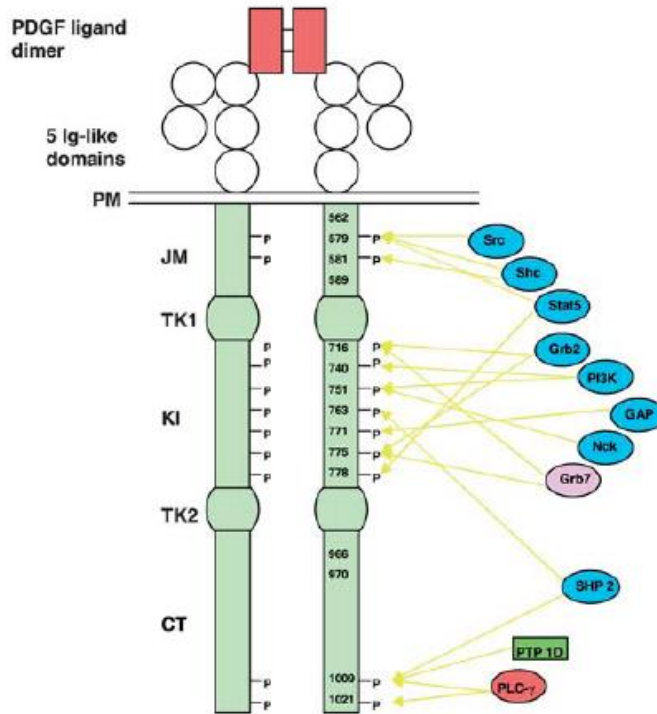


Figura 1.4 Vie di trasduzione del segnale di PDGFRA¹³⁸

Il legame specifico di molecole segnale intracellulari a queste tirosine fosforilate tramite SH2 o PTB promuove una cascata di segnalazione, culminante nel fenotipo indotto dal ligando¹³⁹.

Le molecole di trasduzione del segnale con attività enzimatica includono: PI3K, fosfolipasi C- γ (PLC- γ), SFK, la tirosina fosfatasi SHP-2 e “Ras GTP-activating protein” (GAP).

Le molecole adattatrici, che collegano il recettore attivato alle altre componenti, comprendono Grb2, Shc, Nck, Grb7 e Crk.

Gli STAT sono reclutati e fosforilati da PDGFR attivati, quindi migrano nel nucleo in forma dimerica e attivano direttamente la trascrizione di geni bersaglio.

Il reclutamento e la fosforilazione possono essere diretti, come nel caso di STAT1, o indiretti come con STAT3.

Esistono diversi meccanismi per limitare il segnale tradotto dalle tirosina-chinasi.

Il legame del ligando conduce inizialmente all'internalizzazione e degradazione del complesso ligando-recettore negli endo-lisosomi entro 30-60 minuti.

Secondariamente, i recettori attivati possono subire l'ubiquitinizzazione, che li rende pronti alla degradazione citoplasmatica nei proteosomi.

Infine, le tirosina-chinasi sono soggette a segnali di feedback negativi mediati da proteine come la "*protein tyrosine phosphatases*" (PTP) e la "*suppressor of cytokine signalling family*" (SOCS).

LE FUNZIONI NORMALI DEL PDGFR

La stimolazione di PDGF conduce ad una serie di risposte cellulari, tra cui l'aumento della mobilitazione del calcio, l'attivazione dello shunt degli esosi monofosfati e la promozione della segnalazione intercellulare inducendo la fosforilazione di proteine delle giunzioni serrate, la mitogenesi e la protezione dall'apoptosi.

L'espressione di PDGFRA è necessaria per la normale formazione delle cellule della cresta neurale ed è infatti rilevabile nelle cellule di Schwann del sistema nervoso periferico.

La transitoria espressione di PDGFRA nel tubo neurale nel punto di chiusura e da un estremo all'altro del mesoderma dirige la formazione di ossa, pelle, tessuto connettivo, cuore e muscolo.

Questa funzione di PDGFRA è stata ben caratterizzata nei topi naturalmente mutanti "*Patch*". I topi eterozigoti per una delezione completa del locus di PDGFRA hanno una macchia bianca sul tronco, dovuta al fallimento della migrazione dei melanociti verso la linea mediana durante lo sviluppo.

Al contrario degli eterozigoti che sviluppano normalmente il midollo spinale, un terzo degli omozigoti Patch sopravvive, ma manifesta una grave spina bifida occulta e anomalie craniofaciali, inclusa la palatoschisi¹³⁸.

Il sistema PDGF-A e recettore hanno un ruolo centrale nella differenziazione e/o sopravvivenza delle cellule di Leydig¹⁴⁰.

PDGFR β media il coinvolgimento e le risposte chemiotattiche dei monociti, macrofagi e piastrine nei tessuti infiammati ed è implicato nella regolazione della pressione interstiziale¹⁴¹.

I segnali di PDGFR β modulano la tensione tra le cellule e la matrice extracellulare, quella dei normali vasi sanguigni e delle malattie proliferative

vascolari. Le cellule della parete di vasi sanguigni danneggiati iperesprimono PDGFR β e sono indotte a proliferare, quindi questo recettore è implicato nella deposizione di placche aterosclerotiche.

TUMORI SOLIDI ASSOCIATI AD ANORMALITA' DI PDGFR

La coespressione di PDGFR e PDGF, che suggerisce un meccanismo di stimolazione autocrina, è stata descritta in un' ampia gamma di neoplasie maligne, quali il meningioma, il melanoma, il cancro mammario, ovarico, pancreatico, polmonare, prostatico, l'istiocitoma fibroso maligno dei tessuti molli, l'osteoblastoma, il glioblastoma e l'astrocitoma. Tuttavia il preciso ruolo svolto dai circuiti autocrini e paracrini PDGFR/PDGF nelle neoplasie non è ancora chiaro¹³⁸.

PDGFRA è amplificato e iperespresso in un gruppo di tumori gliali e nel medulloblastoma metastatico.

I ligandi PDGF sono iperespressi in molte neoplasie maligne, in particolare nel dermatofibrosarcoma protuberans (DFSP), una rara neoplasia dermatologica a lenta crescita di intermedia malignità¹⁴². La maggioranza dei casi di DFSP sono caratterizzati dalla presenza di una traslocazione tra le bande cromosomiche 17q12 e 22q13. Questa anormalità provoca la fusione del gene COL1A1 localizzato sul cromosoma 17, codificante la catena $\alpha 1$ del collagene, con PDGF-B sul cromosoma 22, così PDGF-B passa sotto il controllo del promotore di COL1A1 ampiamente espresso.

c) MUTAZIONI DI c-KIT E PDGFRA NEI GIST

Mutazioni di KIT sono identificate nel 75-80% dei GIST^{11,143,144,145,146} (Fig. 1.5); esse conducono a proteine KIT di lunghezza completa ma attivate indipendentemente dal ligando.

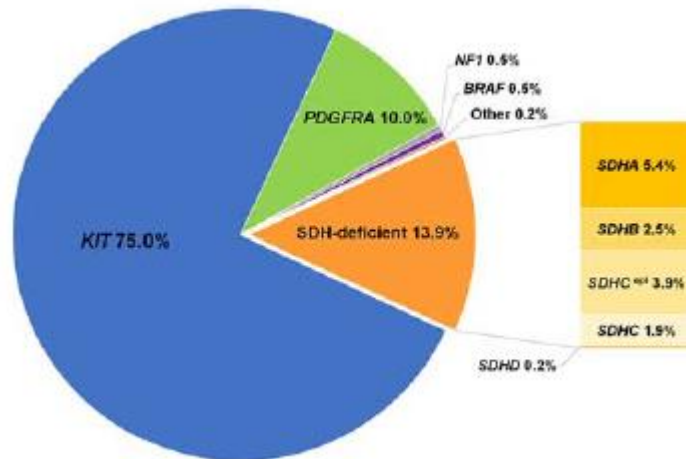


Fig. 1.5 Frequenza dei sottotipi molecolari di GIST³⁶⁵

KIT è costituito da un totale di 21 esoni, ma le mutazioni si raggruppano solo nei cinque esoni 9, 11, 13, 14 e 17 codificanti rispettivamente per il dominio extracellulare transmembrana, il dominio intracellulare iuxtamembrana, la prima porzione del dominio chinasi ("ATP binding site" o TKI per esoni 13 e 14) e il "kinase activation loop"(TKII) (Fig. 1.6).

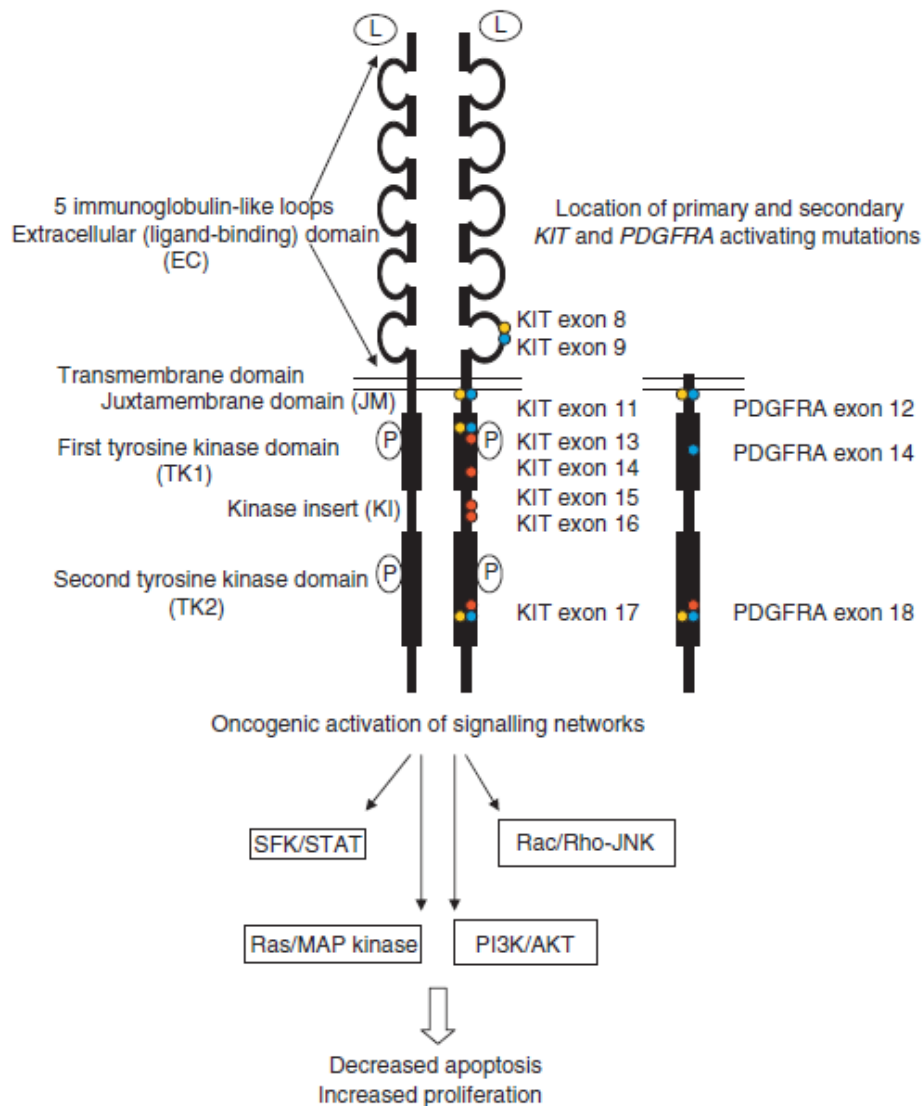


Figura 1.6 Sede delle mutazioni di KIT e PDGFRA, con i pallini blu sono indicate le mutazioni primitive, con quelli gialli e rossi le mutazioni secondarie (in corso di trattamento)³¹³

Le mutazioni più comuni sono a livello dell'esone 11, riscontrabili approssimativamente nel 60-70% dei GIST^{11,19,143,144,146}.

La regione iuxtamembrana di KIT (esone 11) inibisce la dimerizzazione del recettore in assenza di SCF e piccole delezioni "in-frame" e inserzioni o mutazioni puntiformi di questo dominio bloccano questa funzione, permettendo la dimerizzazione del recettore indipendentemente dal ligando^{155,156}.

Le mutazioni nell'esone 11 sono abbastanza eterogenee e i differenti tipi di mutazioni si raggruppano in diverse regioni: le delezioni e le inserzioni predominano nell'estremità 5' dell'esone, soprattutto nei codoni dal 557 al 559; le

mutazioni puntiformi sono identificate solo in quattro codoni, ovvero 557, 559, 560 e 576; mentre le duplicazioni sono localizzate nell'estremità 3' dell'esone.

Le mutazioni nell'esone 11 sono quasi esclusivamente osservate in GIST fusocellulari¹⁶⁷. La presenza di mutazioni nell'esone 11 di c-kit non correla con l'espressione di c-kit determinata tramite l'immunoistochimica, che può essere negativa per una bassa espressione della proteina o per difetti nell'epitopo recettoriale riconosciuto dal CD117¹⁵⁹.

Le mutazioni nell'esone 9 sono il secondo tipo più frequente e sono presenti almeno nel 10% dei casi^{147,148,149}. Tutte le mutazioni finora identificate nell'esone 9, con una sola eccezione, sono identiche e consistono in un'inserzione di sei nucleotidi, con la conseguente duplicazione dell'alanina 501 e della tirosina 502 (AY501-502); solo un caso in letteratura presenta una nuova duplicazione degli amminoacidi 506-508, fenilalanina-alanina-fenilalanina (FA506-508)¹⁴⁴. Si ritiene che le mutazioni nell'esone 9 blocchino un motivo di antidimerizzazione nel dominio extracellulare¹⁹. Il 95%¹⁴⁸ delle mutazioni nell'esone 9 sono identificate nei GIST dell'intestino tenue.

Le mutazioni nell'esone 13 sono presenti solo nell'1-4% dei GIST^{144,147,150,151} e sono esclusivamente mutazioni "missense", che determinano la sostituzione della lisina 642 con l'acido glutammico (K642E).

Le mutazioni nell'esone 17 sono ancora più rare, sono state rilevate in meno dell'1%^{144,146} dei GIST e consistono in sostituzioni "missense" a livello degli amminoacidi in posizione 820 (acido aspartico) e 822 (asparagina).

Diversi gruppi di autori^{157,158,159,167,168,170} hanno riportato un'associazione tra la presenza di mutazioni nell'esone 11 e comportamento clinico più aggressivo dei GIST.

Lo studio di *Taniguchi et al.*¹⁵⁸ condotto su 124 pazienti ha dimostrato che la presenza di una mutazione nell'esone 11 di KIT era correlata con recidiva di malattia e sopravvivenza inferiore (tasso di sopravvivenza a 5 anni 86 versus 49%).

*Lasota et al.*¹⁵⁹ hanno osservato mutazioni nell'esone 11 di c-kit nel 62% dei GIST definibili biologicamente maligni, mentre erano presenti solo nel 16% dei tumori a basso rischio.

Invece *Corless et al.*¹⁴³ hanno analizzato 13 GIST diagnosticati incidentalmente, di dimensioni inferiori al cm e privi di mitosi (categoria di rischio molto basso): il

76,9% avevano mutazioni nell'esone 11 dello stesso tipo di quelle riportate nelle forme ad alto rischio; quindi le mutazioni di KIT sono acquisite precocemente nello sviluppo dei GIST. Gli stessi autori hanno valutato la frequenza delle mutazioni nell'esone 11 in 275 GIST stratificati per rischio: nel gruppo a basso rischio la frequenza era di 87,1%¹⁹; risultati analoghi sono stati ottenuti in altri studi^{146,160}.

*Wardelmann et al.*¹⁶¹ e *Martin et al.*¹⁶² hanno dimostrato che una delezione dei codoni 557 (Triptofano) e 558 (Lisina) nell'esone 11 era associata ad un fenotipo maligno e allo sviluppo di metastasi; infatti questa delezione non si verificava mai nei GIST non metastatici e la sua identificazione è predittiva di rischio di metastasi, anche nei tumori a basso rischio secondo criteri istologici.

Il raggruppamento delle mutazioni a livello di Trp-557 e Lys-558 nei GIST metastatici indica una particolare importanza di questa regione per la funzione e l'attivazione recettoriale. I risultati degli studi di *Ma et al.*¹⁶³ hanno dimostrato che queste delezioni determinavano cambiamenti nella conformazione ad alfa-elica di questo dominio cui conseguiva la perdita del controllo inibitorio sull'attività chinasi del recettore privo di ligando.

*Singer et al.*¹⁵⁷ hanno dimostrato che le mutazioni *missense* nell'esone 11 hanno una prognosi più favorevole rispetto agli altri tipi di mutazione (tasso di sopravvivenza libera da malattia a 5 anni del 89% versus 40%); mentre i pazienti con delezioni e inserzioni nello stesso esone hanno un tasso di sopravvivenza libera da malattia a 5 anni del 37% versus 63% di tutti gli altri casi.

Gli studi di *Lasota et al.*¹⁵⁰ e *Antonescu et al.*¹⁴⁸ hanno rilevato un'associazione tra mutazioni nell'esone 9 e comportamento clinico più aggressivo, mentre i lavori di *Sakurai et al.*¹⁶⁴ e *Hirota et al.*¹⁴⁹ non hanno dimostrato la correlazione né con la sede non gastrica né con la prognosi sfavorevole.

Anche i rari casi di GIST con mutazioni dell'esone 13 di KIT sono istologicamente e clinicamente maligni¹⁵⁰.

Uno studio recente di *Kim et al.*¹⁶⁹ ha dimostrato che la presenza di mutazioni di Kit, insieme con un alto indice mitotico e considerevoli dimensioni tumorali, è un fattore indipendente di prognosi sfavorevole in pazienti con GIST localizzati.

Anche il lavoro di *Liu et al.*¹⁷⁰ ha riportato che i GIST con mutazioni di KIT sono di dimensioni maggiori, invadono più frequentemente i tessuti adiacenti, hanno un indice mitotico superiore e maggiore necrosi, manifestano più spesso recidive

locoregionali e a distanza e hanno una mortalità superiore rispetto ai tumori KIT *wild-type*.

E' stato ipotizzato che la progressione verso la malignità dei GIST potrebbe essere correlata all'accumulo di mutazioni secondarie in KIT.

A questo riguardo i dati riportati in letteratura sono discordanti, *Corless et al.*¹⁴⁴ hanno analizzato gli esoni 9, 11, 13 e 17 di KIT in 127 GIST maligni e non hanno individuato più di una singola mutazione.

I risultati dei lavori di *Lasota et al.*¹⁵⁹ in tre casi e *Antonescu et al.*¹⁴⁸ in 11 casi dimostrano che lo stato mutazionale in campioni tumorali consecutivi ricavati dallo stesso paziente rimane identico nelle differenti recidive.

Contrariamente, *Andersson et al.*¹⁶⁵ hanno individuato in sei casi su nove una o due mutazioni aggiuntive negli esoni 14 e 15 di KIT (dominio intracellulare), oltre alla mutazione primaria dell'esone 11.

*Sakurai et al.*¹⁶⁴ hanno identificato mutazioni differenti in campioni diversi dello stesso paziente.

*Vu et al.*¹⁶⁶ hanno riportato un caso di GIST duodenale ricorrente, in cui è stata identificata una nuova mutazione nell'esone 13 nella recidiva tumorale in aggiunta a quella presente nell'esone 11 nella lesione primitiva.

La presenza di mutazioni secondarie nei GIST, indipendenti dalla resistenza farmacologica, rimane quindi oggetto di discussione.

Il 5-10% dei GIST presenta mutazioni del gene PDGFRA^{15,16,152} (Tab. 1.2) a livello degli esoni 18 (82,5% dei casi), 12 (13,7%) e 14 (3,7%) che sono omologhi rispettivamente degli esoni 17, 11 e 13 di KIT.

Le mutazioni di PDGFRA, in analogia a quelle di KIT, conducono ad un'attivazione chinasi indipendente dal legame con il ligando; studi preliminari dimostrano che la segnalazione a valle del recettore è simile nei GIST con mutazioni attivanti di KIT o PDGFRA¹⁵.

*Heinrich et al.*¹⁵ hanno individuato mutazioni di PDGFRA nel 35% dei GIST KIT-*wild-type*, mentre *Hirota et al.*¹⁶ nel 62,5% dei tumori senza mutazioni di KIT.

Il tipo più comune di mutazione è la sostituzione in posizione 842 dell'esone 18 dell'acido aspartico con la valina (D842V), rilevata nel 62,6%^{37,152} di tutte le mutazioni di PDGFRA. Le mutazioni di PDGFRA sono correlate a GIST gastrici di istotipo epitelioide o misto^{167,218}.

Tabella 1.2 Mutazioni di PDGFRA nei GIST¹⁵²

MUTAZIONE	NUMERO DI CASI RIPORTATI
ESONE 12	
V651D	18
Del RV560-561	1
Del RVIES560-564	1
Ins ER561-562	1
SPDGHE566-571R	2
SPDGHE566-571K	3
Ins YDSRW582-586	1
ESONE 14	
N659K	3
ESONE 18	
D842V	181
D842Y	6
D842I	1
DI842-843IM	1
D846Y	2
Y849C	3
Del D842	1
Del I843	1
Del RD841-842	1
Del DIM842-844	4
Del DIM842-845	29
Del IMHD843-846	13
Del MHDS844-847	1
RD841-842KI	1
DIMH842-845A	1
DIMH842-845V	1
DIMHD842-846E	3
DIMHD842-846S	1
DIMHD842-846N	1
DIMHD842-846G	1
IMHDS843-847T	3
IMHDS843-847M	1
HDSN845-848P	1

I GIST presentanti mutazioni negli esoni 12 e 18 di PDGFRA hanno un indice mitotico inferiore a 5 mitosi/50 HPF nel 81% dei casi¹⁷² ed un decorso clinico benigno nell'83,5% dei pazienti (follow-up medio di 135 mesi).

*Lasota et al.*¹⁷¹ hanno recentemente riportato che i GIST con mutazioni nell'esone 14 di PDGFRA sono caratterizzati da un decorso clinico favorevole con dati di

follow-up a lungo termine (in media 235,5 mesi), nonostante la metà di essi siano stati inizialmente classificati ad alto potenziale maligno secondo *Miettinen et al.*²⁵. Le mutazioni di KIT e PDGFRA sono mutualmente esclusive e dai primi studi di espressione genica di *Subramanian et al.*¹⁵³ e di *Antonescu et al.*¹⁵⁴ emergono significative differenze nei pattern di espressione genica dei GIST KIT o PDGFRA mutanti.

L'espressione immunohistochimica del CD117 è osservabile nel 95% dei GIST KIT-mutati, mentre fino al 40% dei GIST PDGFRA-mutati sono negativi o debolmente positivi¹⁵².

Circa il 10-15%³⁷ dei GIST sono privi di mutazioni sia di KIT, sia di PDGFRA (Tab. 1.3) e la maggioranza di questi casi hanno una inattivazione funzionale del complesso succinato-deidrogenasi (SDH) o mutazioni di NF1 o di BRAF. Tale condizione è più frequente nei casi pediatrici e nei GIST associati a sindrome NF1.

Tabella 1.3 Correlazioni patologiche dello stato mutazionale nei GIST³⁷

TIPO DI MUTAZIONE	FREQUENZA	TIPO ISTOLOGICO	SEDE ANATOMICA
<u>MUTAZIONI DI KIT</u>	80%	fusocellulare	
esone 9	10%		intestino tenue
esone 11	60-70%		
esone 13	1%		
esone 17	<1%		
<u>MUTAZIONI DI PDGFRA</u>	5-10%	epitelioide o misto	stomaco
esone 12	1%		
esone 14	<1%		
esone 18	6%		
<u>WILD-TYPE</u> (assenti mutazioni di KIT e PDGFRA)	10%	fusocellulare	

L'analisi mutazionale dei geni KIT e PDGFRA rappresenta un parametro sia prognostico sia di predizione di risposta alla terapia con farmaci inibitori dei

recettori ad attività tirosin chinasi. Nonostante la sempre maggiore importanza rivestita dallo stato mutazionale nella valutazione della risposta ai diversi trattamenti utilizzati per i GIST, attualmente tale dato non è ancora inserito in alcuna classificazione del rischio.

d) MUTAZIONI DELLA PROTEINA DELLA NEUROFIBROMATOSI 1 (NF1), DI KRAS E BRAF NEI GIST

Una piccola quota di GIST derivano da inattivazione mutazionale di NF1 o dall'attivazione mutazionale di RAS o BRAF^{331,284, 335,286,302}. Ciascuno di questi meccanismi alternativi mutazionali conduce ad una attivazione costitutiva delle vie di RAS/RAF/MEK, in modo analogo ai GIST con mutazioni di KIT e PDGFRA. Alcuni studi ipotizzano che siano necessarie mutazioni doppie per ricapitolare il segnale a monte mediato da KIT/PDGFRA: una attivante le vie RAS/RAF/MEK e l'altra attivante le pathway PI3K/AKT/mTOR^{369,284}.

Nel 2008 il gruppo di Agaram²⁴⁷ ha per primo identificato una mutazione identica in BRAF (V600E) in un piccolo gruppo di GIST KIT/PDGFRA WT. I GIST BRAF mutati dimostrano una predilizione per la sede intestinale. Uno studio pubblicato quest'anno³⁰² ha dimostrato una frequenza di mutazione di BRAF solo nel 3,9% dei casi di GIST WT, inferiore a quella riportata nei lavori precedenti compresa tra il 2 ed il 13%^{246,298,323, 335, 356, 357, 381}. Tutte le mutazioni descritte in letteratura sono esclusivamente rappresentate dalla sostituzione V600E ed infatti è stato riportato come l'utilizzo in immunistochemica dell'anticorpo anti VE1 (specifico per tale mutazione) abbia una specificità molto alta (97,5%) ed una alta sensibilità (81,8%) nel predire lo stato mutazionale³⁰². L'immunocolorazione anti-VE1 potrebbe quindi essere utilizzata come un marker surrogato della mutazione in BRAF, da usare prima dell'effettuazione dell'analisi molecolare.

La maggioranza dei GIST BRAF mutati hanno una categoria di rischio intermedio o alto sec. Miettinen³²⁹, solo nello studio di Huss³⁰² è stata descritta una predominanza di categorie di rischio basso o assente.

Nella maggior parte dei casi le mutazioni in BRAF e KIT/PDGFRA sono mutualmente esclusive: solo in rarissime lesioni (un caso su 53, 2%) sono state descritte mutazioni contemporanee di KIT e BRAF³³⁵.

Più recentemente è stata descritta la presenza di mutazioni di KRAS a livello dei codoni 12 e 13 in casi di GIST KIT o PDGFRA mutati³³⁵: lo studio consisteva di due coorti di GIST testate indipendentemente a Locarno e Milano tramite amplificazione in PCR standard e sequenziamento diretto Sanger dei prodotti PCR. Nella coorte di Locarno sono stati identificati 3 casi KRAS mutati su un totale di 60 tumori analizzati (5%). Nello studio successivo di Lasota³¹⁴ non è stata invece evidenziata nessuna mutazione di KRAS su una grande coorte di 514 GIST analogamente a quanto riportato da altri lavori (Tab. 1.4), a dimostrazione del fatto che se tali mutazioni siano presenti sono comunque estremamente rare.

Tab. 1.4 Studi precedentemente pubblicati che non hanno dimostrato la presenza di mutazioni di KRAS nei GIST³¹⁴

Table 1 Previously published studies that have failed to detect KRAS mutations in GISTs

<i>Study</i>	<i>Country</i>	<i>No. of tumors</i>	<i>Mutation detection method</i>
Agaimy <i>et al</i> ¹⁵	Germany, Switzerland	69 (49 patients)	Nested PCR Sanger sequencing
Martinho <i>et al</i> ¹⁶	Portugal	26	Standard PCR Single strand conformation polymorphism
Daniels <i>et al</i> ¹⁷	Germany, The Netherlands	78	Multiplex PCR Single nucleotide probe extension assay
Origone <i>et al</i> ¹⁸	Italy	81	Nested PCR Sanger sequencing

I GIST con mutazioni in BRAF, NF1 e KRAS sono biologicamente analoghi a quelli KIT/PDGFRA mutati, infatti condividono gli stessi meccanismi di progressione genetica.

e) GIST CON PERDITA DI FUNZIONE DEL COMPLESSO SUCCINATO DEIDROGENASI (SDH)

La maggioranza dei GIST privi di mutazioni in KIT/PDGFRA/NF1 derivano da alterazioni con perdita di funzione del complesso SDH, un complesso enzimatico coinvolto nel ciclo dell'acido citrico e nella catena del trasporto elettronico. Il complesso SDH è costituito dalle proteine codificate dai geni SDHA, SDHB, SDHC e SDHD e la perdita di funzione di una qualsiasi di queste quattro componenti si traduce in una perdita dell'espressione di SDHB³⁰³. L'inattivazione della subunità è mediata da mutazioni dei geni codificanti la subunità (in circa

l'80% dei casi) o da metilazione del promotore di SDHC con la corrispondente inattivazione epigenetica del gene (circa il 20% dei casi)^{293,258}. Nei pazienti con GIST SDHA è la subunità più frequentemente mutata, ma talora possono essere coinvolte anche le subunità SDHB, C, D.

I GIST con alterazioni di SDH sono caratterizzati da alcuni elementi distintivi rispetto a quelli KIT/PDGFRΑ mutati: insorgono quasi esclusivamente nello stomaco e mostrano istotipo epitelioide o misto²⁷⁶. Costituiscono infatti circa il 7,5% dei GIST gastrici³³². Tali tumori hanno inoltre una predilezione per i bambini (soprattutto bambine nella seconda decade) ed i giovani adulti. Il pattern di crescita è tipicamente multilobulare o plessiforme con nidi di cellule tumorali separate da setti di muscolatura liscia. L'indagine immunohistochimica con anticorpi anti-SDHB (normalmente espressa in modo ubiquitario) dimostra una perdita di espressione nelle cellule tumorali e in presenza di negatività per SDHA indica una sottostante mutazione di SDHA, al contrario la positività per SDHA è osservata nei casi con mutazioni o metilazione di SDHB, SDHC e SDHD.

La perdita di funzione di SDH è riscontrata nei GIST parte della triade di Carney³²⁵ e della sindrome di Stratakis-Carney, quest'ultima presentante mutazioni germinali della subunità SHD^{348, 374}. Queste due sindromi insieme però costituiscono solo una minoranza (10-20%) dei casi di GIST con alterazioni di SDH³³³.

Questo gruppo di GIST esprime KIT attivato ma non è chiaro il meccanismo della sua attivazione. Inoltre non mostrano la canonica serie di delezioni citogenetiche che caratterizzano i GIST con le mutazioni classiche (KIT/PDGFRΑ/NF1)³⁰⁴. Nonostante abbiano una tendenza alla diffusione linfatica con occasionali metastasi linfonodali e alla multifocalità, i GIST con alterazioni di SDH hanno di solito un andamento clinico cronico indolente³²⁴.

Queste caratteristiche morfologiche e genomiche evidenziano come questi casi rappresentino un sottogruppo biologicamente differente dai GIST con mutazioni in KIT/PDGFRΑ/NF1.

Uno studio recente³²⁴ in 76 GIST con alterazioni di SDH ha dimostrato come le classificazioni di rischio convenzionali non si applichino a questo sottogruppo di neoplasie, in quanto non riescono a predire la progressione di malattia. È quindi necessaria l'elaborazione di nuove categorie di rischio per questo tipo di tumori.

f) PROGRESSIONE TUMORALE

Mentre l'attivazione di KIT o PDGFRA costituisce probabilmente un evento precoce nella patogenesi dei GIST, sono necessari per la progressione tumorale cambiamenti secondari, presenti solo in un sottotipo di cellule neoplastiche (Fig. 1.7).

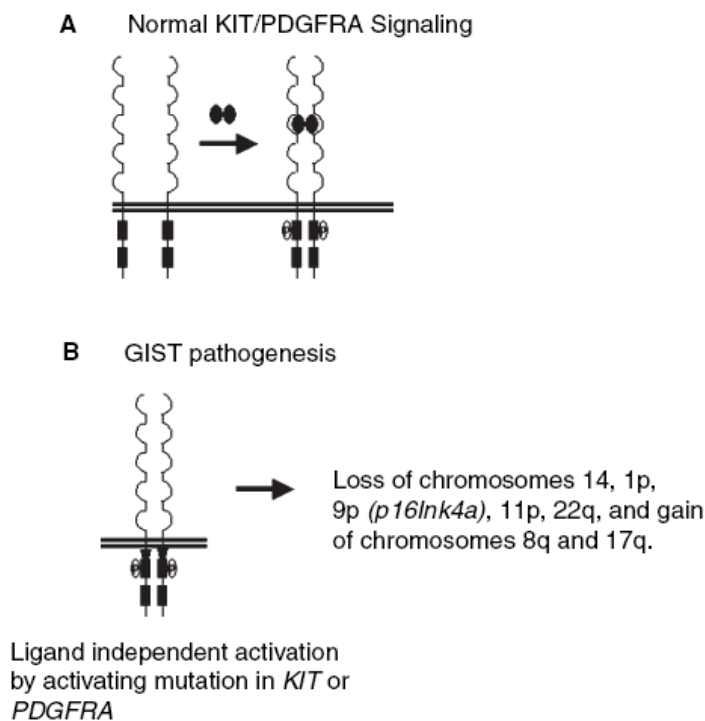


Figura 1.7 Via di segnalazione di KIT/PDGFRA normale e patologica

Infatti la maggior parte dei microGIST (tumori con diametro ≤ 1 cm), molto comuni nella popolazione generale, possiedono già mutazioni di KIT o PDGFRA ma dimostrano un potenziale di progressione maligna estremamente basso.

I GIST tendono ad avere cariotipi relativamente semplici rispetto alle altre neoplasie fusocellulari di grado istologico simile.

Dagli studi condotti sulla progressione citogenetica sembra che la maggioranza dei GIST si sviluppino mediante un graduale accumulo di aberrazioni cromosomiche.

Le alterazioni citogenetiche più comuni sono la perdita del cromosoma 14 dimostrata nel 60-70% dei GIST, e la perdita del cromosoma 22q nel 50% dei

casi, che è associata con la progressione da una lesione borderline ad una maligna^{15,145,173,174,177}.

Generalmente la duplicazione di materiale cromosomico corrisponde ad amplificazione di oncogeni e le delezioni a perdita di geni soppressori tumorali.

Le delezioni di 1p, 9p, 11p e 15q sono meno frequenti delle precedenti, ma più significativamente correlate con la malignità. L'inattivazione genomica progressiva dei geni di oncosoppressori tumorali localizzati in questi specifici cromosomi è probabilmente responsabile della progressione genomica (Fig. 1.8).

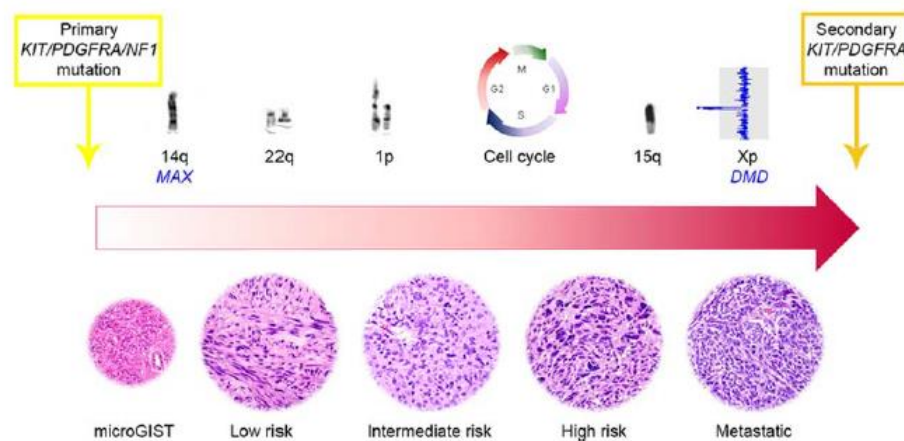


FIGURE 4. Model of gastrointestinal stromal tumor (GIST) genomic progression. Primary *KIT*, *PDGFRA* or *NF1* mutations represent the initiating oncogenic driver events in most GISTs and are followed by stepwise accumulation of chromosomal aberrations, harboring putative tumor suppressor genes, and cell cycle dysregulating events. Metastatic GISTs develop treatment resistance through evolving tyrosine kinase inhibitor-resistant subclones with additional secondary *KIT* or *PDGFRA* mutations.

Fig. 1.8 Modello di progressione genomica nei GIST³⁶⁵

In particolare la perdita di 9p è associata a comportamento aggressivo/maligno¹⁷⁷, e sembra correlata con la delezione del gene soppressore tumorale p16INK4a (p16), che è deleta in diverse neoplasie^{175,176}. P16 blocca le cellule nella fase G1 del ciclo cellulare inibendo l'attività chinasi delle chinasi ciclina-dipendenti (CDK) 4 e 6, mantenendo quindi la forma attiva nonfosforilata della proteina soppressore tumorale retinoblastoma (RB) e il blocco della formazione dei complessi CDK4/6-ciclina D (necessari per il passaggio alla fase S).

Gli studi di immunohistochimica di *Schneider-Stock et al.*¹⁷⁸ e *Ricci et al.*¹⁷⁵ hanno dimostrato che i GIST p16-negativi hanno una prognosi peggiore di quelli p16-positivi.

L'acquisizione di 5p e 20q è presente più frequentemente nei GIST primitivi ad alto rischio e metastatici, invece quella di 8q e 17q solo nei tumori con comportamento metastatico¹⁷⁷.

Uno schema semplificato dell'acquisizione di difetti genetici nell'oncogenesi dei GIST è il seguente: mutazione di KIT → delezione di 14q → delezione di 22q → delezione di 1p → amplificazione di 8p → delezione di 11p → delezione di 9p → amplificazione di 17q¹⁴⁵.

Le perdite dei cromosomi 14q e 22q sono frequentemente osservate nei GIST a basso rischio e quindi verosimilmente sono eventi precoci nella progressione tumorale.

Recentemente è stato dimostrato che il gene oncosoppressore tumorale localizzato in 14q è "Myc-associated factor X" (MAX), un fattore trascrizionale che si lega a MYC^{366,257}. L'inattivazione omozigote di MAX tramite delezioni intrageniche o mutazioni mononucleotidiche è stato osservato in circa il 20% dei casi KIT, PDGFRA, NF1 mutati. Questi studi hanno dimostrato come l'inattivazione di MAX sia presente anche nei microGIST, nei casi a basso rischio e nei campioni metastatici. Tali risultati indicano quindi che l'inattivazione di MAX sia un evento precoce nella progressione dei GIST, che a sua volta determina l'inattivazione di p16.

L'inattivazione della distrofina, codificata dal gene DMD in Xp21.1, si verifica invece come evento tardivo nella progressione tumorale ed è presente in più del 90% dei GIST metastatici³⁸². Infatti DMD inibisce fisiologicamente la migrazione cellulare e l'indipendenza dall'ancoraggio e la sua down-regolazione favorisce ovviamente la diffusione metastatica.

1.4 CARATTERISTICHE PATOLOGICHE E DIAGNOSI

a) ISTOLOGIA E STRATIFICAZIONE DEL RISCHIO

I GIST presentano dimensioni variabili da meno di 10 mm a maggiori di 350 mm, la media è approssimativamente 50 mm¹⁷; generalmente la dimensione correla con l'aggressività biologica¹⁸.

Crescono entro la tonaca muscolare propria del tratto gastrointestinale, sono spesso ben circoscritti e provvisti di pseudocapsula.

La crescita può essere: endofitica con necrosi e ulcerazione della mucosa, esofitica, verso la cavità addominale o a “*dumbbell*”(manubrio per ginnastica) sia verso la sierosa che verso la mucosa⁷.

Nelle lesioni più grandi possono essere presenti aree centrali di degenerazione cistica, emorragia o necrosi.

Si distinguono in base alla morfologia cellulare i sottotipi fusocellulare nel 70%, epitelioidi nel 20%, misto nel 10% e pleomorfo nel 2% dei casi^{19,26}.

I GIST fusocellulari (Fig.1.9) sono tumori tipicamente ad alta cellularità, spesso basofili per l'alta densità nucleare e lo scarso citoplasma; è comune una vacuolizzazione perinucleare, tipica dei tumori del muscolo liscio.

Le forme del colon e del retto sono quasi sempre a cellule fusate.

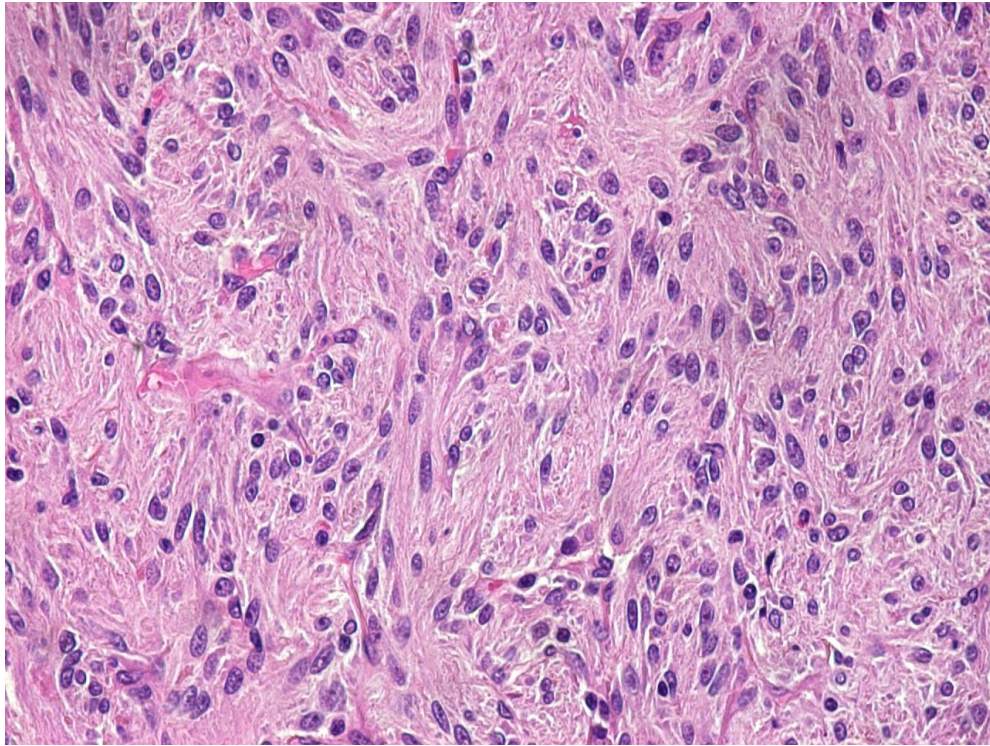


Figura 1.9 GIST fusocellulare (ematossilina-eosina)

I GIST epiteliodi (Fig. 1.10) sono più comuni nello stomaco, dove costituiscono approssimativamente un terzo di tutti i GIST²²; inoltre sono presenti nell'omento e come tumori intra-addominali disseminati di origine indefinita.

L'atipia nucleare e la multinucleazione è più frequente nei GIST epiteliodi ed è spesso accompagnata da altre caratteristiche di malignità³⁷; a livello dello stomaco sono comuni cellule multinucleate "*floret type*"²⁵.

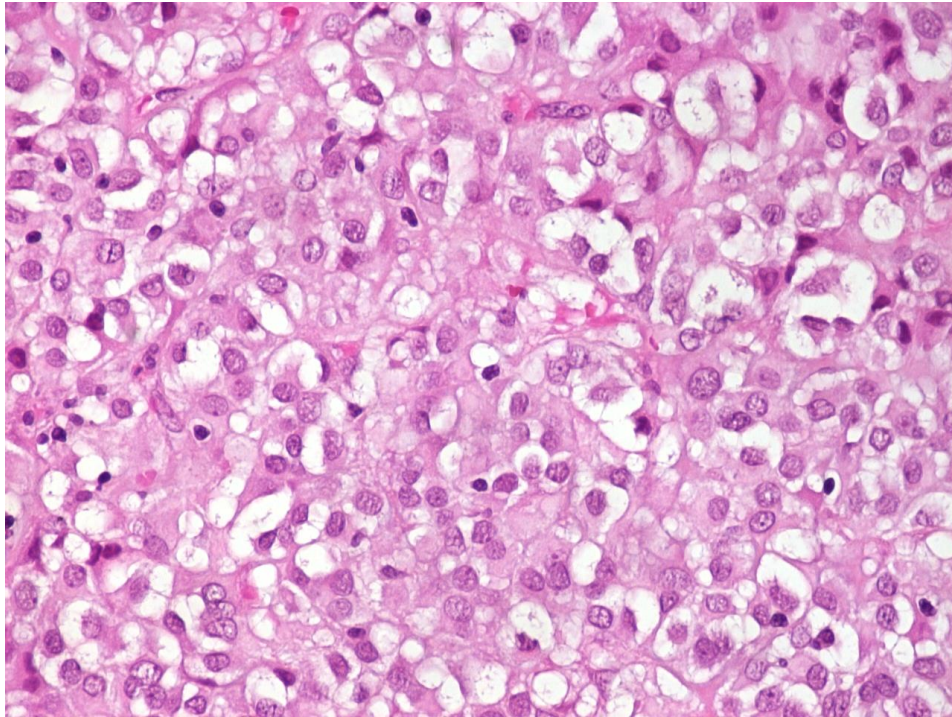


Figura 1.10 GIST epitelioidi (ematossilina-eosina)

I GIST di tipo misto possono presentare una brusca transizione tra aree con cellule fusate e quelle con cellule epitelioidi oppure in alternativa i due tipi sono frammisti²⁷.

Nel 10-20%²⁰⁻²¹ dei casi, soprattutto nell'intestino tenue e nel colon, sono presenti aggregati circolari di fibre collagene extracellulari eosinofile PAS positive chiamate fibre schenoidi, indicative di differenziazione neurale.

Esiste una rara variante a cellule ad anello con castone²³ (Fig. 1.11), probabilmente dovuta ad alterazioni metaboliche degenerative, che deve essere distinta dai carcinomi primari e metastatici mucinosi e dagli altri tipi di neoplasie con cellule chiare o ad anello con castone.

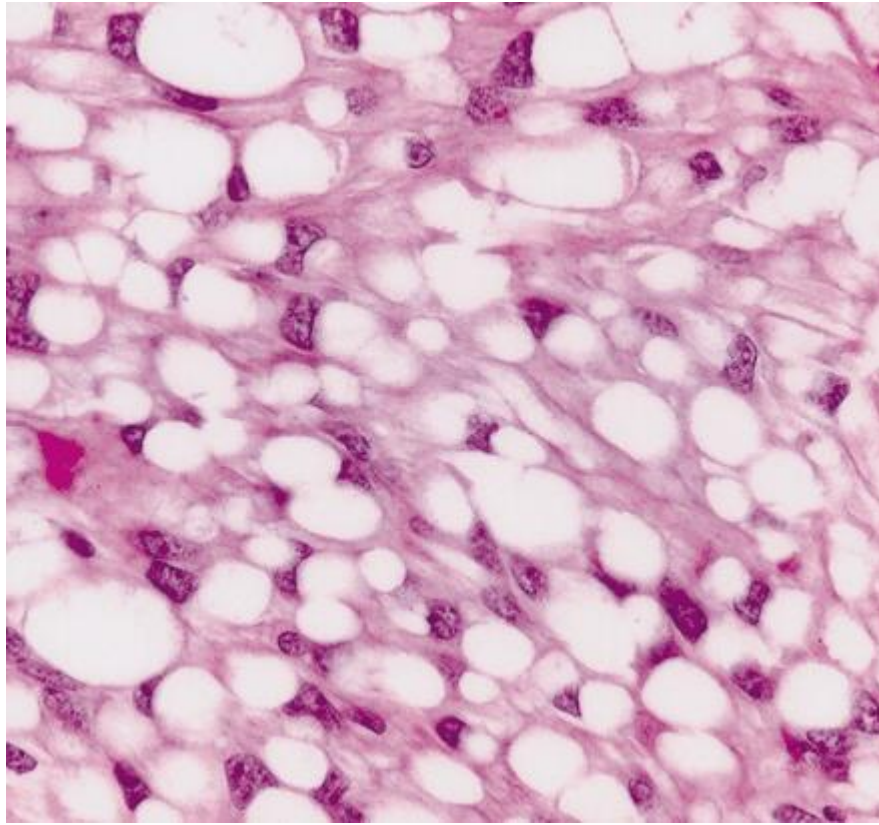


Figura 1.11 GIST variante ad anello con castone (ematossilina-eosina)

I criteri per distinguere i GIST benigni da quelli maligni, o almeno per identificare quelle lesioni con maggiore probabilità di metastatizzare, sono stati cercati, analizzati e discussi per molti anni. Fattori quali l'invasione della mucosa, la necrosi tumorale e l'alta cellularità hanno dimostrato una associazione statisticamente significativa con il comportamento maligno in alcuni studi, ma le caratteristiche morfologiche risultate maggiormente predittive di prognosi sono l'indice mitotico e la dimensione tumorale^{20,26,61}.

Tuttavia i GIST sono stati definiti tumori a potenziale maligno incerto, perché anche le lesioni molto piccole (<2 cm) e quelle con indice mitotico molto basso (<5/50 HPF "*High Power Fields*" o campi ad alto ingrandimento) occasionalmente metastatizzano; sono state riportate recidive fino a 20 anni dopo la resezione chirurgica³.

Da studi di follow-up prolungati è emerso che quasi ogni GIST che si presenta con sintomi o segni clinici può comportarsi in modo maligno. Quindi sembra più prudente sviluppare uno schema basato sulla valutazione del rischio, piuttosto che cercare di definire criteri rigidi per separare i GIST benigni da quelli maligni.

Abitualmente la definizione della prognosi dei GIST è basata sulla dimensione tumorale e sull'indice mitotico per la stratificazione del rischio di comportamento clinico aggressivo dei GIST primitivi.

Questa classificazione pubblicata da *Fletcher et al.*²⁶ (basata sul GIST workshop tenuto al “National Institutes of Health-NIH” nel 2001) prevede quattro categorie di rischio di comportamento maligno: molto basso, basso, intermedio e alto (Tab. 1.5).

Tabella 1.5 Linee guida per la definizione del rischio di comportamento aggressivo nei GIST²⁶

RISCHIO	DIMENSIONE (cm)¹	INDICE MITOTICO² (num mitosi/50 HPF)
MOLTO BASSO	<2	<5
BASSO	2-5	<5
INTERMEDIO	<5	6-10
	5-10	<5
ALTO	>5	>5
	>10	qualsiasi indice mitotico
	qualsiasi dimensione	>10

NOTE: 1- la dimensione rappresenta il diametro singolo maggiore.

2- idealmente l'indice mitotico dovrebbe essere standardizzato secondo la superficie di area esaminata (basata sulla dimensione degli “*High Power Fields*”), ma non ci sono definizioni convalidate a questo riguardo. Nonostante l'inevitabile soggettività nel riconoscimento delle mitosi e la variabilità nell'area dei “*High Power Fields*”, l'indice mitotico si dimostra utile.

Successivamente è stata introdotta la nuova categoria ad altissimo rischio per i casi metastatici alla diagnosi.

Miettinen et al. hanno successivamente pubblicato due studi condotti su un'ampia casistica di GIST dello stomaco²⁵ e del digiuno e dell'ileo²¹⁶ seguiti in un follow-up a lungo termine. In questi lavori hanno proposto alcune linee guida per definire il potenziale maligno dei GIST gastrici (Tab 1.6) e di quelli digiunali e ileali (Tab. 1.7) in base alla dimensione e l'attività mitotica tumorale (Tab 1.8).

Tabella 1.6 Linee guida proposte per la definizione del potenziale maligno dei GIST gastrici di differenti dimensioni e attività mitotica²⁵

COMPORAMENTO BIOLOGICO TUMORALE	PROGRESSIONE DI MALATTIA (PD) E MORTALITA'
BENIGNO - GRUPPO 1: <2 cm e ≤5 mit/50HPF -	Assenza di mortalità correlata al tumore
PROBABILMENTE BENIGNO - GRUPPO 2: 2-5 cm e ≤5 mit/50HPF - GRUPPO 3a: 5-10 cm e ≤5 mit/50HPF	potenziale maligno molto basso, PD <3%
POTENZIALE MALIGNO BASSO O INCERTO - GRUPPO 4: <2 cm e >5 mit/50HPF	no PD, ma troppi pochi casi per determinare certamente la prognosi
POTENZIALE MALIGNO BASSO-MODERATO - GRUPPO 3b: >10 cm e ≤5 mit/50HPF - GRUPPO 5: 2-5 cm e >5 mit/50HPF	mortalità correlata al tumore = 12-15%
POTENZIALE MALIGNO ALTO - GRUPPO 6a: 5-10 cm e >5 mit/50HPF - GRUPPO 6b: >10 cm e >5 mit/50HPF	mortalità correlata al tumore = 49-86%

NOTA PD = progressione di malattia

Tabella 1.7 Linee guida proposte per la definizione del potenziale maligno dei GIST digiunali e ileali di differenti dimensioni e attività mitotica²¹⁶

COMPORAMENTO BIOLOGICO TUMORALE	PROGRESSIONE DI MALATTIA (PD) E MORTALITA'
PRATICAMENTE BENIGNO - GRUPPO 1: <2 cm e ≤5 mit/50HPF	PD = 0 (no evidenza di PD)
POTENZIALE MALIGNO BASSO - GRUPPO 2: 2-5 cm e ≤5 mit/50HPF	PD <5% (4%)

POTENZIALE MALIGNO MODERATO	PD = 10-30%
- GRUPPO 3a: 5-10 cm e ≤ 5 mit/50HPF	(25%)
POTENZIALE MALIGNO ALTO	PD o mortalità correlata al tumore $\geq 50\%$
- GRUPPO 3b: >10 cm e ≤ 5 mit/50HPF	(52%)
- GRUPPO 4: <2 cm e >5 mit/50HPF	(50%)
- GRUPPO 5: 2-5 cm e >5 mit/50HPF	(75%)
- GRUPPO 6a: 5-10 cm e >5 mit/50HPF	(86%)
- GRUPPO 6b: >10 cm e >5 mit/50HPF	(90%)

NOTA: Le percentuali tra parentesi indicano la % dei pazienti osservati con PD nei rispettivi gruppi.

Tabella 1.8 Predizione del rischio per dimensione, indice mitotico e sede basata sui casi AFIP “Armed Forces Institute of Pathology”³²⁹

Table 1 Rates of metastases or tumor related death in GISTs of stomach and small intestine by tumors grouped by mitotic rate and tumor size*

Group	Tumor parameters		% of patients with progressive disease during long-term follow up and characterization of risk for metastasis			
	Size	Mitotic rate	Gastric GISTs	Jejunal and ileal GISTs	Duodenal GISTs	Rectal GISTs
1	≤ 2 cm	≤ 5 per 50 HPFs	0 none	0 none	0 none	0 none
2	>2 \leq 5 cm	≤ 5 per 50 HPFs	1.9 very low	4.3 low	8.3 low	8.5% low
3a	>5 \leq 10 cm	≤ 5 per 50 HPFs	3.6 low	24 moderate		
3b	>10 cm	≤ 5 per 50 HPFs	12 moderate	52 high	34 high†	57† high‡
4	≤ 2 cm	>5 per 50 HPFs	0†	50†	§	54 high
5	>2 \leq 5 cm	>5 per 50 HPFs	16 moderate	73 high	50 high	52 high
6a	>5 \leq 10 cm	>5 per 50 HPFs	55 high	85 high		
6b	>10 cm	>5 per 50 HPFs	86 high	90 high	86 high‡	71 high‡

*Based on previously published long-term follow-up studies on 1055 gastric, 629 small intestinal, 144 duodenal, and 111 rectal GISTs.^{32,15,18,30}
†Denotes tumor categories with very small numbers of cases.
‡Groups 3a and 3b or 6a and 6b are combined in duodenal and rectal GISTs because of small number of cases.
§No tumors of such category were included in the study. Note that small intestinal and other intestinal GISTs show a markedly worse prognosis in many mitosis and size categories than gastric GISTs.

Questa classificazione dimostra una differenza prognostica marcata tra i GIST dello stomaco e quelli dell'intestino tenue e crasso: la maggior parte dei GIST gastrici si comportano infatti globalmente in modo indolente e quelli di dimensioni inferiori a 2 cm sono quasi universalmente benigni. I GIST dell'intestino sia tenue sia crasso dimostrano invece un comportamento biologico più aggressivo rispetto alla controparte gastrica: infatti le lesioni anche di dimensioni inferiori a 2 cm ma con attività mitotica superiore a 5/50 hpf possono recidivare e dare metastasi.

Successivamente nel 2008 Joensuu *et al.*³⁰⁵ ha modificato la classificazione del NIH introducendo fattori prognostici addizionali quali la rottura tumorale e la sede della neoplasia (Tab. 1.9). La rottura tumorale nella cavità addominale, sia

verificata spontaneamente sia al momento della chirurgia, aumenta il rischio di impianti tumorali intra-addominali e determina un rischio molto alto di recidiva, indipendentemente dall'indice mitotico e dalle dimensioni. Fortunatamente costituisce un evento abbastanza raro (< 5% dei casi).

Tabella 1.9 Proposta di classificazione sec. Joensuu³⁰⁵

Table 4 Proposed modification of consensus classification for selecting patients with GIST for adjuvant therapy

Risk category	Tumor size (cm)	Mitotic index (per 50 HPFs)	Primary tumor site
Very low risk	<2.0	≤5	Any
Low risk	2.1-5.0	≤5	Any
Intermediate risk	2.1-5.0	>5	Gastric
	<5.0	6-10	Any
High risk	5.1-10.0	≤5	Gastric
	Any	Any	Tumor rupture
	>10 cm	Any	Any
	Any	>10	Any
	>5.0	>5	Any
	2.1-5.0	>5	Nongastric
	5.1-10.0	≤5	Nongastric

Sono stati successivamente introdotti nomogrammi prognostici che considerano l'indice mitotico e le dimensioni come variabili continue: il primo riportato da Gold et al²⁹⁰ nel 2009 (Fig. 1.12) che ha dimostrato una predizione di sopravvivenza libera da malattia superiore alle precedenti classificazioni NIH-AFIP.

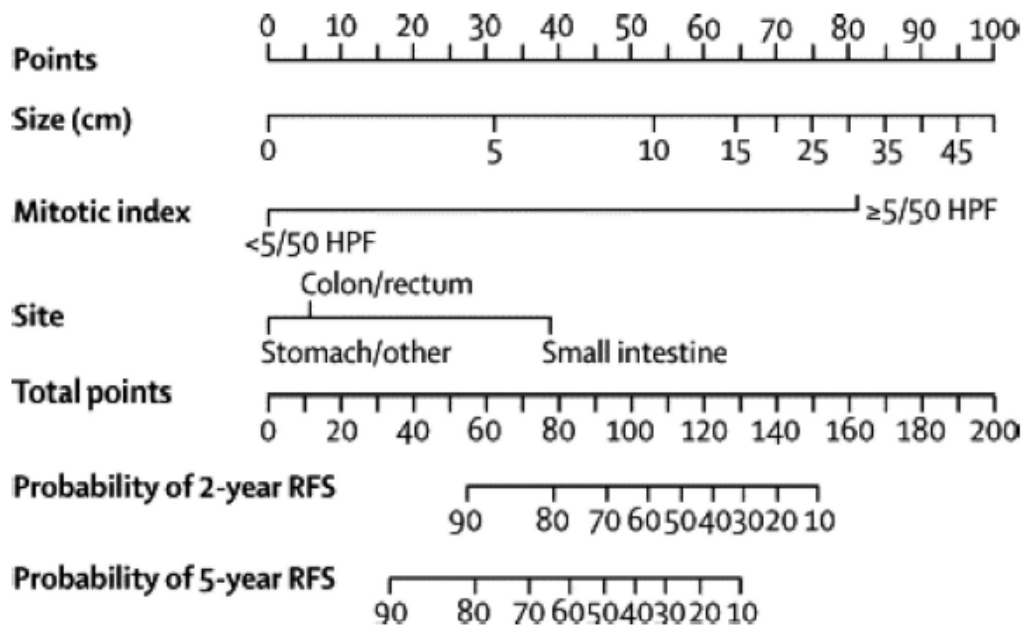


Figure 2. Nomogram to predict the probabilities of 2- and 5-year recurrence-free survival. Points are assigned for size, mitotic index, and site of origin by drawing a line upward from the corresponding values to the "Points" line. The sum of these 3 points plotted on the "Total Points" line corresponds to predictions of 2- and 5-year RFS.

Fig. 1.12 Nomogramma per predire la probabilità di sopravvivenza libera da malattia a 2 e 5 anni²⁹⁰.

Recentemente è stato elaborato un altro nomogramma³⁵⁵ che includeva sede, dimensioni ed indice come variabili continue e stratificava i pazienti in due fasce di età ≤ 65 anni e > 65 anni (Fig. 1.13). Il modello basato su questo nomogramma risolveva i problemi derivati da una categorizzazione artefattuale di variabili continue.

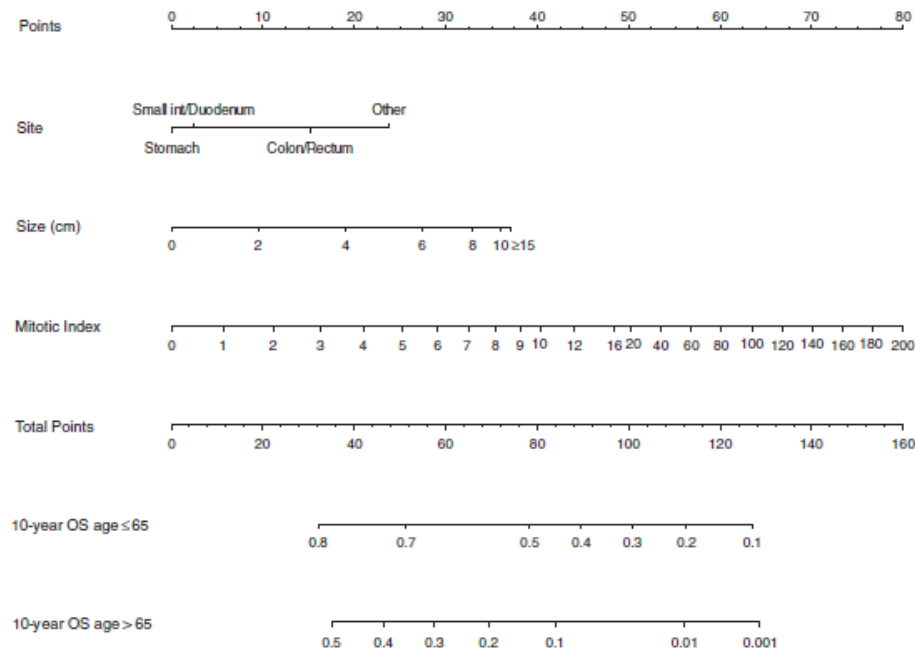


FIGURE 2. Nomogram for 10-year OS according to patient's age at diagnosis (≤ 65 , > 65 y). Instructions: The nomogram yields the 10-year OS probability corresponding to a patient's combination of covariates. Locate the patient's tumor site and draw a line straight upward to the Points axis to determine the score associated with that site. Repeat the process for tumor size and mitotic index, sum the 3 resulting scores, and locate the sum on the Total Points axis. Then, on the basis of patient's age at diagnosis (≤ 65 or > 65 y), draw a line straight down to the corresponding 10-year OS axis to find OS probability.

Fig. 1.13 Nomogramma per la sopravvivenza globale in base all'età del paziente³⁵⁵

b) IMMUNOISTOCHEMICA

Approssimativamente il 95% dei GIST sono KIT (CD117) positivi, il 60-70% sono CD34 positivi, il 30-40% actina del muscolo liscio (SMA) positivi, il 5% S100 positivi e l'1-2% desmina o cheratina focalmente positivi^{26,29,30,31,42}.

La positività per KIT (CD117) è nella maggioranza dei casi diffusa e intensa con una distribuzione citoplasmatica e nel 50% dei casi può presentare una distribuzione paranucleare "dot-like" definita "golgi pattern", spesso coesistente al pattern classico di colorazione, più raramente isolata.

Può essere presente anche una distribuzione di membrana, soprattutto nei GIST epitelioidi.

Solitamente la colorazione è presente nel 90% delle cellule tumorali, in rari casi è presente una immunoreattività focale in una minoranza delle cellule tumorali per cui la colorazione può risultare negativa nelle piccole biopsie e positiva nelle successive biopsie escissionali.

Circa il 5%^{32,33} dei GIST sono negativi per KIT, alcuni di questi casi presentano citomorfologia epitelioide, sono localizzati nello stomaco o nell'omento o peritoneo e possiedono mutazioni a livello di PDGFRA.

E' importante sottolineare che approssimativamente il 20% dei tumori KIT-negativi hanno comunque mutazioni di KIT.

Approssimativamente il 90% dei GIST KIT-negativi o debolmente positivi ha una mutazione in KIT o PDGFRA, che non solo conferma la diagnosi ma fornisce anche informazioni prognostiche sulla probabilità di risposta all'imatinib.

Altri marker antigenici possono essere valutati nella diagnosi differenziale dei GIST, ma non hanno la rilevanza diagnostica del CD117.

CD34, una glicoproteina transmembrana di 110 kDa, è un antigene delle cellule progenitrici emopoietiche, presente anche nelle cellule endoteliali e in alcuni tipi di fibroblasti^{7,28,30} ed è espresso soprattutto nei GIST dell'esofago e del retto; non è correlato all'aggressività biologica⁴².

La positività all'actina del muscolo liscio (SMA), presente in cellule del muscolo liscio normali e neoplastiche e in alcuni miofibroblasti, è dimostrabile soprattutto nei GIST gastrici e dell'intestino tenue e tende a presentarsi reciprocamente a quella a CD34; talora ciò è evidenziabile all'interno dello stesso tumore con un pattern a mosaico caratterizzato da aree CD34-negative e SMA-positive e CD34-positive e SMA-negative.

La proteina S-100, un antigene delle cellule della cresta neurale, è espressa soprattutto nelle lesioni dell'intestino tenue con una positività solitamente focale, sia nel citoplasma sia nei nuclei.

La desmina, un filamento intermedio di 53 kDa presente nelle cellule muscolari lisce, scheletriche e cardiache, è positiva più spesso nei GIST dell'esofago.

La rara positività alla cheratina è presente soprattutto nelle forme ad alto rischio epitelioidi; inoltre come molti tumori mesenchimali, soprattutto quelli maligni, i GIST possono essere vimentina positivi.

Altri marker immunoistochimici minori sono: la forma embrionale della miosina del muscolo liscio, il caldesmon, una proteina del citoscheletro legante l'actina⁴³, che sono antigeni del muscolo liscio, e la nestina, un filamento intermedio del IV tipo del citoscheletro espresso anche dai rhabdomiosarcomi e melanomi.

I GANT sono caratterizzati da differenziazione neuroendocrina con espressione di cromogranina, sinaptofisina, enolasi neurono-specifica, proteina gliofibrillare

acida o neurofilamenti in aggiunta all'immunoreattività a vimentina, S100 e CD34.

Nel 2004 *West et al.*³⁴ hanno scoperto che “*Discovered on GIST1*” (DOG1), un c-DNA codificante per una proteina dei canali del cloro regolati dal calcio, è espresso ubiquitariamente nei GIST indipendentemente dallo stato mutazionale; infatti sieri policlonali rivolti contro DOG1 peptidi erano altamente sensibili e specifici per questi tumori e inoltre individuavano anche alcuni GIST KIT-negativi. Sono stati quindi commercializzati anticorpi policlonali e monoclonali anti DOG1 che erano positivi nei GIST indipendentemente dallo stato mutazionale di KIT/PDGFR^{317, 318, 330}) (Tab. 1.10).

Tab 1.10 Revisione dei risultati dell'immunoistochimica per DOG1 nei differenti studi³¹⁷

Study on GIST DOG1 Antibody	Espinosa ²⁵	Lieg ²⁸	Miettinen ²²	Ardeleanu ²⁶
	DOG1.1 (Stanford) (%)	DOG1.1 (Stanford) (%)	Clone K9 (Novocastra) (%)	Polyclonal (Spring) (%)
Total	370/425 (87)	61/81 (75)	986/1040 (94.8)	14/14 (100)†
Anatomic location				
Stomach	148/169 (88)	15/26 (58)	507/537 (94.4)	
Small intestine	88/97 (91)	21/30 (70)	358/372 (92)	
Duodenum	NA	2/2 (100)	53/57 (92)	
Esophagus	1/2 (50)		9/10 (90)	
Colon and rectum	21/27 (78)	1/1 (100)	59/64 (92)	
Omentum	16/21 (76)	2/6 (33.3)	34/38 (89)	
Abdomen		12/17 (71)	83/90 (92)	
Genotype				
KIT exon 11	180/197 (91)	19/21 (90)	0/3 (0)*	
KIT exon 9	16/16 (100)	2/2 (100)		
KIT exon 13	4/5 (80)	2/2 (100)		
PDGFRA exon 12	5/5 (100)		1/1 (100)*	
PDGFRA exon 14	0/1 (0)		1/2 (50)*	
PDGFRA exon 18	18/23 (78)	3/10 (30)	9/16 (56)*	
Wild type	33/37 (89)	15/20 (75)	3/16 (19)*	
KIT-negative GIST	63/111 (57)	10/28 (36)	26/53 (49)	
Pediatric GIST	7/9 (78)	9/11 (81)	11/12 (91.6)	
Neurofibromatosis 1-associated GIST		16/16 (100)	16/16 (100)	

*Mutation studies only in those GIST that were negative for DOG1, KIT, or both.
†Fourteen spindle cell GIST with no information on anatomic site and genotype provided.

DOG1 dimostra quindi, nei differenti studi, una sensibilità globale che è uguale o leggermente superiore a quella di KIT. Sebbene esista una piccola quota di GIST-KIT positivi e negativi per DOG1, è emerso come questo nuovo anticorpo possa identificare circa il 30-50% dei casi KIT negativi, includendo alcuni casi con mutazioni in KIT e soprattutto mutazioni in PDGFRA. La specificità per DOG1 sembra inoltre superiore a KIT come marker diagnostico nei GIST, gli unici tumori mesenchimali eccezionalmente DOG1 positivi sono leiomiomi retroperitoneali di tipo uterino, leiomiomatosi peritoneali e sinovial sarcoma.

L'indagine immunohistochimica con anticorpi anti-KIT e DOG1 identifica quindi quasi il 100% dei GIST in quanto questi due anticorpi sono caratterizzati da differenti aree d'ombra.

Protein kinase C theta (PKC- θ), una molecola di segnale che svolge un ruolo nell'attivazione delle cellule T, nella trasduzione del segnale muscolare scheletrico e nella differenziazione neuronale, costituisce un altro nuovo marker immunohistochimico specifico e sensibile, espresso intensamente a livello dei GIST^{35,36,38} e per cui sono disponibili anticorpi nel mercato. La presenza di PKC- θ è stata osservata a livello delle cellule interstiziali di Cajal, mentre manca negli altri tumori mesenchimali o epiteliali inclusi quelli KIT positivi non GIST.

La coespressione di KIT e PKC- θ suggerisce che entrambe le molecole siano funzionalmente correlate: *Blume e al.*⁴⁰ hanno riportato che le isoforme classiche di PKC sono coinvolte nella modulazione del segnale di KIT attraverso la fosforilazione di specifici residui di serina in questa molecola, ma il ruolo dell'isoforma theta è ancora inesplorato. *Atsushi et al.*⁴¹ hanno rilevato la positività per PKC- θ soprattutto nei GIST-KIT negativi a differenza di quanto si verifica con DOG1.

c) I “MICROGIST”

I “microGIST” sono GIST di piccole dimensioni, tipicamente inferiore a 10 o 20 mm in base ai differenti studi, clinicamente silenti che mostrano una morfologia prevalentemente fusocellulare. Sono lesioni comuni, con una prevalenza riportata fino al 35% in alcuni studi^{243,244,309}. Questi tumori sono chiamati anche noduli iperplastici di cellule interstiziali di Cajal, “GIST tumorlet” e “microscopic GIST”. La sede prevalente è lo stomaco e sono caratterizzati da un pattern di crescita infiltrativo, basso grado di cellularità, abbondante sclerosi ed un basso indice mitotico (< 5/HPF) con una categoria di rischio molto basso.

Non è ancora chiaro se tutti i microGIST siano neoplasie precoci o se almeno una parte di essi rappresentino noduli iperplastici benigni. Tali tumori hanno frequentemente mutazioni in KIT o PDGFRA, con un tasso di mutazione variabile tra 74-92% nei vari studi.

L'alto tasso di mutazione suggerisce che costituiscano un evento precoce nello sviluppo neoplastico e che altre alterazioni molecolari secondarie siano necessarie per la progressione tumorale e l'incremento dimensionale.

Clinicamente sono lesioni autolimitantesi con tasso di progressione in GIST maligni molto basso.

d) CRITERI DIAGNOSTICI E DIAGNOSI DIFFERENZIALE

I GIST sono definiti come tumori mesenchimali del tratto gastrointestinale a cellule fusate o epiteliodi o occasionalmente pleomorfi, che esprimono la proteina kit (KIT immunopositività) con eccezioni molto rare²⁶.

Le eccezioni comprendono: lesioni con le tipiche caratteristiche citoarchitetture dei GIST ma che sembrano essere immunoistochimicamente inerti (ad esempio a causa di artefatti della fissazione o eccessivo calore durante l'essiccamento della sezione o deposito troppo prolungato dei vetrini non colorati), che sono KIT-negative a causa di errori di campionamento (ad esempio agobiopsie molto piccole), che hanno terminato di esprimere KIT a causa di una forma di evoluzione clonale durante la terapia con imatinib, o che, in meno del 2% dei casi, sono realmente prive di mutazioni di KIT e/o KIT amplificazione.

I tumori appartenenti a queste eccezionali categorie possono essere chiamati "*stromal neoplasm most consistent with GIST*".

Relativamente pochi altri tumori sono variabilmente o consistentemente kit-positivi e solo raramente entrano in diagnosi differenziale con i GIST, perchè morfologicamente diversi. Possono essere tumori solidi rappresentanti fenotipi trasformati di cellule normali kit-positive come il melanoma, il mastocitoma, il seminoma, il carcinoma mammario duttale, il tumore mieloide extramidollare blastico (ovvero la manifestazione tissutale della leucemia mieloide acuta). Alternativamente possono essere tumori kit-positivi in cui è sconosciuta la controparte cellulare normale kit-positiva quali il sarcoma a cellule chiare, i tumori di Ewing, il sarcoma sinoviale, l'istiocitoma fibroso maligno, il glioma, lo schwannoma benigno, il neuroblastoma, il cancro ovarico, il cancro colon-rettale, l'angiosarcoma, e il microcitoma polmonare^{46,47,48}.

Vi sono poi i veri tumori del muscolo liscio gastrointestinali, come il leiomioma esofageo^{44,45}, il piccolo leiomioma colon-rettale della muscolaris mucosae⁴⁹ e i rari veri leiomiosarcomi gastrointestinali^{50,51}, ognuno dei quali possiede distinte caratteristiche clinicopatologiche. Ancora a parte ci sono i tumori del glomo⁵², gli schwannomi^{53,54}, i polipi fibrosi infiammatori^{55,56}, i tumori miofibroblastici infiammatori⁵⁷ e i liposarcomi addominali dedifferenziati⁵⁸ (Tab.1.11).

Tabella 1.11 Tumori gastrointestinali kit-negativi clinicamente o patologicamente simili ai GIST²²

ENTITA' TUMORALE	ANALOGIE E DIFFERENZE CON I GIST
LEIOMIOMA ESOFAGEO	Tumore esofageo intramurale composto da cellule muscolari ben differenziate, actina e desmina positive. Minore cellularità dei GIST; insorge più spesso in pazienti giovani.
LEIOMIOMA PERICOLICO	Insorge nelle donne; istologicamente simile al leiomioma uterino. Positivo ai recettori degli estrogeni e progesterone, all'actina e desmina.
VERO LEIOMIOSARCOMA	Un raro tipo di sarcoma fusocellulare (fino al 10%) che esprime aspetti fenotipici delle cellule muscolari lisce ben differenziate (actina e desmina-positivo). Si manifesta spesso come masse polipoidi intraluminali, tipicamente in anziani.
TUMORE DEL GLOMO	Identico al tumore del glomo dei tessuti molli periferici. Si sviluppa quasi esclusivamente nello stomaco; è positivo all'actina del muscolo liscio, negativo alla desmina e può essere variabilmente CD34 positivo.
POLIPI FIBROSI INFIAMMATORI	Lesione fusocellulare con linfociti e eosinofili, che può essere CD34 positiva. Alcune varianti sono altamente vascolarizzate e simili al tessuto di granulazione. Esprimono un'eterogeneità cellulare maggiore dei GIST; macroscopicamente si manifestano come polipi intramurali ulcerati.
TUMORE MIOFIBROBLASTICO INFIAMMATORIO	Insorge soprattutto nei bambini e giovani adulti, può formare una massa gastrica o intestinale mimando i GIST. Più spesso omentale o mesenterico. Formato da cellule fuse o lievemente epitelioidi con citoplasma amfifilico e processi citoplasmatici. Esprime il gene ALK e i suoi riarrangiamenti.
TUMORE DESMOIDE MESENTERICO	Può manifestare un coinvolgimento della parete gastrica o intestinale simile ai GIST; è formato da fibroblasti e miofibroblasti in uno sfondo di collagene. CD34-negativo.
TUMORE FIBROSO SOLITARIO	Può presentarsi sulla superficie peritoneale o nel fegato. Formato da cellule fuse, con un pattern simile all'emangiopericitoma. CD34-positivo.
SCHWANNOMA	Solitamente è un tumore piccolo, giallo e circoscritto nella sottomucosa; la sede più comune è lo stomaco, seguito dal colon. Formato da cellule fuse S100-positive, spesso configuranti un pattern microtrabecolare in uno sfondo fibroso S100-negativo. Frequente positività alla GFAP, mai osservata invece nei GIST.
SARCOMI INDIFFERENZIATI	Tumori gastrointestinali maligni che non esprimono alcun marker cellulare specifico. Possono simulare macroscopicamente i GIST, ma istologicamente dimostrano un maggiore pleomorfismo nucleare.
LIPOSARCOMI	Tumori retroperitoneali mesenterici che possono coinvolgere la parete intestinale

DEDIFFERENZIATI	analogamente ai GIST. Possono manifestare caratteristiche simili all'istiocitoma fibroso maligno mixoide o pleomorfo o al fibrosarcoma. La diagnosi è difficile se non è presente tessuto adiposo nel tessuto campionato.
MELANOMA METASTATICO	Può formare un tumore macroscopicamente simile ai GIST con il coinvolgimento di strati parietali dell'intestino o stomaco. Può essere kit-positivo. Sono diagnostici i marker melanocitari (tirosinasi, melanA, HMB45).

I veri tumori del muscolo liscio (leiomiomi e leiomiosarcomi) sono positivi per SMA e per la desmina; mentre sono KIT –negativi e CD34 –positivi nel 10-15% dei casi^{26,45,69}.

Gli schwannomi sono S100-positivi e KIT-negativi, ma è possibile una focale positività al CD34 (Antoni B)^{26,54}; i polipi fibrosi infiammatori possono essere CD34-positivi⁵⁶ ma sono KIT-negativi e contengono cellule infiammatorie compresi i granulociti eosinofili. E' controversa invece la positività per KIT della fibromatosi desmoide⁷⁰, che sembra essere correlata ad un eccessivo trattamento di smascheramento antigenico; infatti eliminando questo passaggio tutti i casi di fibromatosi risultano negativi³⁷ (Tab.1.12).

Tabella 1.12 Caratteristiche immunoistochimiche dei tumori fusocellulari del tratto gastrointestinale²⁶

TUMORE	KIT (CD117)	CD34	SMA	DESMINA	S-100
GIST	+	+(60-70%)	+(30-40%)	molto rara	+(5%)
TUMORI DEL MUSCOLO LISCIO	-	+(10-15%)	+	+	rara
SCHWANNOMA	-	+(AntoniB)	-	-	+
FIBROMATOSI	controversa	rara	+	rare cellule	-

La valutazione immunoistochimica per kit (CD117) deve essere presa in considerazione almeno nelle seguenti condizioni: tumori primitivi mesenchimali del tubo digerente (con l'eccezione dei tipici leiomiomi esofagei e degli schwannomi), neoplasie dell'omento-mesentere-retroperitoneo a cellule fusate o epitelioidi o pleomorfe, tumori mesenchimali non classificati dell'addome e della parete addominale e tumori epatici fusocellulari.

Sebbene il sospetto di GIST possa essere suggerito clinicamente o radiologicamente o istologicamente, la diagnosi deve essere confermata tramite analisi immunoistochimiche.

Le tecniche radiologiche utilizzate per visualizzare i GIST primitivi e le lesioni metastatiche includono: l'esame radiografico seriato del tubo digerente con doppio contrasto, l'ecografia, l'endoscopia ultrasonografica (ecoendoscopia o EUS "*endoscopic ultrasound*"), la tomografia computerizzata (TC) e la risonanza magnetica nucleare (RMN).

Alla TC, l'esame preoperatorio di scelta per la stadiazione e la pianificazione chirurgica, i GIST primitivi si presentano tipicamente come tumori ben circoscritti e altamente vascolarizzati che originano dallo stomaco o da qualsiasi altra sede nel tratto gastrointestinale e crescono con modalità extraluminale; inoltre le lesioni più grandi possono avere un centro necrotico⁶².

L'esame endoscopico mostra generalmente una massa polipoide sottomucosa con o senza ulcerazione; talora può essere presente la sola ulcera e l'esame radiografico seriato del tubo digerente può evidenziare, in questi casi, una piccola massa intraparietale ad essa sottostante.

La RMN con sonde dedicate è l'esame di scelta per la stadiazione preoperatoria in caso di GIST rettali noti o sospetti.

Recentemente la tomografia ad emissione di positroni (PET) si è rivelata uno strumento utile e non invasivo di monitoraggio dell'efficacia del trattamento.

La tecnologia PET utilizza il tracciante metabolico 18F-fluorodesossiglucosio (FDG) per valutare l'attività metabolica del tumore e identifica quindi l'iper captazione tumorale rispetto ai normali tessuti circostanti.

La FDG-PET è più sensibile della RMN nell'individuazione di piccole metastasi dei GIST e nel monitoraggio della risposta tumorale alla terapia. Durante una risposta positiva alla terapia i GIST possono manifestare una diminuzione del metabolismo, ma un aumento delle dimensioni prima della regressione e morte cellulare.

Lo svantaggio della PET è la scarsa disponibilità e accessibilità rispetto alle più diffuse TC e RMN.

Un importante progresso nella valutazione diagnostica dei GIST è stato l'uso dell'ecoendoscopia (EUS *endoscopic ultrasound*)^{59,63}, capace di visualizzare

anche i tumori più piccoli in forma di masse contenute entro la struttura di parete a cinque strati.

I tumori stromali gastrointestinali sono generalmente lesioni rotonde o ovali con un'ecostruttura ipoecogena; data la loro più comune origine dalla tonaca muscolare propria sono solitamente associati al quarto strato della parete⁶⁴, ma talora i GIST derivano dalla muscolaris mucosa e conseguentemente si visualizzano entro il terzo strato.

L'aspetto di tumore intramurale ipoecogeno è comune a molte entità: GIST, tumori a cellule granulose, neuromi, tumori del glomo, carcinoide e metastasi; nel 50%⁶⁵ dei casi si tratta di tumori stromali gastrointestinali.

Sono stati condotti numerosi studi per cercare di definire la benignità e malignità dei GIST sulla base dell'aspetto all'EUS, i più probabili fattori predittivi di malignità sono: la dimensione, la forma non ovale e i margini irregolari o indistinti.

Molti GIST sono resecati senza effettuare una biopsia, ma recentemente sta aumentando l'utilizzo di "fine-needle aspirates" (FNA) e piccole biopsie effettuate endoscopicamente.

La diagnosi istologica preoperatoria è possibile nelle lesioni esofagee, gastriche, duodenali o coliche mediante biopsie endoscopiche, ma più frequentemente queste non sono diagnostiche data la localizzazione intramurale⁶⁰.

A causa del rischio di rottura del tumore, che potrebbe portare a disseminazione peritoneale e emorragia⁶¹, l'uso routinario della biopsia preoperatoria è controverso; inoltre frequentemente non è possibile ottenere una diagnosi affidabile da una biopsia percutanea, specialmente nei casi in cui si ricava esclusivamente un aspirato ad ago sottile o una porzione necrotica del tumore.

Quindi la biopsia percutanea andrebbe riservata alle seguenti situazioni: ai casi giudicati non resecabili, ai casi di necessaria diagnosi differenziale con altre neoplasie (linfomi, tumori germinali, fibromatosi e altri tipi di sarcomi) e in prospettiva di una terapia neoadiuvante.

Nel 2002 l'uso di FNAB (*fine-needle aspiration biopsy*)-EUS guidate si è rivelato capace di aspirare sufficiente materiale diagnostico nel 75%⁶⁶ dei GIST, ma sono necessari passaggi multipli; l'utilizzo di aghi a scatto potrebbe migliorare il prelievo di materiale⁶⁷. Infatti uno studio più recente²⁷⁵ ha confermato un valore diagnostico dell'EUS-FNA del 75% ma ha riportato risultati migliori tramite

l'utilizzo delle biopsie con aghi a scatto (materiale diagnostico nel 97% dei casi). Secondo le linee guida del "*National Comprehensive Cancer Network*" (NCCN) NCCN v. 1.2018 l'utilizzo della FNAB-EUS guidata del tumore primitivo è preferibile a quello della biopsia percutanea, a causa del rischio di emorragia e di disseminazione intra-addominale neoplastica. La biopsia percutanea-TC guidata andrebbe riservata invece ai casi di sospetta localizzazione metastatica.

Ottenere un volume sufficientemente grande di tessuto è importante per un'adeguata diagnosi; sebbene l'aspirato citologico possa confermare la diagnosi di GIST non è in grado di definire il rischio di malignità ed inoltre le tecniche immunoistochimiche sono più agevoli con una maggiore quantità di tessuto.

1.5 TERAPIA

a) TERAPIA CHIRURGICA

TRATTAMENTO DEL TUMORE PRIMITIVO

Secondo le raccomandazioni delle linee guida dell'AIOM (Associazione Italiana di Oncologia Medica) 2016 e le linee guida del NCCN v.1.2018 la chirurgia è il trattamento standard dei GIST localizzati o potenzialmente reseccabili. Se l'intervento comporta deficit funzionale importante può essere indicata la terapia con imatinib con intento neo-adiuvante, soprattutto nei casi di GIST del retto, della seconda porzione del duodeno, della giunzione esofago-gastrica e dell'esofago.

Un requisito fondamentale per la chirurgia è l'assenza di metastasi evidenti.

I GIST tendono ad essere molto fragili e quindi deve essere accuratamente evitata la rottura della massa tumorale: l'obiettivo è di ottenere una resezione macroscopica completa con la pseudo-capsula integra, possibilmente raggiungendo margini microscopici indenni, per ridurre il rischio di recidiva. La rottura della massa, sia spontanea sia legata a manovre chirurgiche, si associa ad una prognosi sfavorevole, pertanto si può considerare una terapia neo-adiuvante anche nei casi in cui sia presente un rischio elevato di rottura intraoperatoria neoplastica.

In caso di chirurgia già realizzata con margini microscopicamente positivi (R1) si può valutare l'esecuzione di un secondo intervento di radicalizzazione in base alla sua fattibilità e alla necessità di evitare ampie demolizioni secondo l'AIOM mentre l'NCCN non raccomanda tale approccio.

Dopo la rimozione di ogni lesione sospetta per GIST, è essenziale la valutazione patologica per confermare la diagnosi.

Considerando che i GIST tendono a crescere all'esterno dell'organo primitivamente coinvolto allontanando le strutture adiacenti, senza infiltrarle, il trattamento chirurgico adeguato comprende, a seconda della sede, la resezione cuneiforme dello stomaco ("*wedge resection*" o WR), limitata alla porzione di parete coinvolta dalla neoplasia, o la resezione segmentale intestinale.

Nella maggioranza delle casistiche chirurgiche sono stati ottenuti risultati a lungo termine equivalenti dalla WR e dalla gastrectomia parziale¹⁸⁸.

Nel caso di tumori primitivi esofagei, duodenali e rettali le WR non sono spesso tecnicamente realizzabili e quindi le resezioni ampie sono il trattamento di scelta.

Per i GIST omentali o mesenterici è raccomandata una resezione completa “*en bloc*” della malattia visibile.

Gli organi adiacenti aderenti alla massa devono essere resecati “*en bloc*” con il tumore, per evitare la rottura della capsula e la disseminazione intraddominale.

Secondo le linee guida del NCCN la chirurgia laparoscopica dovrebbe essere considerata per casi selezionati localizzati in sedi anatomiche favorevoli (come la grande curva o la parete anteriore dello stomaco).

*Matthews et al.*¹⁸³ hanno posto a confronto 21 resezioni gastriche laparoscopiche di variabile estensione e 12 interventi a cielo aperto, non riscontrando differenze nei tempi operatori, nelle perdite ematiche o nelle complicanze. Tale accesso può trovare particolare indicazione nelle neoplasie localizzate nella parete gastrica anteriore, in considerazioni delle minori difficoltà tecniche e del miglior controllo dei margini di sezione.

Gli studi di *Bedard et al.*¹⁸⁴ e di *Lai I et al.*¹⁸⁵ hanno confermato la sicurezza dell’approccio laparoscopico nei GIST gastrici < 5 cm con risultati di follow-up a breve e intermedio termine soddisfacenti.

Il lavoro di *Novitsky et al.*¹⁸⁶ ha stabilito la sicurezza e l’efficacia della resezione laparoscopica nei GIST gastrici di piccole e medie dimensioni, riportando una sopravvivenza libera da malattia a lungo termine nel 92% dei casi.

I margini devono essere negativi entro l’organo da cui il tumore origina, sebbene la neoplasia possa interessare anche la superficie sierosa peritoneale.

A differenza dei carcinomi, i GIST metastatizzano solo raramente nei linfonodi regionali e quindi la linfadenectomia sistematica non è indicata, se non nei casi di evidente coinvolgimento linfonodale come osservato nei GIST con perdita di funzione del complesso SDH.

La resezione macroscopica completa è possibile circa nell’85% dei pazienti con tumore primitivo localizzato e nel 70-95% di questi casi si ottengono margini microscopicamente indenni^{61,182}.

La chirurgia non cura generalmente i GIST, l'intervallo medio di tempo dalla resezione di un GIST primitivo ad alto rischio alla comparsa di recidiva è circa di due anni.

La resezione completa in pazienti con GIST primitivo è associata ad un tasso di sopravvivenza a 5 anni del 48-65% in diversi studi (Tab. 1.13).

Tabella 1.13 Studi pubblicati sulla sopravvivenza dopo resezione completa di GIST primitivi

RIFERIMENTO	INTERVALLO DI STUDIO	NUM. PZ	NUM. RESEZIONI COMPLETE	SOPRAVVIVENZA A 5 ANNI DOPO RESEZIONE COMPLETA (%)
<i>Akwari et al.</i> ²¹⁰	1950-1974	108	52	50
<i>Shiu et al.</i> ²¹¹	1949-1973	38	20	65
<i>McGrath et al.</i> ²¹²	1951-1984	51	30	63
<i>Ng et al.</i> ²¹³	1957-1997	191	99	48
<i>DeMatteo et al.</i> ⁶¹	1982-1998	200	80	54
<i>Crosby et al.</i> ²¹⁴	(2001)	50	34	42 (tutti i casi localizzati nell'intestino tenue)
<i>Fujimoto et al.</i> ²¹⁵	(2003)	140	129	93 (tutti i casi localizzati nello stomaco)

Lo studio di *DeMatteo et al.*⁶¹ riporta in una casistica di 80 pazienti con tumore primitivo privo di metastasi sottoposti a resezione chirurgica macroscopica completa, un tasso di sopravvivenza a 5 anni del 54% con un valore mediano di 66 mesi. I pazienti trattati con resezione incompleta, per tumore non resecabile all'esplorazione chirurgica o presenza di residuo di malattia macroscopico dopo escissione, presentavano invece una mediana di sopravvivenza di 22 mesi.

In questo lavoro, come in quello di *Demetri et al.*¹⁸⁹, la presenza di margini positivi microscopicamente non è stata dimostrata predittiva di recidiva.

*Yao et al.*¹⁸¹ hanno riscontrato una mediana di sopravvivenza di 46 mesi nei casi di resezione completa versus 10 mesi se la resezione risultava incompleta; le

recidive locali sono state però il 100% negli 11 casi di infiltrazione microscopica del margine chirurgico.

Risultati simili sono stati riferiti da *Langer et al.*¹⁸² che hanno osservato recidiva locale in 3 dei 4 pazienti con margini microscopicamente infiltrati.

Sebbene non sia stato definitivamente dimostrato che la resezione con margini positivi comprometta la sopravvivenza, essa può determinare un rischio più elevato di recidiva peritoneale o malattia metastatica^{61,179,180}.

La mancanza di un accordo unanime può avere diverse spiegazioni: i risultati degli studi condotti sulla terapia chirurgica dei GIST primitivi sono alterati dal fatto che molti autori tendono a raggruppare pazienti con malattia primitiva e recidive; questi errori metodologici inficiano le valutazioni di correlazione con la sopravvivenza. Inoltre il numero di casi con margini microscopicamente positivi, anche nelle casistiche più ampie, è talmente esiguo da non consentire valutazioni statisticamente significative⁶¹.

La rottura tumorale prima o durante l'intervento chirurgico è associata ad alto rischio di disseminazione intraddominale tumorale e recidiva¹⁸⁸.

b) TERAPIA MOLECOLARE CON INIBITORI DELLE TIROSINA-CHINASI

L'IMATINIB MESILATO è un derivato della 2-fenilaminopirimidina (Fig. 1.14), capace di inibire le tirosina-chinasi ABL, PDGFRA-B e KIT.

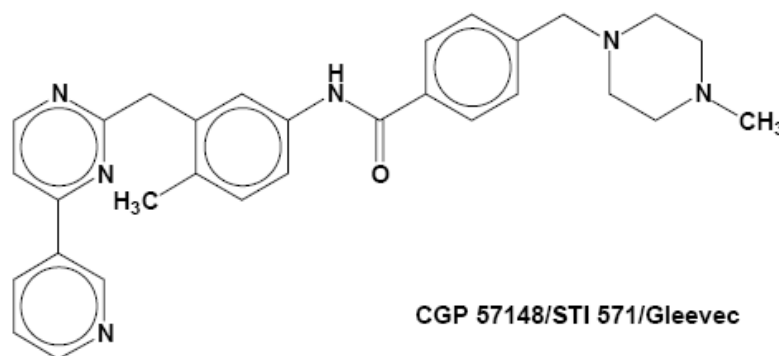


Figura 1.14 Struttura chimica dell'imatinib, definito chimicamente come 4-[(4-metil-1-piperazinil)metil]-N-[4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-fenil]benzamide metanesulfonato

Il farmaco è un antagonista competitivo del legame dell'ATP al dominio intracellulare recettoriale, capace di bloccare il trasferimento di gruppi fosfato dall'ATP ai residui di tirosina sulle proteine substrato (Fig.1.15).

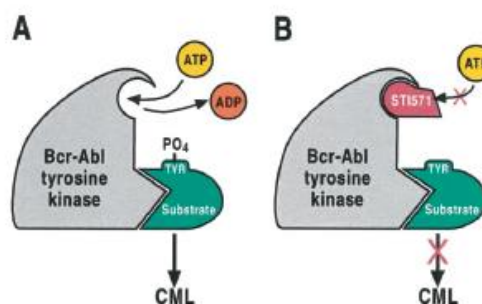


Figura 1.15 Meccanismo di azione dell'imatinib

In particolare l'imatinib inibisce non solo l'autofosforilazione di KIT, ma anche la fosforilazione di Akt e ERK, interrompendo così le due maggiori vie di trasduzione del segnale di KIT.

L'inibizione delle tre tirosina-chinasasi bersaglio si verifica a concentrazioni simili di 100nM; il farmaco ha una buona biodisponibilità orale (97%), è metabolizzato nel fegato dal citocromo p450 isoenzima CYP3A4 e ha un'emivita nella circolazione sanguigna di 13-16 ore, compatibile con un'unica somministrazione giornaliera.

Due importanti osservazioni ottenute nel 1999 suggerirono che l'imatinib poteva essere efficace contro i GIST. La prima era che il farmaco era in grado di bloccare in vitro l'attività chinastica sia di KIT WT sia di un'isoforma mutante di KIT (una mutazione nell'esone 11)¹⁹⁰. La seconda osservazione era che l'imatinib inibiva la crescita della linea cellulare GIST882 contenente una mutazione di KIT, ricavata da un GIST metastatico^{191,192}.

Sulla base di questi studi preclinici, nel marzo 2000 l'imatinib fu somministrato ad una donna di 50 anni con metastasi epatiche di GIST alla dose giornaliera di 400 mg¹⁹³.

La risposta biologica in questa paziente fu monitorata tramite agobiopsie delle metastasi epatiche: la valutazione di CD117 e Ki67 dimostrò una drastica riduzione nel numero di cellule c-kit positive proliferanti. La RMN rivelò una diminuzione della dimensione tumorale del 41% due settimane dopo l'inizio del Glivec, del 75% dopo 8 mesi e >80% dopo 14 mesi.

Una risposta completa al farmaco fu osservata in 6 delle 28 metastasi epatiche originali, che scomparvero totalmente, e non furono rilevate nuove lesioni alla RMN.

La FDG-PET praticata 4 settimane dopo l'inizio della terapia dimostrò una marcata attenuazione del segnale metabolico nelle lesioni metastatiche epatiche.

Il farmaco fu ben tollerato da questa paziente; questi incoraggianti risultati condussero alla rapida organizzazione degli studi di fase I e II.

Nell'agosto 2000 la *“European Organisation for Research and Treatment of Cancer Soft Tissue and Bone Sarcoma Group”* (EORTC-STBSG) iniziò uno studio multinazionale di fase I¹⁹⁴ del Glivec per i pazienti con sarcoma dei tessuti molli avanzati, inclusi i pazienti con GIST.

L'obiettivo primario del trial era stabilire la massima dose tollerata di Glivec, quello secondario consisteva nel valutare l'efficacia del farmaco nel trattamento dei GIST.

Quaranta pazienti, di cui 36 con GIST, furono trattati con dosi da 400 mg a 1000 mg al die, continuando la terapia fino alla progressione, alla tossicità o al rifiuto del paziente a procedere.

Nei pazienti con GIST si ottennero i seguenti risultati: risposta parziale nel 52,7% dei casi, con miglioramento clinico già dopo una settimana di terapia, malattia stabile nell'19% e progressiva nell'11% dei casi (secondo i criteri RECIST o SWOG).

La dose di 1000 mg giornalieri risultò essere quella limitante per la tossicità (soprattutto nausea e vomito); mentre la dose orale di 800 mg era sicura e tollerabile per la maggior parte dei pazienti con GIST.

Risultati simili furono riportati nello studio clinico multicentrico di fase II (CSTI571B 2222)¹⁹⁵ iniziato nel luglio 2000, che confrontava due dosi giornaliere di 400 e 600 mg.

Furono arruolati 147 pazienti con GIST kit-positivo, avanzato e non resecabile.

Fu osservata risposta parziale nel 54% dei pazienti, malattia stabile nel 28% dei casi e progressione di malattia nel 14%; in nessun paziente si riscontrò una risposta completa. Il tasso di sopravvivenza globale a 2 anni fu del 87% e non si rilevò una differenza significativa nella tossicità o nella risposta tra le due dosi farmacologiche.

L'imatinib è risultato sicuro e generalmente ben tollerato nei pazienti con GIST, sebbene quasi tutti i pazienti hanno riferito almeno un effetto collaterale minore. La maggior parte degli effetti collaterali sono stati lievi-moderati, quelli gravi si sono verificati nel 21% dei pazienti. Gli effetti collaterali più frequentemente riportati sono stati: edema (generalmente periorbitale o all'estremità inferiori), nausea, diarrea, crampi muscolari, astenia, rash, dolore addominale e emorragie digestive o intraddominali.

Sulla base dei risultati di questi studi l'associazione americana "*Food and Drug Administration*" (FDA) il 1 febbraio 2002 ha approvato l'uso dell'imatinib alla dose giornaliera di 400 o 600 mg per il trattamento dei GIST CD117-positivi non resecabili e/o metastatici.

Lo studio di fase II di *Doi et al.*¹⁹⁶ riportò risposta parziale nel 41% dei pazienti, stabilità di malattia (SD) nel 30% dei casi e un caso di progressione di malattia (PD).

Gli studi di fase III (Tab. 1.14) sull'utilizzo dell'imatinib nei GIST sono qui di seguito riportati:

1. lo studio intergruppo nordamericano S0033¹⁹⁷ che ha paragonato gli effetti di due diverse dosi dell'imatinib (400 mg vs 800 mg al die) in pazienti con GIST non resecabile o metastatico. Questo lavoro ha fornito tassi di risposta simili nei bracci 400 (43%) e 800 mg (41%), con una sopravvivenza globale a 2 anni rispettivamente del 78 e 73%.

I più comuni effetti avversi sono stati rash, edema e sanguinamento gastrointestinale; nel 23% dei pazienti sono stati moderati/severi.

2. lo studio dell' EORTC-STBSG / *Italian Sarcoma Group* (ISG / *Australian Gastro-Intestinal Trial Group* (AGITG)¹⁹⁸ iniziato nel marzo 2001 per valutare alte (800 mg) e basse dosi (400 mg) di imatinib. Il tasso di risposta è stato del 50% nel gruppo 400 mg e 65% in quello 800 mg, la sopravvivenza libera da malattia rispettivamente del 44 e 50% (p=0,026) e la sopravvivenza globale a 2 anni del 69 e 74%. I risultati dimostravano quindi una superiorità delle alti dosi di imatinib.

Almeno un evento avverso di grado 3 o 4 è stato rilevato nel 32,3% dei pazienti trattati con 400 mg e nel 50,2 % dei trattati con 800 mg.

Gli effetti collaterali più comuni sono stati: anemia (93%), edema (80%), astenia (74%), nausea (50%), granulocitopenia (42%) e rash cutaneo (37%); più spesso di grado lieve o moderato.

3. lo studio del *French Sarcoma Group* (BRF14)¹⁹⁹ in cui i pazienti affetti da GIST metastatico o non resecabile sono stati randomizzati dopo un anno di terapia con imatinib a proseguire il trattamento o sospendere il farmaco. Il 66% dei pazienti che sospese l'imatinib hanno avuto PD rispetto al 15,4% di quelli che hanno proseguito il trattamento. Non è stata dimostrata una differenza statisticamente significativa in termini di sopravvivenza globale tra i due gruppi.

Tabella 1.14 Dati di risposta e sopravvivenza da trial clinici randomizzati di fase II e III sull'utilizzo dell'imatinib in GIST avanzati o metastatici

TRIAL	DOSE GIORNALIERA (mg)	NUM.PZ	RR (%)	SDR (%)	PFS a 2 anni (%)	OS a 2 anni (%)
Trial di fase II						
Doi et al. 2004	400	28	55	41	NR	NR
	600	46		41		
Demetri et al. 2002	400	73	49	32	NR	87
	600	74	58	24		
Trial di fase III						
EORTC-ISG-AGITG	400	473	50	NR	44	69
	800	473	65		50	74
INTERGROUP STUDY S0033	400	746	43	32	NS	78
	800		41	32		73
FRENCH SARCOMA GROUP	400	159	52	36	NR	NR

Note: RR (response rate)= CR+PR/numero arruolati, SDR= stable disease rate, PFS= progression free survival, NR= non riportato, NS= statisticamente non significativo OS= overall survival

Attualmente l'imatinib è approvato per il trattamento di GIST non operabili, recidivi o metastatici alla dose di 400 mg / die ed è indicato un incremento di

dosaggio fino a 800 mg / die in caso di resistenza primaria o secondaria e nei casi con mutazioni in esone 9 di KIT .

Non vi sono dati per definire la durata massima della terapia con imatinib, mentre è noto che l'interruzione dopo un anno di trattamento è seguita da ripresa di malattia. Pertanto il trattamento va protratto indefinitamente fino a progressione di malattia o tossicità.

Sebbene l'imatinib arresti la progressione di malattia nella maggioranza dei pazienti, le risposte complete sono rare (0-4%); prevalgono le remissioni parziali o la malattia stabile. Il farmaco dovrebbe essere quindi considerato come un agente oncostatico piuttosto che citotossico.

I principali parametri predittivi di risposta tumorale all'imatinib sono: il miglioramento della sintomatologia clinica durante il trattamento, la riduzione di densità della massa alla TC con mezzo di contrasto (m.d.c.) e la diminuzione della captazione di FDG alla PET.

La FDG-PET è una indagine strumentale sensibile nell'individuare precocemente la risposta tumorale, anche dopo una settimana di terapia, ma secondo le linee guida NCCN 2018 la PET non costituisce un sostituto della TC. La valutazione della risposta all'imatinib può essere realizzata mediante TC e/o RMN o nei casi dubbi tramite PET/TC.

I criteri dimensionali classici di risposta ai trattamenti antitumorali (RECIST e SWOG) non sono completamente utilizzabili nella valutazione della risposta dei GIST alla terapia con imatinib. L'aumento di dimensioni o la comparsa di lesioni prima non evidenti, con caratteri di ridotta densità possono comunque essere espressione di risposta al trattamento. Tali eventi sono attribuibili ad emorragia, edema o degenerazione mixoide all'interno del tumore. *Vanel et al.*²⁰⁸ hanno rilevato che la diminuzione della densità e dell'arricchimento contrastografico con presenza di lesioni cistiche stabili alla TC è un segno di risposta farmacologica in pazienti con metastasi epatiche o peritoneali, caratterizzate prima dell'inizio della terapia con imatinib da impregnamento concentrico del m.d.c.. E' quindi necessario integrare i tradizionali criteri RECIST con quelli introdotti da Choi nel 2004²⁶⁶ che considerano oltre alle dimensioni anche la misurazione della densità delle lesioni alla TC.

Le linee guida in oncologia del “*National Comprehensive Cancer Network*” (NCCN) v.1.2018 raccomandano nei pazienti divenuti resistenti o intolleranti

all'imatinib l'uso di SUNITINIB malato, che è un inibitore di molte tirosin-chinasi come KIT, PDGFR e "*vascular endothelial growth factor*" (VEGF)^{200,201}, RET e FLT3.

In un recente trial randomizzato di fase III, sunitinib ha determinato beneficio clinico significativo nel 65% dei pazienti resistenti o intolleranti all'imatinib con un miglioramento del tempo medio di progressione (27,3 vs 6,4 settimane) e della sopravvivenza globale^{202,203}.

Il farmaco va utilizzato alla dose di 50 mg/die ed è generalmente ben tollerato.

Alla progressione di malattia dopo Sunitinib, è attualmente approvato dal FDA come terza linea di trattamento il REGORAFENIB, un altro inibitore multichinasico con attività contro KIT, RET, RAF1, BRAF, VEGFR1-3, TEK, MAPK e PDGFR. Il dosaggio del farmaco è di 160 mg/die. Uno studio recente di fase II ha dimostrato una attività significativa del regorafenib, con una mediana di DFS di 10 mesi, in pazienti con GIST metastatici non responsivi ad imatinib e sunitinib²⁸⁷.

TERAPIA NEO-ADIUVANTE

Secondo le raccomandazioni delle linee guida in oncologia del NCCN v.1.2018 la terapia neo-adiuvante con imatinib è indicata nei casi di GIST reseccabili con mutilazioni o sacrifici d'organo, con l'intento di ridurre le lesioni e consentire una chirurgia conservativa.

La risposta alla terapia deve essere valutata precocemente (dopo 2-4 settimane): se il tumore risponde è indicato proseguire fino al raggiungimento della risposta massima, che solitamente si verifica in 3-6 mesi e quindi procedere con la resezione chirurgica. Se non c'è risposta tumorale o si verifica progressione confermata dalla TC, è raccomandata l'asportazione chirurgica dopo l'interruzione dell'imatinib.

TERAPIA ADIUVANTE

Secondo le linee guida NCCN la terapia adiuvante con imatinib dopo la resezione completa macroscopica di malattia localizzata può essere considerata nei pazienti con tumori a rischio intermedio-alto sec. Miettinen³²⁹ (non sottoposti a terapia neo-adiuvante) e proseguita nei pazienti in cui era stata già intrapresa a scopo neo-adiuvante.

L'anticipazione della terapia con imatinib potrebbe essere in grado di eradicare la malattia microscopica e condurre alla guarigione, ma potrebbe anche indurre la comparsa di cloni cellulari farmaco-resistenti.

Sono disponibili i risultati di 3 studi randomizzati di fase III sulla terapia adiuvante con imatinib: il primo lavoro (De Matteo 2009) confrontava un trattamento adiuvante con imatinib 400 mg per un anno vs placebo in pazienti con GIST localizzato e di diametro maggiore di 3cm dopo resezione chirurgica macroscopicamente completa. Lo studio ha dimostrato un vantaggio nei pazienti ad alto rischio trattati con imatinib in termini di sopravvivenza libera da recidiva (DFS) ma non di sopravvivenza globale (OS). Il secondo lavoro³⁰⁶ ha riportato che la terapia adiuvante con imatinib per 3 anni rispetto ad un anno dà un vantaggio sia in termini di DFS sia di OS nei pazienti ad alto rischio. Il terzo studio³⁹⁰ ha confrontato 2 anni di trattamento adiuvante con imatinib rispetto alla sola osservazione in pazienti affetti da GIST radicalmente resecati a rischio intermedio o alto, ma senza dimostrare un vantaggio in termini di tempo libero al fallimento di imatinib ovvero di inizio di un altro farmaco inibitore delle TK (fattore surrogato della sopravvivenza globale).

Sulla base dei risultati di questi studi secondo l'AIOM la terapia adiuvante con imatinib per 3 anni può essere applicata nei pazienti con GIST a rischio alto.

TRATTAMENTO DELLE RECIDIVE

Prima dell'introduzione dell'imatinib, l'unico trattamento disponibile per i GIST metastatici era la chirurgia, dal momento che questa neoplasia è resistente alla radioterapia e chemioterapia. Nessun dato della letteratura attuale indica che la chirurgia da sola sia in grado però di curare i GIST avanzati.

Nei pazienti che dimostrano risposta o stabilità di malattia prolungata al trattamento con imatinib, o in quelli resistenti, si può considerare l'approccio chirurgico esclusivamente se è possibile asportare tutto il tumore visibile, cioè se la recidiva è isolata e potenzialmente reseccabile, al raggiungimento della massima risposta all'imatinib, che di solito si verifica tra il quarto e il dodicesimo mese dopo l'inizio della terapia.

Questa procedura è considerata ancora sperimentale, quindi deve essere praticata da un team multidisciplinare esperto in materia.

Lo studio di *Raut et al.*¹⁸⁷ ha dimostrato infatti che i GIST avanzati con malattia stabile (“*stable disease*”o SD) o progressione limitata in corso di terapia con imatinib e sunitinib hanno una sopravvivenza globale prolungata dopo procedure chirurgiche di debulking; mentre la chirurgia ha un ruolo molto limitato nel caso di progressione generalizzata di malattia.

Per confermare questa osservazione saranno necessari nuovi trial clinici che valutino l'utilità dell'approccio chirurgico all'esordio della progressione limitata, con lo scopo di ritardare l'inizio di una seconda linea chemioterapica.

Le metastasi possono essere asportate chirurgicamente o trattate con procedure sperimentali, quali l'ablazione con radiofrequenze o la chemioembolizzazione. *DeMatteo et al.*⁶¹ hanno riportato in 80 pazienti trattati con resezioni curative, recidive locali isolate nel 33% dei casi, metastasi isolate nel 48% e entrambe nel 19%. Le metastasi avevano sede nel fegato nel 65% dei casi, nel peritoneo nel 21%, nei linfonodi nel 6%, nello scheletro nel 6% e nel polmone nel 2%.

Le recidive peritoneali tendono ad avere una disseminazione di tipo superficiale e scarsa tendenza all'infiltrazione in profondità o verso gli organi adiacenti. Risultano in tal modo facilmente aggredibili chirurgicamente, ma la resezione è seguita da ulteriore recidiva praticamente nella totalità dei casi¹⁷⁹.

La sopravvivenza mediana dei pazienti con GIST metastatico è stata stimata in studi pre-imatinib di 19 mesi, mentre nei casi con recidiva locale è di 9-12 mesi^{24,61}.

Nei pazienti con progressione generalizzata di malattia si deve procedere all'incremento del dosaggio della terapia con imatinib (800 mg) o passare al sunitinib e valutare successivamente la risposta terapeutica.

Nei casi di progressione tumorale nonostante la terapia con imatinib o sunitinib si può considerare il trattamento con Regorafenib: questi tre farmaci sono gli unici approvati dal FDA per il trattamento dei GIST. Nel caso di fallimento della terapia con Regorafenib le linee guida del NCCN 2018 suggeriscono di considerare altre opzioni terapeutiche, sia pur basate su limitati dati: Sorafenib^{346, 339}, Nilotinib (^{338, 339, 364}), Dasatinib (per pazienti con la mutazione D842V), Pazopanib³⁴⁵ ed Everolimus in combinazione con uno dei tre farmaci inibitori approvati.

Sorafenib è una piccola molecola capace di inibire le chinasi KIT, VEGFR, PDGFR, FLT3, RET e BRAF; Nilotinib è un farmaco che blocca l'attività di KIT,

PDGFRA e BCR/ABL; Dasatinib è un potente inibitore di BCR/ABL, KIT, PDGFR e delle chinasi della famiglia Src; Pazopanib agisce contro KIT, PDGFRA e VEGFR1-3; mentre Everolimus è un inibitore di mTOR, una proteina a valle nel signalling di KIT e PDGFRA.

MUTAZIONI E RISPOSTA ALL'IMATINIB

Lo stato mutazionale di KIT e PDGFRA è predittivo di risposta clinica all'imatinib, come dimostrato dallo studio di *Corless et al.*¹⁴⁴, che hanno analizzato le mutazioni di KIT (esoni 9, 11, 13 e 17) e PDGFRA (esoni 12 e 18) in 127 pazienti con GIST avanzato arruolati nel trial multicentrico CSTI571B 2222¹⁹⁵. Pertanto l'analisi mutazionale è imprescindibile prima di avviare il trattamento con imatinib (Tab.1.15).

Tabella 1.15 Correlazioni tra lo stato mutazionale e la risposta farmacologica all'imatinib³¹³

Table 5. KIT and PDGFRA genotypes, *in vitro* sensitivity to imatinib and response to imatinib treatment based on previously published studies from US and European clinical trials

Gene	Exon	Primary KIT and PDGFRA mutations identified in GISTs from imatinib clinical trials (n)	Sensitivity to imatinib mesylate
KIT	9	Ala502_Tyr503dup	Sensitive to imatinib <i>in vitro</i> ²⁹ Complete remission in 5%, partial response in 29%, stable disease in 47%, progressive disease in 17% as reported by EORTC phase III trial ⁸⁴ A high-dose regimen increased progression-free survival ⁸⁴
	11	Deletion/deletion-insertion Substitution Duplication	Most common mutants sensitive to imatinib <i>in vitro</i> ²⁹ Rare Val559Ile mutant resistant to imatinib <i>in vitro</i> ⁷⁷ Complete remission in 6%, partial response in 61%, stable disease in 25%, progressive disease in 3% as reported by EORTC phase III trial ⁸⁴
	13	Lys642Glu (8) Glu635Lys (1)	Sensitive to imatinib <i>in vitro</i> ²⁹ Partial response or stable disease reported in all nine cases ^{29,3,5,84}
	17	Asp820Tyr (1) Asn822Lys (2) Asn822His (2)	Asn822Lys and Asn822His sensitive to imatinib <i>in vitro</i> ²⁹ Partial response reported in four mutants including Asp820Tyr, Asn822Lys, Asn822His ^{29,84} Primary resistance reported in Asn822Lys mutant ²⁷
PDGFRA	12	Asp561Val (4) Deletion/deletion-insertion Duplication, insertion	Asp561Val and some other exon 12 mutants tested sensitive to imatinib <i>in vitro</i> ^{30,117} Objective response reported in the majority of a few cases treated with imatinib ^{29,84}
	14	Asn659Lys	This mutant tested sensitive to imatinib <i>in vitro</i> ³⁰ No clinical experience
	18	Asp842_His845del (2) Asp842_Met844del (1) Ile843del (1) Ile843_His845del (1) Asp842Val (7) Asp846Val (1)	Some of these and similar mutants tested sensitive to imatinib <i>in vitro</i> ^{30,117} Objective response reported in the majority of a few cases treated with imatinib ^{29,84} Asp842Val resistant to imatinib <i>in vitro</i> ^{29,30,117} Resistance reported in seven cases including Asp846Val ^{29,3,5,84} ; stable disease in one case after 5 months of imatinib treatment ³⁵
KIT PDGFRA	9, 11, 13, 17 12, 14, 18	Wild-type Wild-type	Partial response in 23%, stable disease in 50%, and progressive disease in 19% as reported by EORTC phase III trial ⁸⁴

Nei pazienti con mutazioni nell'esone 11 di KIT si è ottenuta una percentuale maggiore di risposte all'imatinib (83,5%) rispetto ai casi con mutazioni nell'esone 9 (47,8%) o a quelli KIT e PDGFRA WT (0%). I pazienti con mutazioni nell'esone 9 di KIT, per raggiungere risultati terapeutici simili a quelli mutati nell'esone 11, devono essere trattati con una dose superiore di imatinib (800 mg). Il tasso di risposta al sunitinib è invece maggiore per i casi con mutazioni nell'esone 9.

Queste differenze si traducevano in una sopravvivenza libera da malattia (PFS) e globale più prolungata nel gruppo mutante nell'esone 11 (PFS mediana = 687 giorni) rispetto agli altri due gruppi, ovvero mutanti nell'esone 9 (PFS mediana = 200 giorni) e KIT e PDGFRA-WT (PFS mediana = 82 giorni).

Questi risultati sfavorevoli di risposta clinica e sopravvivenza suggeriscono che i GIST KIT e PDGFRA-WT costituiscano un'entità biologicamente distinta.

La scarsa sensibilità all'imatinib osservata nei pazienti con GIST KIT/PDGFRA WT è stata correlata ad una caratteristica conformazionale intrinseca dei recettori KIT e PDGFRA WT il cui dominio ATP dimostra infatti una affinità inferiore per l'imatinib³⁵¹.

I tassi di PR e PFS differenti tra i pazienti mutati nell'esone 9 e 11 di KIT sono in disaccordo però con i dati di eguale sensibilità in vitro delle rispettive oncoproteine KIT all'imatinib. Studi preliminari¹⁴⁵ ipotizzano differenze nella segnalazione a valle del recettore nei GIST mutati nell'esone 9 e 11, che potrebbero influenzare la suscettibilità delle cellule tumorali all'apoptosi in risposta alla soppressione chinasi operata dall'imatinib.

Alternativamente i meccanismi di attivazione per i KIT-esone 9 mutanti potrebbero variare in vitro e in vivo.

Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative nei tassi di risposta tra il gruppo di pazienti con mutazioni puntiformi nell'esone 11 e quello con delezioni nello stesso esone e anche tra le due diverse dosi di imatinib somministrate.

Sono stati valutati un numero troppo basso di pazienti con mutazioni nell'esone 13 o 17, per avere risultati significativi.

I pazienti con mutazioni puntiformi D842V nell'esone 18 di PDGFRA sono resistenti all'imatinib in vivo e in vitro^{15,16}; gli studi in vitro ed in vivo di *Prenen*

*et al.*²⁰⁹ hanno dimostrato che questo tipo di mutazione conferisce anche resistenza a sunitinib.

Globalmente il tasso di risposte nei pazienti con una mutazione di KIT o PDGFRA sensibile all'imatinib è stato del 75,7% (87/115 pazienti), mentre nei casi senza mutazioni o con mutazioni resistenti all'imatinib è stato dello 0% (0/12 pazienti).

Lo studio di *Corless et al.*¹⁵² ha però dimostrato che le mutazioni nell'esone 12 e nell'esone 18 di PDGFRA, in codoni diversi dall' 842, sono sensibili in vitro all'imatinib.

Si parla di resistenza primaria o precoce nei casi di GIST che mostrano crescita continua o crescita entro 6 mesi dalla terapia con imatinib, generalmente perchè portatori di genotipo KIT-WT (mutazioni in BRAF, RAS o NF1 o inattivazione di SDH), di mutazioni dell'esone 9 di KIT o della mutazione D842V dell'esone 18 di PDGFRA.

Per resistenza secondaria si intende invece il meccanismo per cui dopo un periodo variabile di terapia con imatinib, solitamente dopo il sesto mese di trattamento, la malattia cessa di rispondere al farmaco²⁷. La resistenza secondaria può essere globale su tutti i focolai di malattia o solo su alcuni o anche su parti delle singole lesioni.

Infatti dopo un tasso iniziale di alto controllo della malattia entro 2-3 anni dall'inizio del trattamento la maggior parte dei pazienti con GIST sviluppa resistenza all'imatinib e questo dato costituisce la sfida più grande nella gestione clinica di questi tumori.

Attualmente sono stati identificati tre meccanismi principali alla base della resistenza secondaria all'imatinib.

Il primo è l'acquisizione di mutazioni puntiformi secondarie in KIT o PDGFRA, che conferiscono resistenza farmacologica. Le mutazioni secondarie in KIT sono rare nella resistenza primaria mentre sono osservate in circa il 50-67% dei pazienti con resistenza secondaria. *Antonescu et al.*²⁰⁴ hanno riscontrato in 7 casi su 15 di GIST con resistenza acquisita, mutazioni secondarie in aggiunta a quella primaria nell'esone 11 di KIT, in particolare sostituzioni di un singolo amminoacido nell'esone 17 (6/7). In 13 casi non resistenti e in 3 con resistenza primaria non sono state invece identificate mutazioni secondarie.

La sede delle mutazioni secondarie potrebbe stabilizzare la conformazione attiva della chinasi KIT, bloccando il legame dell'imatinib, oppure le mutazioni secondarie potrebbero interferire con il legame del farmaco senza modificare la conformazione strutturale recettoriale. Infatti 5 delle 7 mutazioni secondarie erano localizzate nell' "activation loop" (esone 17) stabilizzando la conformazione attiva del dominio, che non può essere così inibita dall'imatinib, che invece lega l'isoforma inattiva. Inoltre una delle 7 mutazioni acquisite alterava specificatamente il sito di legame del farmaco, tramite l'impedimento della formazione di un importante legame ad idrogeno tra l'imatinib e il recettore.

*Chen et al.*²⁰⁵ hanno rilevato un'incidenza di mutazioni secondarie nella resistenza acquisita del 100%, localizzate nell'esone 13 di KIT e associate a mutazioni primarie degli esoni 9 e 11.

*Debiec-Rychter et al.*²⁰⁷ oltre a confermare i dati precedenti di *Antonescu et al.*²⁰⁴ hanno rilevato in un caso la presenza della mutazione acquisita D842V di PDGFRA. Complessivamente le mutazioni secondarie sono riscontrate nel 73-86% dei pazienti resistenti all'imatinib con mutazione nell'esone 11 di KIT mentre solo nel 19-33% di quelli con mutazioni nell'esone 9.

In alcuni casi sono state riportate differenti mutazioni in diverse lesioni o l'evoluzione simultanea di multipli cloni in un singolo campione tumorale³⁸³.

Un secondo meccanismo di resistenza secondaria, possibile spiegazione anche per alcuni casi di resistenza primaria, consiste nell'amplificazione genomica di KIT^{206,207}, anche se con una frequenza nettamente inferiore.

Il terzo meccanismo di resistenza secondaria potrebbe essere l'attivazione di un recettore tirosina-chinasi alternativo, ancora sconosciuto e la perdita dell'espressione della proteina KIT²⁰⁶.

Recentemente è stato infatti riportato in vitro che mutazioni di BRAF e KRAS potrebbero influenzare la risposta all'imatinib di cellule con mutazioni di KIT sensibili³³⁵, determinando la resistenza al trattamento. Nello studio è stato infatti riportato per la prima volta la presenza di mutazioni in KRAS e BRAF in pazienti con GIST presentanti mutazioni concomitanti in KIT e PDGFRA. E' stato poi dimostrato in vitro come cellule esprimenti una mutazione di KIT sensibile all'imatinib non rispondevano più al farmaco introducendo mutazioni in KRAS o BRAF. L'identificazione di queste mutazioni potrebbe quindi avere un significato

clinico suggerendo la scelta di trattamenti alternativi con altri inibitori delle tirosina-chinasi.

Un altro studio recente³¹⁵ ha dimostrato la presenza di mutazioni di PIK3 in circa il 2% di GIST non trattati con imatinib (10/529 casi), caratterizzati da grandi dimensioni e sopravvivenza ridotta. PI3KCA è una proteina parte della pathway a valle di KIT. Tali mutazioni potrebbero quindi costituire un altro meccanismo alla base della progressione e dello sviluppo di resistenza nei GIST.

c) FOLLOW-UP

Non vi è consenso sul tipo di follow-up da adottare dopo l'intervento chirurgico per GIST e attualmente non esistono schedule ottimali di follow-up basate su prove di efficacia. La valutazione del rischio può essere utile nella scelta della modalità di organizzazione del follow-up. Nelle linee guida AIOM 2016 si consiglia di effettuare una TC dell'addome ogni 6 mesi durante la terapia adiuvante, mentre dopo il termine del trattamento il controllo strumentale è indicato ogni 3-4 mesi per 2 anni, poi ogni 6-12 mesi fino a 10 anni dalla fine della terapia. Per i tumori a basso rischio non esistono dati circa l'utilità o meno del follow-up strumentale: nel caso venga attuato è consigliabile una TC ogni 6-12 mesi per 5 anni. In caso di "microGIST" con potenziale maligno minimo o assente è suggerito dall'AIOM un follow-up endoscopico/eco-endoscopico ogni 6-12 mesi procedendo all'escissione chirurgica solo dei tumori in incremento dimensionale o alla comparsa di sintomi o secondo le linee guida NCCN 2018 in caso di caratteristiche di alto rischio all'ecoendoscopia (come contorni irregolari, spazi cistici, ulcerazioni, foci ecogenici ed eterogenità).

PARTE II

“KIT AND PDGFRA MUTATIONS AND PDGFRA IMMUNOSTAINING IN GASTROINTESTINAL STROMAL TUMORS”

Nel 2011 abbiamo condotto uno studio con l'obiettivo di identificare parametri riproducibili ed utili ai fini prognostici nell'analisi di dati clinici, immunohistologici e di biologia molecolare in una casistica di GIST e secondariamente di valutare la concordanza tra i risultati delle analisi immunohistochemiche e molecolari.

A) MATERIALI E METODI

Sono stati esaminati i dati relativi ad una casistica retrospettiva comprendente 40 casi di GIST, afferiti ai reparti di Chirurgia Generale dell'A.S.O. San Giovanni Battista di Torino tra maggio 1994 e dicembre 2004. Sono stati raccolti i dati clinici alla diagnosi e nel corso del follow-up.

E' stata valutata, mediante immunohistochemica, l'espressione di CD117, CD34, Actina muscolare liscia, Vimentina, Desmina, Ki-67, CD44, S100, PDGFRA sui preparati istologici dei tumori primitivi e di 11 recidive di malattia (per il Ki-67). I tumori sono stati classificati in base al rischio di comportamento aggressivo sec. Fletcher²⁶.

L'analisi molecolare dei geni KIT (esoni 9,11,13 e 17) e PDGFRA (esoni 12 e 18) è stata condotta utilizzando la metodica BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, AB). E' stata valutata la correlazione tra i parametri clinico-patologici, immunohistochemici e molecolari e la presenza di recidiva ed è stata realizzata l'analisi uni e multivariata di “disease free survival” (DFS).

B) RISULTATI.

-Analisi descrittive e confronto tra i gruppi

Le mutazioni in KIT, presenti in 26 pazienti (65%), sono state suddivise in due gruppi: mutazioni a basso ed alto rischio. Le mutazioni a basso rischio (LR)

comprendevano 6 casi con mutazioni puntiformi, 3 casi con mutazioni puntiformi insieme con delezioni e 3 casi con duplicazioni, mentre quelle ad alto rischio (HR) includevano 13 campioni con delezioni ed uno con inserzione (Tab. 2.1) Le mutazioni nel gene PDGFRA sono state riscontrate in 6 pazienti (15%) e comprendevano 4 delezioni e 2 sostituzioni. 8 pazienti (20%) erano KIT-PDGFRA WT.

E' stato dimostrato come i GIST PDGFRA mutati abbiano indice mitotico e proliferativo Ki67 ridotti e più piccole dimensioni rispetto a quelli con mutazioni KIT-HR (p=0.01).

Alla diagnosi, l'83,3% dei pazienti con mutazioni di PDGFRA erano asintomatici, a differenza di solo il 25% dei casi KIT/PDGFRA WT e del 16,7% di quelli con mutazioni KIT-HR (p=0.02). L'invasione di organi adiacenti, al momento dell'intervento chirurgico, era presente nel 35,7% dei casi con mutazioni KIT-HR e nel 12,5% di quelli KIT-PDGFRA WT, mentre era assente nei pazienti PDGFRA mutati o con KIT-LR (p=0.04). Metastasi a distanza (sincrone o metacrone) sono state osservate nel 50% dei casi KIT-HR, nel 37,5% di quelli KIT-PDGFRA WT e solo nel 16,7% di quelli PDGFRA mutati ed in nessun paziente con KIT-LR (p=0.03).

Durante il follow-up (medio di 39,6 mesi, range 2-99) 10 (25%) pazienti hanno presentato recidiva di malattia, mentre i restanti 30 casi (75%) erano liberi da malattia.

Si sono verificate recidive di malattia nel 50% dei casi KIT-PDGFRA mutati, nel 35,7% di quelli con KIT-HR e solo nel 16,7% di quelli PDGFRA mutati mentre erano assenti nei casi KIT-LR (p=0.05).

La positività immunoistochimica intensa con pattern “dot-like” (accentuazione peri-nucleare) per PDGFRA è stata evidenziata solo in 5 dei 6 casi PDGFRA mutati (83,3%) ma in nessun caso con KIT HR/LR e KIT-PDGFRA WT (p< 0.0001).

Table I. Association between type of *KIT/PDGFR*A mutation and clinicopathological variables.

Variable	<i>PDGFRA</i> deletions/ substitutions (n=6)	<i>KIT</i> HR deletions/ insertion (n=14)	<i>KIT</i> LR substitutions/ deletion-substitutions/ duplications (n=12)	<i>KIT</i> / <i>PDGFRA</i> wild-type (n=8)	
Variable	No. (%)	No. (%)	No. (%)	No. (%)	
Symptoms at diagnosis					
Present	1 (16.7)	11 (78.6)	10 (83.3)	6 (75.0)	$\chi^2=9.73$ p=0.02
Absent	5 (83.3)	3 (21.4)	2 (16.7)	2 (25.0)	
Site					
Stomach	6 (100)	7 (50.0)	9 (75.0)	7 (87.5)	$\chi^2=6.77$ p=0.07
Other	0 (0)	7 (50.0)	3 (25.0)	1 (12.5)	
Histologic type					
Spindle cell	1 (16.7)	10 (71.4)	8 (66.7)	6 (75.0)	$\chi^2=6.47$ p=0.09
Non-spindle cell	5 (83.3)	4 (28.6)	4 (33.3)	2 (25.0)	
Risk of aggressive behavior					
Very low	1 (16.7)	2 (14.3)	0 (0)	1 (12.5)	$\chi^2=13.45$ p=0.14
Low	3 (50.0)	0 (0)	4 (33.3)	1 (12.5)	
Intermediate	2 (33.3)	3 (21.4)	4 (33.3)	2 (25.0)	
High	0 (0)	9 (64.3)	4 (33.3)	4 (50.0)	
Adjacent organ invasion at diagnosis					
Present	0 (0)	5 (35.7)	0 (0)	1 (12.5)	$\chi^2=7.92$ p=0.04
Absent	6 (100)	9 (64.3)	12 (100)	7 (87.5)	
Distant metastasis					
Present	1 (16.7)	7 (50.0)	0 (0)	3 (37.5)	$\chi^2=8.86$ p=0.03
Absent	5 (83.3)	7 (50.0)	12 (100)	5 (62.5)	
Relapse					
Present	1 (16.7)	5 (35.7)	0 (0)	4 (50.0)	$\chi^2=7.74$ p=0.05
Absent	5 (83.3)	9 (64.3)	12 (100)	4 (50.0)	
PDGFRA immunostaining					
Negative	0 (0)	9 (64.3)	5 (41.7)	3 (37.5)	$\chi^2=7.23$ p=0.06
Positive	6 (100)	5 (35.7)	7 (58.3)	5 (62.5)	
PDGFRA 'dotlike' immunopositivity					
Present	5 (83.3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	$\chi^2=32.38$ p<0.0001
Absent	1 (16.7)	14 (100)	12 (100)	8 (100)	
Variable	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD	
Size (cm)	3.16 \pm 1.32 ^a	8.57 \pm 6.84 ^b	6.41 \pm 3.05 ^c	4.62 \pm 2.26	p=0.08
Mitotic index	3.5 \pm 2.58 ^d	30.35 \pm 35.96 ^e	6.58 \pm 7.56 ^f	22.75 \pm 37.1	p=0.09
Ki67 score	3.0 \pm 1.67 ^g	9.5 \pm 7.9 ^h	5.25 \pm 6.73	10.87 \pm 15.4	p=0.28

HR, high-risk group; LR, low-risk group. a vs. b, p=0.01; a vs. c, p=0.006; d vs. e, p=0.01; e vs. f, p=0.02; g vs. h, p=0.01.

Tab. 2.1 Correlazione tra lo stato mutazionale e le variabili clinico-patologiche²⁵⁴

-Analisi di sopravvivenza

Ad un intervallo di 3 anni di follow-up tutti i pazienti con mutazioni di PDGFRA o KIT-LR erano liberi da malattia mentre solo l'87% di quelli KIT/PDGFR A mutati e il 53% con KIT-HR non mostravano recidiva di malattia, anche se con una significatività statistica borderline (p=0.1). Tuttavia i pazienti con KIT-LR mostravano una DFS significativamente più lunga rispetto a quelli KIT/PDFRA WT (p=0.01) e KIT-HR (P=0.05) (Tab. 2.2).

La DFS a 3 e 5 anni dei pazienti positivi per PDGFRA era rispettivamente del 95% e 72% rispetto a solo il 63% e 42% dei casi negativi (p=0.04) (Tab.2.2 e Fig. 2.1).

Table II. Correlation of type of *KIT*/*PDGFRA* mutation and PDGFRA immunostaining with disease-free survival in GISTs.

Variable	No.	1-year DFS rate (%)	3-year DFS rate (%)	5-year DFS rate (%)	p-value
Whole series	40	92	81	58	
<i>PDGFRA</i> deletions/substitutions	6	100	100	75	
<i>KIT</i> LR (substitutions/deletion-substitutions/duplications) ^a	12	100	100	100	
<i>KIT</i> HR (deletions/insertion) ^b	14	85	53	53	0.10
<i>KIT</i> / <i>PDGFRA</i> wild-type ^c	8	87	87	29	
PDGFRA immunostaining					
Negative	17	87	63	42	
Positive	23	95	95	72	0.04

DFS, disease-free survival; HR, high-risk group; LR, low-risk group. a vs. b, p=0.05; a vs. c, p=0.01

Tab. 2.1 Correlazione tra lo stato mutazionale e l’espressione del PDGFRA con la DFS²⁵⁴

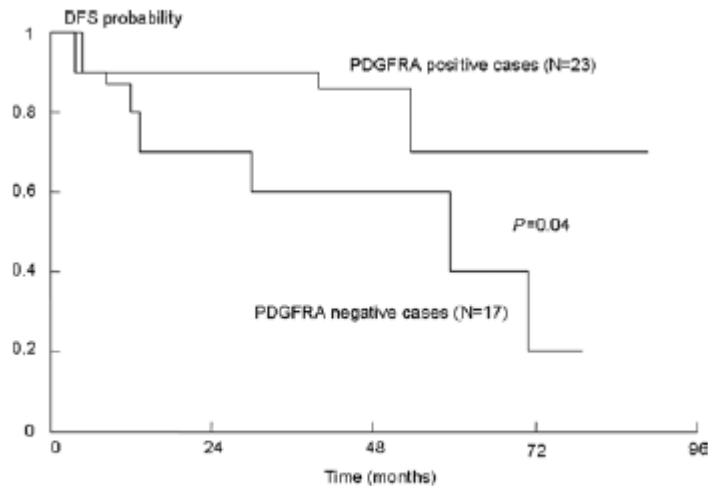


Figure 2. Actuarial probability of disease-free survival (DFS) for patients with GIST, categorized according to PDGFRA immunoreactivity.

Figura 2.1 Curve di Kaplan-Meyer di DFS in relazione all’espressione di PDGFRA²⁵⁴

L’indice mitotico è stato stratificato in 3 gruppi ($\leq 5/50$ HPF , 5-10 e $> 5/50$ HPF) mentre l’indice proliferativo MIB1 in 2 categorie ($\leq 5\%$ vs $> 5\%$) e sono risultati entrambi essere correlati con la DFS. L’indice proliferativo è risultato avere un

valore predittivo di rischio di recidiva maggiore dell'indice mitotico ($p = 0,003$ vs $p = 0,04$).

La sede tumorale è stata correlata in modo significativo con la DFS ($p=0.0004$): i casi di GIST gastrico dimostravano una migliore DFS rispetto a quelli dell'intestino tenue e crasso.

C) DISCUSSIONE.

I risultati dello studio dimostrano come i casi di GIST con mutazioni di KIT-HR siano un sottogruppo di tumori con comportamento biologico più aggressivo e ridotta DFS rispetto a quelli con KIT-LR. Sono infatti caratterizzati da maggiori dimensioni, un più alto indice mitotico, categorie di rischio alto sec. Fletcher²⁶ e correlati alla presenza di invasione degli organi adiacenti.

Questi dati sono in accordo con numerosi studi che hanno riportato una prognosi sfavorevole per i GIST con delezioni o inserzioni in KIT (Singer, Wardelmann, Iesalnieks, Martin²⁴⁹, Braconi,^{274,313}, Kontogianni-Katsarou), in particolare le delezioni interessanti i codoni 557-558. Infatti i nostri 2 casi con delezioni coinvolgenti questi codoni sono esorditi con malattia metastatica e deceduti rispettivamente dopo 6 e 11 mesi dall'intervento chirurgico.

Al contrario i casi PDGFRA mutati sono stati associati con comportamento biologico meno aggressivo e una più lunga DFS, in accordo con i dati riportati da limitati altri studi^{172, 329}. Mostrano infatti ridotta dimensione e indici mitotico e proliferativo inferiori rispetto ai pazienti con KIT-HR. Tutti i casi erano localizzati nello stomaco ed anche la sede gastrica, come già precedentemente dimostrato da altri lavori, è correlata ad una prognosi più favorevole. In accordo con lo stato mutazionale di PDGFRA i casi positivi per PDGFRA hanno dimostrato un atteggiamento prognostico favorevole. Inoltre la positività intensa “dot-like” per PDGFRA è risultata predittiva dello stato mutazionale di PDGFRA ed è tipicamente assente nei casi KIT mutati e negli altri tumori mesenchimali intraddominali, come osservato in altri studi^{217,219,220,350, 337}.

L'indagine immunoistochimica per PDGFRA, metodica meno costosa e di esecuzione più agevole rispetto all'analisi di biologia molecolare, potrebbe costituire un nuovo marker diagnostico e prognostico nella valutazione dei GIST, predittivo dell'evoluzione della malattia e della risposta al trattamento. Saranno

necessari ulteriori studi per validare i risultati ottenuti su una casistica più ampia e per spiegare la base biologica di questa particolare positività “dot-like”.

Barreca A, Fornari A, Bonello L, Tondat F, Chiusa L, Lista P and Pich A. KIT and PDGFRA mutations and PDGFRA immunostaining in gastrointestinal stromal tumors. Molecular Medicine REPORTS 4: 3-8, 2011²⁵⁴

PARTE III

3.1 LA CAVEOLINA-1

a) Caveole e caveolina-1

Le caveolae (dal termine latino per “piccole cavità”) sono strutture sub-cellulari che furono descritte nel 1953 da Palade come “vescicole plasmalemmali” con ruolo di trasporto di molecole attraverso l’endotelio³⁴⁴. Dalla loro scoperta la presenza di strutture caveole-like, rappresentate da invaginazioni regolari della membrana plasmatica a forma di fiasco od omega, venne identificata grazie alla microscopia elettronica, nella quasi totalità delle cellule, con eccezione dei globuli rossi, linfociti, piastrine²⁸⁵, cellule di neuroblastoma²⁹¹ ed alcuni tipi di cellule epiteliali³³⁶. Le caveolae sono infatti presenti sulla membrana cellulare della quasi totalità delle cellule ed in particolare nelle cellule di derivazione mesenchimale, come ad esempio le cellule endoteliali, gli adipociti e le cellule muscolari.

Le caveoline sono una famiglia di proteine strutturali (comprendenti caveolina 1, caveolina 2 e caveolina 3) che partecipano alla formazione delle caveolae. La scoperta della caveolina, come primo marcatore molecolare di caveole³⁵⁸ permise la realizzazione di studi biochimici, biologici e genetici mirati alla identificazione di queste strutture, discriminandole dalle altre vescicole lipidiche sulla membrana cellulare e definendone inoltre alcuni aspetti funzionali, quali coinvolgimento nei meccanismi di trafficking, nel trasporto, nella motilità e nella compartimentazione cellulare³⁴⁹.

Le caveole hanno distribuzione e densità variabile a seconda dei diversi tipi cellulari. Le cellule di natura mesenchimale, come le endoteliali, le cellule muscolari e gli adipociti, ne posseggono elevate quantità^{387,370}; le cellule in coltura, in particolar modo quelle trasformate in senso oncogenico sembrano invece esserne meno ricche, suggerendo un qualche ruolo critico nella crescita tumorale³¹⁶.

Le caveole al microscopio elettronico si presentano come vescicole tondeggianti sulla membrana plasmatica, del diametro di 50-100 nm, e ricoperte sul versante citoplasmatico da un rivestimento striato costituito da sottili filamenti paralleli.

La caveolina è il costituente principale di questo mantello.

La famiglia delle caveoline è costituita da varie proteine (caveolina 1- α e β -, caveolina 2, caveolina 3) codificate da tre geni diversi³⁷³. Nonostante ci sia una grande omologia strutturale e di funzione tra le varie isoforme, esiste però una diversa distribuzione tissutale. La maggior parte delle cellule differenziate mesenchimali ed endoteliali coesprime infatti le caveoline 1 e 2³⁶⁷ mentre nel tessuto muscolare scheletrico, cardiaco e nelle cellule muscolari lisce predomina invece la caveolina 3³⁸⁴. L'isoforma 2 non esiste singolarmente ma pare sia rapidamente distrutta nell'apparato di Golgi in assenza di caveolina 1³⁴⁷. Le caveole costituiscono una delle multiple "pathway" di endocitosi, ma non la via principale, e agiscono come un'alternativa alle vescicole rivestite da clatrina. Tali proteine sono inoltre direttamente coinvolte nella risposta cellulare ad uno stress meccanico acuto tramite il loro rapido appiattimento nella membrana plasmatica³⁷¹. E' stata proposta una relazione complessa che collega le caveole, le caveoline ed il signalling transmembrana, la cosiddetta "caveolae signalling hypothesis", in cui la compartimentalizzazione delle molecole di segnale all'interno delle caveole potrebbe consentire un accoppiamento rapido ed efficiente tra i recettori attivati e più di un sistema effettore.

Recentemente è stato dimostrato come il "polymerase and transcript release factor" (PFTR anche chiamato Cav-p60 o cavina), una proteina citoplasmatica solubile, sia necessaria per la formazione delle caveolae³⁰⁰. PFTR-cavina, tramite il legame con caveoline oligodimerizzate, colesterolo e residui fosfatidilserinici proteici, stabilizza la curvatura della membrana producendo la classica forma a fiasco delle caveolae.

Tra tutte, il costituente principale delle caveolae è una proteina di membrana di 21-22-kDa, denominata caveolina-1 (Cav1) che è stata per la prima volta identificata nel 1943 in culture cellulari, provenienti da Sarcoma di Rous^{328, 260, 288}. Il gene umano della Cav1 è localizzato sul cromosoma 7 nella regione q.31.1 al locus D7S522 ed in vivo esistono due isoforme: α -caveolina, che contiene i residui da 1 a 178, e β -caveolina che presenta i residui da 32 a 178. La Cav1, sintetizzata nel reticolo endoplasmatico, è essenziale nella formazione delle caveolae e i suoi livelli di espressione correlano con il numero di caveolae.

La Cav1 ha varie funzioni tra cui quella di trasporto dei lipidi e regolazione del traffico di membrana. In particolare attraverso le caveole, la Cav1 sembra essere

coinvolta nel trasporto intra-extracellulare del colesterolo e di altri lipidi complessi, come dimostrato dal fatto che gli adipociti esprimono alti livelli di proteina e che topi caveolin1-null mostrano gravi alterazioni nel metabolismo lipidico^{353,316}. E' stato inoltre ampiamente discusso il ruolo della Cav1 nella trasduzione del segnale intracellulare, in quanto a livello caveolare si ha l'interazione con molecole/proteine coinvolte in importanti meccanismi di attivazione genica, quali il recettore del PDGF (PDGFR) o dell'EGF. Tali stimolazioni/interazioni si verificano presso un sito specifico detto "scaffolding domains", altamente conservato e localizzato in corrispondenza della porzione aminoacidica 82-101, il cui ruolo è quindi duplice: i) sito di ancoraggio e ii) responsabile della traduzione del segnale, sia essa in senso inibitorio sia in senso eccitatorio^{328,267} (Fig. 3.1).

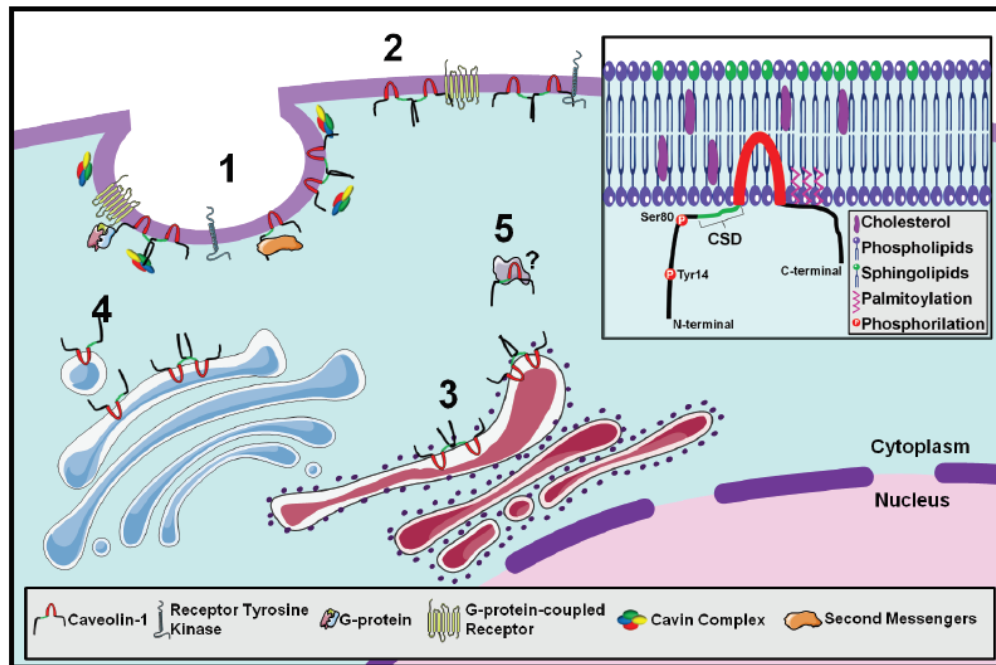


FIGURE 1: CAV1 localization options inside the cell. 1 In caveolae complexed with caveins interacting with tyrosine-kinase or G-protein coupled receptors. 2 Out of caveolae interacting with the same receptors. 3 At the endoplasmic reticulum synthesis of CAV1. 4 From the plasma membrane to the golgi apparatus caveolae-dependent endocytic functions. 5 In the cytoplasm interacting with still unknown proteins. Inset Structure and membrane topology of CAV1 showing phosphorylation sites, the caveolin scaffolding domain (CSD), and the transmembrane domain.

Fig. 3.1 Sedi differenti di localizzazione della Cav1 nelle cellule³⁶⁰

L'isoforma α della Cav1 può essere fosforilata da Src nel residuo tirosinico 14 e recentemente è stato dimostrato che fosfo-Cav1 agisca come inibitore della Cav1 stessa, configurando un nuovo circuito regolatorio di feedback della sintesi delle caveole³⁰⁷. La Cav1 è degradata attraverso un processo di ubiquitinizzazione e i

caveosomi sono compartimenti endosomiali tardivi che sono modificati dall'accumulo della proteina iperespressa e che sono destinati alla degradazione²⁹⁷.

b) Caveolina- 1 e tumori

La capacità della caveolina di modulare il signalling intracellulare ha implicazioni importanti in numerose condizioni umane biologiche e patologiche, in particolare nella cancerogenesi.

Negli ultimi 20 anni infatti, molti studi hanno valutato il ruolo della Cav1 nella iniziazione e progressione tumorale, dimostrando che questa proteina multifunzionale regoli numerosi processi associati allo sviluppo tumorale, quali la trasformazione cellulare, la crescita tumorale, la migrazione cellulare, l'invasività, la resistenza terapeutica e l'angiogenesi. Nonostante ciò la relazione tra le funzioni della Cav1 e la cancerogenesi rimane ancora parzialmente sconosciuta.

Numerosi autori si sono infatti focalizzati nello studio dell'espressione della Cav1 in differenti tumori solidi per identificarne un suo ipotetico ruolo oncosoppressore o promuovente la progressione tumorale (Tab. 3.1).

Tab. 3.1 Espressione della Cav1 nei carcinomi primitivi e nella malattia metastatica³⁶⁸

Table 1 Caveolin-1 expression in primary carcinoma and in metastatic disease and correlation with <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> effects.			
	Clinicopathological correlations		References
	<i>In vitro</i> effects	<i>In vivo</i> effects	
<i>Cav1 in primary cancer</i>			
Cav1 tumour suppression			
Sarcoma bone and soft tissues	Increase anchorage independence, invasion and migration	Increase in the metastatic potential	[17]
GIST		Reduced expression (IHC), but no correlation with expression status and cell mitosis and tumour grade	[18]
Ovarian cancer	Suppression of tumour cell survival		[19]
Cav1 tumour promotion			
Prostate cancer		Gleason score, positive margins, aggressive cancer recurrence, lymph nodes involvement	[28, 35, 36]
RCC		Poor disease-free survival; higher mRNA Cav1 increase tumour stage, tumour size, TNM stage and grade	[29, 40]
Bladder carcinoma		Aggressiveness, tumour grade and stage	[30]
Brain tumour		<i>Oligodendroglioma</i> : Shorter survival <i>Ependymomas</i> : Unfavourable patient outcome	[31–33]
Breast carcinoma		Shorter disease-free and overall survival	[27]
NSCLC		Advanced pathological TNM stage and shorter survival	[37, 43, 45]
<i>Cav1 up-regulation associated with metastatic disease</i>			
RCC	Correlation with microvessel density, metastasis and poor prognosis		[40]
ESCC		Lymph node metastasis and worse prognosis	[41]
NSCLC	Induction of filopodia formation	Lymph node metastasis	[42, 43]
SCLC		Increase in the metastatic potential	[44]
Hepatocellular carcinoma	Promotion of cell proliferation, migration and invasion	Increase in the metastatic potential	[48, 49]
Malignant melanoma	Increase anchorage independence, invasion and migration		[38]
Ewing's sarcoma	Increased migration and invasion of the extracellular matrix	Increase in the metastatic potential	[47]

Cav1: caveolin-1; GIST: gastrointestinal stromal tumour; IHC: immunohistochemistry; RCC: renal cell carcinoma; ESCC: oesophageal squamous cell carcinoma; NSCLC: non-small cells lung carcinoma; SCLC: small cells lung carcinoma.

I risultati ad oggi ottenuti appaiono spesso discordanti: essa risulta infatti ridotta in tumori di origine ovarica, mammaria e sarcomatosa^{363,334,385} mentre risulta aumentata nel carcinoma dell'esofago, della vescica, della tiroide e della prostata³⁸⁶. L'overespressione della cav-1 è inoltre associata, nel carcinoma prostatico, renale e polmonare, ad un atteggiamento più aggressivo e ad una prognosi peggiore^{308,261, 279,280}. Questo apparente “*paradosso della caveolina*” è stato spiegato postulando la teoria “Cav1 + partner X” secondo cui un'azione in un senso o nell'altro dipenda dal partner proteico a cui la cav-1 si associa a formare l'unità funzionale^{260,289}.

Il ruolo di cav1 quale oncosoppressore è stato anche ipotizzato per la sua localizzazione in corrispondenza del braccio corto del cromosoma 7 (7q31.1), una regione cromosomica molto spesso deleta nei tumori solidi²⁸¹.

In considerazione delle sue funzioni versatili la Cav1 potrebbe quindi diventare sia un marker diagnostico sia un bersaglio promettente per la terapia antineoplastica.

c) L'espressione della Caveolina-1 nelle cellule interstiziali di Cajal

Nell'intestino, le cellule interstiziali di Cajal (ICC) svolgono un ruolo cruciale nel controllo della funzione motoria. Determinano infatti il ritmo dell'eccitazione e della contrazione di entrambi gli strati muscolari e funzionano da intermediari nelle neurotrasmissione ai nervi colinergici e nitrergici. Tutte le classi di ICC (del plesso mioenterico/del plesso mucolare profondo/della sierosa/intramuscolari), come le cellule muscolari lisce, sono dotate di caveolae e quindi presentano la Cav1^{270,271,273}. Tale proteina si inserisce nello strato interno della membrana plasmatica lasciando i residui terminali COOH- e NH₂ nel citoplasma. Questi residui possiedono i siti di legame per numerose molecole di signalling, inclusi la "nitroxic oxide synthase" (NOS), le proteine G, le chinasi e i recettori. Nel 2005 è stato dimostrato, nell'intestino murino, che la Cav1 è associata con i canali del calcio L-Ca²⁺ nelle ICC²⁶⁴, influenzando il gradiente delle frequenze nell'intestino. A livello delle ICC e delle cellule muscolari lisce dell'intestino murino Cav1 è necessaria per l'espressione di Cav2, mentre favorisce ma non è indispensabile per l'espressione di Cav3²⁶⁵.

Cav-1 ha quindi un ruolo fondamentale come modulatore maggiore del signalling nelle ICC e nelle cellule muscolari lisce intestinali.

d) Espressione della Cav1 nei sarcomi e nei GIST

In considerazione dell'abbondante espressione di Cav1 nelle cellule mesenchimali terminalmente differenziate, come le cellule muscolari lisce, gli adipociti e le cellule endoteliali, Wiechen et al.³⁸⁵ hanno per primi dimostrato nel 2001 un ipotetico ruolo oncosoppressore della proteina nei sarcomi. Mediante analisi di immunohistochemica hanno riportato una espressione elevata della Cav1 nei fibroblasti, nelle cellule muscolari lisce, negli adipociti e nelle cellule endoteliali

con un pattern di positività membranoso finemente granulare e citoplasmatico diffuso. Inoltre hanno osservato come i livelli di Cav1 fossero mantenuti in tutti i tumori mesenchimali benigni, includendo 5 fibromatosi, 7 leiomiomi, 4 lipomi e 6 emangiomi. Al contrario l'espressione di Cav1 era assente o notevolmente ridotta nelle neoplasie maligne mesenchimali (3/3 fibrosarcomi, 17/20 leiomiosarcomi, 5/8 angiosarcomi, 15/18 istiocitomi fibrosi maligni e 8/8 sarcomi sinoviali). In accordo con tali risultati lo studio di Bayer-Garner²⁵⁶ ha descritto una positività debole o assente per Cav1 nelle aree scarsamente differenziate o dedifferenziate di leiomiosarcomi e liposarcomi.

In realtà nel corso degli anni è emerso come il ruolo della Cav1 nei sarcomi sia molto contraddittorio.

Infatti Cav1 è stata identificata come un gene associato alla capacità di metastatizzazione ed ad un fenotipo maligno nei tumori della famiglia del sarcoma di Ewing^{377, 359}. E' stato inoltre dimostrato come alti livelli di Cav1 siano correlati alla resistenza al trattamento chemioterapico nei sarcomi di Ewing³⁷⁸.

Al contrario Cav1 sembra agire come oncosoppressore negli osteosarcomi²⁶², infatti la sua down-regolazione è parte della trasformazione osteoblastica e della progressione in osteosarcoma, e nei rhabdomiosarcomi alveolari²⁹⁹.

Sono necessari ulteriori lavori di validazione in quanto un altro studio più recente³²⁶ ha riportato un'estesa positività per Cav1 in una casistica di 61 osteosarcomi xenotrapiantati e allo stesso modo altri studi²⁸³ hanno invece dimostrato che un'iperpressione della proteina sia correlata ad un aumento della proliferazione e della migrazione in linee cellulari di rhabdomiosarcoma.

I dati relativi all'espressione della Cav1 nei GIST sono molto scarsi e limitati a due studi presentanti risultati discordanti.

Il primo pubblicato nel 2005³¹², in accordo con i lavori precedentemente descritti nei sarcomi, ha valutato l'espressione della Cav1 in una casistica di GIST riportando una ridotta espressione (86,1% dei casi negativi) ma non ha dimostrato nessuna correlazione con le variabili clinico-patologiche esaminate, incluse le mitosi e la categoria di rischio. Inoltre all'analisi univariata la positività per Cav1 non rappresentava un fattore significativo predittivo di DFS.

Successivamente nel 2012 un altro lavoro³⁹¹ ha invece osservato una maggiore espressione della Cav1 nei GIST (66,7% di casi positivi) ma senza realizzare alcuna analisi statistica di valutazione prognostica.

Fino ad oggi non esistono quindi in letteratura studi che dimostrino una correlazione tra l'espressione della Cav1 nei GIST e le caratteristiche clinico-patologiche e molecolari dei tumori e soprattutto l'esito prognostico.

PARTE III

3.2 p130Cas

a) La famiglia di proteine Cas e p130Cas

La famiglia di proteine adattatrici Cas (substrato associato a Crk) si è dimostrata avere un ruolo cruciale nel signalling, con importanti funzioni regolatorie a livello di processi sia patologici sia fisiologici. Tali proteine sono caratterizzate dalla presenza di multipli domini conservati per le interazioni proteina-proteina e di estese fosforilazioni di residui tirosinici e serinici.

La proteina p130Cas, conosciuta anche con il termine “breast cancer anti-oestrogen resistance 1” (BCAR1), è stata identificata nel 1991 originariamente come proteina altamente fosforilata in cellule trasformate con gli oncogeni v-Src e v-Crk³¹¹. Successivamente alla scoperta di p130Cas sono state identificati altri tre membri della famiglia delle proteine Cas: NEDD9 (“neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9”; anche chiamato “human enhancer of filamentation 1” [HEF-1] or Cas-L), EFS (“embryonal Fyn-associated substrate”), and CASS4 (“Cas scaffolding protein family member 4”).

p130Cas è priva di un dominio chinasico, ma contiene numerosi domini per l’interazione con le proteine che mediano l’associazione con differenti partner di legame (Fig. 3.2).

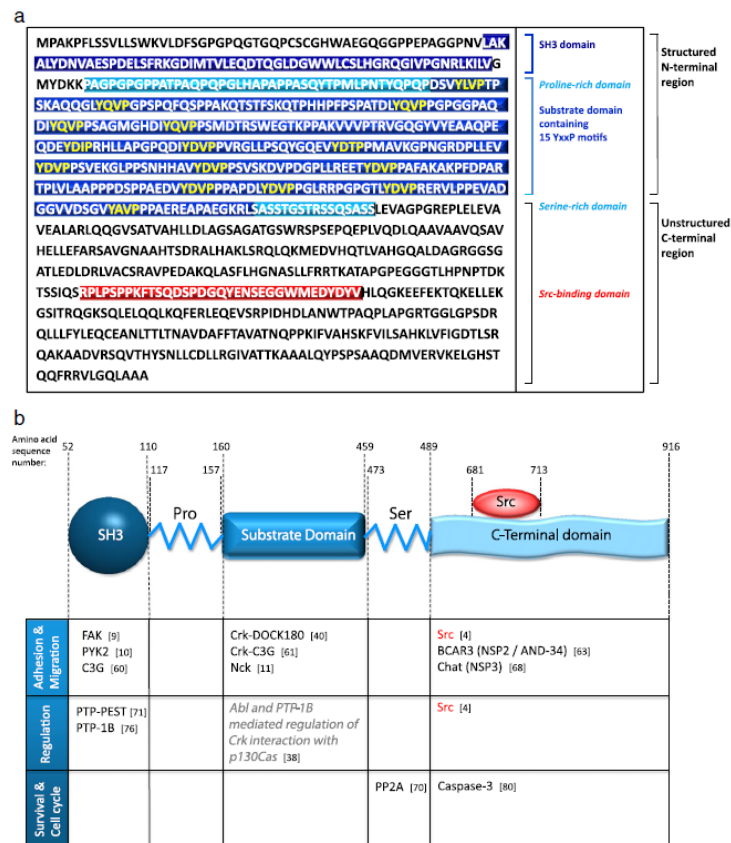


Fig. 3.2 a) Sequenza di p130 Cas. b) Struttura della proteina ed elenco delle proteine con cui interagisce²⁵⁵.

La struttura di p130Cas è quella di una proteina adattatrice: possiede un dominio SH3 (“amino N-terminal Src-homology 3 domain”) seguito da un dominio ricco di proline e da un dominio substrato, quest’ultimo è costituito da 15 ripetizioni del motivo YxxP consenso per la fosforilazione della famiglia delle chinasi Src (SFK). Le proteine con il dominio SH2 (“Src homology 2) si legano ai residui tirosinici fosforilati di questa regione³⁶¹. Dopo il dominio substrato la proteina comprende un dominio ricco di serina che forma un fascio di quattro eliche e funziona come sito di interazione con le altre proteine. La rimanente sequenza carbossi-terminale contiene un dominio di legame per Src.

Numerose proteine correlate alla motilità interagiscono con p130Cas, incluse Crk, FAK, protein tyrosine kinase 2 (PIK2) e Src, indicando quindi un ruolo centrale della proteina nel controllo della motilità cellulare^{354, 296}.

La regolazione di p130Cas tramite fosforilazioni, a livello del domio substrato (YxxP), e defosforilazioni ha conseguenze fondamentali nel signalling a valle della proteina. Numerosi fattori di crescita inducono la fosforilazione di p130Cas

tramite l'attività chinastica del recettore: “vascular endothelial growth factor” (VEGF), “platelet-derived growth factor” (PDGF), “epidermal growth factor” (EGF), “hepatocyte growth factor” (HGF), “insulin-like growth factor”(IGF), “fibroblast growth factor 2” (FGF-2), and “macrophage-colony stimulating Factor” (MCSF)^{341,251,352,343,263,310,282}. La fosforilazione di p130Cas è anche determinata da proteine che non sono recettori tirosina-chinasici, quali Src, FAK, PIK2 e Abl²⁵⁵. Il signalling mediato da p130Cas possiede quindi caratteristiche uniche, complesse e ridondanti (fig. 3.3).

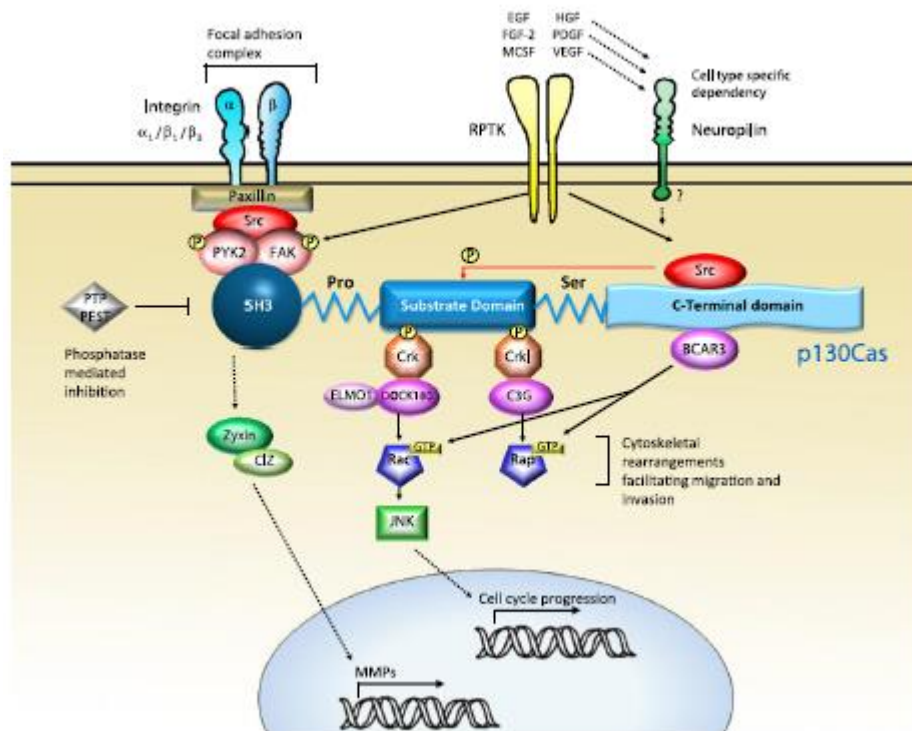


Fig. 3.3 Ruolo centrale di p130Cas nel signalling²⁵⁵.

La forma non fosforilata ha una localizzazione nel citoplasma delle cellule, mentre la fosforilazione delle tirosine indotta dal legame con le altre proteine promuove la traslocazione di p130Cas alla membrana cellulare.

La fosforilazione di p130Cas e la conseguente attivazione dei degli effettori a valle è un evento cruciale nel controllo della riorganizzazione del citoscheletro, permettendo l'adesione, la migrazione, l'invasione e favorendo la sopravvivenza.

Sono state descritte altre funzioni di p130Cas nello sviluppo del sistema cardiovascolare e nell'endotelio come parte del complesso delle adesioni focali, che costituiscono un regolatore chiave della migrazione endoteliale. La proteina

svolge inoltre un ruolo fondamentale nella contrazione delle cellule muscolari lisce della parete dei vasi^{342, 375}.

p130Cas è espressa ubiquitariamente e la sua delezione è letale a livello embrionale nel topo³⁰¹. Tale dato è indicativo del suo significato fondamentale nel signalling per lo sviluppo e quindi la sua alterata regolazione può determinare ampie implicazioni in malattie differenti.

b) p130Cas e tumori

p130Cas ha un ruolo cruciale nel signalling delle vie di trasduzione coinvolte nella motilità, prevalentemente tramite le piccole GPTasi Rap1 e Rac1. La motilità acquisita dalle cellule tumorali determina la capacità di invadere i tessuti circostanti e costituisce una tappa essenziale per la metastatizzazione²⁹⁵.

p130Cas sta emergendo come proteina importante nella trasformazione ed invasione indotta da numerosi oncogeni come Ha-Ras²⁵², v-Src³⁰¹ e ALK²⁴⁸. L'eccessiva fosforilazione delle tirosine osservata nelle adesioni focali è indicativa di un importante ruolo come impalcatura per p130Cas nello sviluppo di un fenotipo cellulare invasivo²⁵⁹. Inoltre l'espressione delle "matrix metalloproteinase" (MMP) è un aspetto fondamentale dell'invasione dal momento che la degradazione della matrice extracellulare determina l'invasione cellulare nei tessuti adiacenti. P130Cas è stata implicata nella regolazione della trascrizione delle MMP e quindi potrebbe avere un ulteriore coinvolgimento nel processo di invasione²⁹⁴.

Studi recenti hanno sottolineato l'importanza di p130Cas nei tumori umani (Tab. 3.2). Un'elevata espressione di p130Cas è stata osservata nei tumori della mammella, della prostata^{388,269} e in alcune neoplasie ematologiche come la leucemia mieloide cronica e la leucemia linfoblastica acuta^{362,392}. L'iperespressione di p130Cas nei carcinomi della prostata è stata associata con più alto grado tumorale e progressione di malattia^{388,269}.

Nel carcinoma della mammella alti livelli di p130Cas sono stati correlati: nei casi positivi ai recettori per l'estrogeno a resistenza al trattamento con tamoxifene^{380,277} mentre nei casi positivi per ERBB2 ad aumentata proliferazione e prognosi sfavorevole²⁷⁸.

Tab. 3.2 Riassunto delle funzioni, interazioni ed effetti di p130Cas nelle neoplasie umane²⁵⁵.

Table 1
Summary of the functions, interactions and effects of p130Cas in human malignancies.

Cancer	p130Cas function/interactions	Effects
Breast cancer	Enhancement of Src activity [136] Activation of Rac [134] Increased MMP transcription [134] Transducer of ErbB2 signals [134] Interaction with BCAR3 [141,142]	Increased proliferation Increased invasiveness Cellular transformation; increased p130Cas-CrkII coupling; anchorage-independent growth Resistance to anti-oestrogen chemotherapeutics, poorer prognosis, quicker disease recurrence
ALCL CML	p130Cas is a substrate and mediator of ALK-NPM oncogenic kinase [146] p130Cas is a substrate of Bcr-Abl oncogenic kinase [61,145] Excessive signalling via Grk-C3G-Rap1 [61] Disruption of p130Cas-tensin interaction [145]	p130Cas constitutive hyperphosphorylation and cellular transformation p130Cas constitutive hyperphosphorylation and cellular transformation
Melanoma	GD3-induced hyperphosphorylation of p130Cas and paxillin; increased p130Cas-FAK association [148,149] HMW-MAA-mediated $\alpha\phi$ 1 activation and recruitment of p130Cas and Cdc-42 [150,151]	Adhesion defects Dysregulated focal adhesion dynamics Alterations in cytoskeletal regulation
Prostate cancer	p130Cas overexpression correlates with higher grade tumours, increased EGFR and reduced CD82/KAI1 expression [153,155]	Disease progression
Hepatocellular carcinoma	p130Cas overexpression correlates with increased β -catenin and decreased E-cadherin [158]	Disrupted adherens junctions and increased invasiveness
Colorectal cancer	p130Cas is a substrate of PTPN14, which is frequently lost in CRC [159]	Reduced dephosphorylation of p130Cas tyrosine 128, which may dysregulate spreading and migration
Glioma	In vitro work shows p130Cas is required for chemotaxis towards HGF and PDGF [26,160]	p130Cas required for chemotaxis p130Cas plays a role in cell morphology and mode of motility

ALCL, Anaplastic large cell lymphoma; CML, Chronic myelogenous leukaemia; GD3, Ganglioside 3; HMW-MAA, High molecular weight melanoma-associated antigen; PTPN14, Protein tyrosine phosphatase non-receptor 14.

c) Espressione della famiglia delle proteine Cas nei sarcomi e nei GIST

I dati in letteratura relativi all'espressione di p130Cas nei sarcomi sono limitati a studi riguardanti il ruolo di p130Cas nel sarcoma di Kaposi^{340,253}. E' stato dimostrato che durante le fasi precoci dell'infezione da herpes virus associato al sarcoma di Kaposi, nelle cellule endoteliali umane microvascolari del derma (HMVEC-d), p130Cas si associa a fosfoproteine cellulari e altri adattatori a valle regolando la trasposizione del virus nel nucleo. Questo evento è determinante per il correlato sviluppo del sarcoma di Kaposi.

La proteina p130Cas non è mai stata valutata in una casistica di GIST, solo uno studio ha riportato nel 2009³⁷⁶ iperespressione di Cas-L (NEDD9) in una linea cellulare di GIST resistenti ad imatinib (GIST-T1 IR).

E' stato però recentemente dimostrato, in cellule mammarie murine, come l'overespressione di p130Cas sia sufficiente a promuovere il legame della proteina al recettore KIT e ad indurre l'attivazione di KIT in assenza di ligando³⁷⁹.

IV-PARTE SPERIMENTALE

4.1 OBIETTIVO DELLO STUDIO

Il progetto ha un triplice obiettivo: 1) valutare il ruolo della proteina Cav1 nella progressione tumorale dei GIST; 2) studiare il ruolo di p130Cas, come biomarcatore predittivo di risposta e fattore prognostico di sopravvivenza; 3) correlare l'espressione di queste due proteine con le caratteristiche clinico-patologiche e lo stato mutazionale dei tumori in esame.

4.2 MATERIALI E METODI

a) CASISTICA

Le analisi sono state condotte sulla casistica retrospettiva pubblicata nel 2011, di cui è stato aggiornato il follow-up ed in cui è stato escluso un caso per l'esigua quantità di materiale istologico in archivio. La casistica comprendeva quindi 39 casi di GIST primitivi diagnosticati tra maggio 1994 e dicembre 2004 presso la Città della Salute e della Scienza di Torino e 11 campioni di recidive di malattia (relative a 7 pazienti fino a 3 successive recidive per singolo caso). Sono stati inoltre condotti esperimenti su linee cellulari di GIST per valutare i rapporti tra c-kit e p130Cas e per studiare i livelli di espressione di p130Cas in cellule sensibili e resistenti alla terapia con imatinib.

b) DATI CLINICI

ALLA DIAGNOSI

Le informazioni sono state ottenute dalle lettere di dimissioni, dalle cartelle cliniche, chirurgiche e mediche per determinare la presentazione clinica, i dati anagrafici, la dimensione tumorale, la sede, il tipo di resezione chirurgica, il tipo di crescita, l'infiltrazione di organi o strutture adiacenti e le complicanze post-operatorie.

La chirurgia è stata definita resezione completa se otteneva l'asportazione di tutta la malattia macroscopica con margini istopatologici indenni .

Per resezione completa limitata si è intesa l'asportazione della lesione con la base di impianto cioè la resezione gastrica cuneiforme (WR), la gastrectomia subtotale e la resezione segmentale intestinale. Per resezione completa radicale si è intesa l'asportazione dell'organo di origine della lesione o sacrificio d'organi contigui come la gastrectomia totale e la duodenocefalopancreasectomia.

Per resezione incompleta si è intesa l'asportazione del tumore con residuo macroscopico di malattia o margini istopatologici interessati da malattia.

AL FOLLOW-UP

I pazienti, successivamente alla resezione del tumore primitivo, sono stati seguiti con visite di controllo periodiche, comprendenti esame obiettivo, esami di laboratorio e indagini strumentali, descritti nelle schede di follow-up.

Per quel che riguarda le analisi statistiche è stata definita una data di entrata nel follow-up, corrispondente alla giornata dell'intervento chirurgico. La data di uscita è stata identificata con quella dell'ultima visita di controllo o di decesso.

La presenza di recidiva di malattia, locale e a distanza, è stata individuata tramite indagini strumentali e qualora clinicamente indicata è stata eseguita una nuova resezione chirurgica.

Sono state valutate inoltre la sopravvivenza globale ("*overall survival*" OS) e la sopravvivenza libera da malattia ("*disease free survival*" DFS).

I pazienti non controllati da più di un anno sono stati definiti "persi al follow-up" e sono stati considerati nelle analisi statistiche fino alla data dell'ultimo controllo.

Nei pazienti trattati con terapia medica (imatinib) la risposta è stata valutata secondo i criteri RECIST ("*Response Evaluation Criteria in Solid Tumours*"):

- RISPOSTA COMPLETA (CR): scomparsa di tutte le lesioni bersaglio senza formazione di nuove lesioni
- RISPOSTA PARZIALE (PR): riduzione almeno del 30% della somma dei diametri maggiori delle lesioni bersaglio
- PROGRESSIONE DI MALATTIA (PD): aumento almeno del 20% della somma dei diametri maggiori delle lesioni bersaglio

- STABILITA' DI MALATTIA (SD): le lesioni bersaglio non sono nè diminuite a sufficienza per essere incluse nella PR, nè aumentate per essere attribuite alla PD.

Inoltre è stata determinata la presenza di resistenza al trattamento medico, definita primaria, nei casi di PD entro i primi 6 mesi di trattamento, o secondaria, se la malattia, dopo un iniziale periodo di beneficio clinico, solitamente oltre il sesto mese, non ha più risposto al farmaco.

c) ANALISI ISTOLOGICA E IMMUNOISTOCHEMICA

I pezzi operatori sono stati trasferiti presso l'Anatomia Patologica dell'ospedale San Giovanni Battista Molinette (Città della Salute e della Scienza di Torino), ridotti e sottoposti a fissazione in formalina al 10%, seguita da disidratazione con passaggi in alcool a concentrazioni maggiori, pulitura in xilolo e inclusione in paraffina.

Dall'inclusione in paraffina sono state ottenute sezioni dello spessore di 3µm, in parte colorate con ematossilina-eosina e in parte utilizzate per le successive indagini di immunohistochemica (IHC).

Sono stati valutati il tipo istologico, la presenza di aree necrotico-emorragiche, le dimensioni tumorali, l'invasione della mucosa e l'ulcerazione.

Le indagini di IHC sono state realizzate con gli anticorpi primari descritti in Tab. 4.1, come precedentemente descritto²⁵⁴ per quanto riguarda CD117, CD34, Actina muscolare liscia, vimentina, desmina, S100, Ki67, PDGFRA e nell'immunocoloratore automatico (Ventana BenchMark AutoStainer, Ventana Medical System, Tucson, AZ, USA) per Caveolina-1 e p130Cas.

Tabella 4.1 Anticorpi primari utilizzati nelle analisi immunohistochemiche.

ANTICORPO	FONTE	CLONE	DILUIZIONE
CD117	Dako	policlonale	1:50
CD34	Neomarkers	QBEnd	1:50
ACTINA MUSCOLARE LISCIA	Dako	1A4	1:50
VIMENTINA	Dako	V9	1:100
DESMINA	Dako	D33	1:50

PROTEINA S100	Dako	policlonale	1:4000
Ki-67	Dako	MIB-1	1:100
PDGFRA	Cell Signaling	policlonale	1:200
Caveolina-1	Santa Cruz	Policlonale (N20 sc 894)	1:350
p130Cas	Thermo Scientific	CAS-14	1:1500

I tumori sono stati suddivisi in quattro classi di differenziazione in base ai risultati dell'IIC:

1. muscolare liscia, se positivi all'actina muscolare liscia e/o alla desmina;
2. neurale, se S100-positivi;
3. misto neurale-muscolare liscia, se positivi all'actina e/o desmina e alla proteina S100;
4. indifferenziata, in caso di nessuna positività immunohistochimica.

L'immunoreattività per la Cav1 è stata considerata sia da un punto di vista quantitativo (percentuale di cellule colorate) che qualitativo (intensità di colorazione). L'intensità di colorazione è stata graduata tra 0 e 3+. Il tipo di colorazione è stata definita "di membrana" o citoplasmatica.

Tutte le valutazioni immunohistochimiche dei campioni tumorali sono state condotte in cieco rispetto all'identità del paziente.

L'attività proliferativa è stata valutata mediante conteggio del numero di mitosi per 50-HPF; l'indice MIB1 è stato ottenuto contando il numero di nuclei positivi in 1000 cellule tumorali e riportato in percentuale ed è stato scelto il 5% come valore di *cut-off* per le analisi statistiche.

I tumori sono stati classificati secondo le categorie di rischio di *Fletcher et al.*²⁶ e di *Miettinen et al.*³²⁹.

Le valutazioni istologiche e immunohistochimiche sono state eseguite sia sui 39 campioni dei tumori primitivi sia su quelli delle 11 recidive di malattia.

d) ANALISI MOLECOLARE

L'analisi molecolare dei geni KIT e PDGFRA è stata condotta dal laboratorio di Oncologia Molecolare del Centro di Ricerca in Medicina Sperimentale (CERMS)

dell'ospedale San Giovanni Battista Molinette (Città della Salute e della Scienza di Torino).

ESTRAZIONE DEL DNA GENOMICO DA TESSUTI FISSATI

Per ciascuna biopsia sono state tagliate in una eppendorf sterile 4 fette dello spessore di 10µm ed è stata eliminata la paraffina.

Il DNA genomico è stato estratto utilizzando la procedura standard di digestione con proteinasi, purificazione del DNA con fenolo e precipitazione in alcool.

Il pellet di DNA è stato risospeso in un volume variabile da 50 a 200µl di TE1X, a seconda della grandezza del pellet, e contato in diluizione 1:100 allo spettrofotometro (misura della densità ottica, o D.O., a 260 e 280nm).

POLIMERASE CHAIN REACTION (PCR) DI CONTROLLO DEL DNA ESTRATTO

I campioni di DNA sono stati controllati per le loro caratteristiche di amplificabilità mediante un protocollo di PCR che utilizza oligonucleotidi ("primers") specifici per una sequenza ubiquitaria dell'esone 2 del gene HLA-DRβ. Il protocollo di PCR utilizzato è una miscela che contiene Tris-HCl (pH8,4) 22mM, KCl 55mM, MgCl₂ 1,5mM, i quattro desossinucleotidi trifosfati (dNTPs) alla concentrazione di 0,22mM, Taq DNA Polimerasi 22U/ml a cui sono stati aggiunti 5pmol di ciascun "primer" (HKA e HKB) e 500ng di DNA in un volume totale di 25µl.

Il ciclo di PCR è consistito di un primo "step" di denaturazione a 95°C di 5 min, seguita da 40 cicli (esoni 9 e 17) a 95°C per 15 sec, 55°C per 30 sec e 72°C per 30 sec, seguito da un'ultima fase di estensione a 72°C per 10 min.

I prodotti di PCR sono stati separati mediante corsa elettroforetica in tampone TBE1X su gel di agaroso al 2% colorato con etidio bromuro: 5µl di amplificato sono stati mescolati in rapporto 1:6 con un tracciante di corsa elettroforetica (GLB6x[^]) contenente due coloranti a velocità di migrazione differente (blu di bromofenolo e xilene-cianolo) e sono stati caricati nei pozzetti del gel applicando un voltaggio di 120V per 30 min. Al termine della corsa elettroforetica il gel è stato osservato su un transilluminatore a luce UV (260nm) in grado di evidenziare l'etidio bromuro che si è intercalato nel DNA degli eventuali amplificati che si

sono formati. La marcatura del gel è stata acquisita con una telecamera collegata ad un software di elaborazione dell'immagine e stampata per l'archivio dei dati.

PCR DEI GENI KIT E PDGFR α

Il DNA genomico è stato sottoposto all'amplificazione di 4 esoni del gene KIT (9, 11, 13, 17) e di 2 esoni del gene PDGFR α (12, 18).

La miscela di PCR conteneva 1xPCR buffer (Tris-HCl 20mM, KCl 50mM), MgCl₂ 1,5mM, dNTPs 0,2mM, 0,4mM di ciascun "primer" e 2,5U di Taq DNA Polimerasi (Invitrogen). Il ciclo di PCR per KIT è consistito di un primo "step" di denaturazione a 95°C di 5 min, seguita da 33 cicli (esoni 11 e 13 di KIT) o 40 cicli (esoni 9, 17 di KIT e esoni 12, 18 di PDGFR α) a 95°C per 30 sec, 56°C per 30 sec e 72°C per 30 sec, seguito da un ultimo "step" di estensione a 72°C per 7 min. Il ciclo di amplificazione di PDGFR α è simile al precedente, solo la fase di "annealing" degli oligonucleotidi avviene a 57°C.

ANALISI DEGLI ETERODUPLEX

Gli amplificati ottenuti mediante reazione di PCR per l'esone 11 di KIT e per gli esoni 12 e 18 di PDGFR α sono stati sottoposti a analisi degli "heteroduplex".

5 μ l di amplificato sono stati mescolati in rapporto 1:1 ad un GLB contenente formammide in grado di denaturare la doppia elica del DNA, fatti correre su un gel verticale di poliacrilammide (PAGE) non denaturante al 12% (29:1) a 200V per 1 ora e successivamente colorato con etidio bromuro per poter visualizzare le bande.

ESTRAZIONE DEL DNA DA GEL DI AGAROSO

I prodotti di amplificazione degli esoni dei geni KIT e PDGFR α sono stati separati su gel di agaroso al 2% (100V per 80 min). Le bande di gel contenenti i singoli frammenti amplificati sono state tagliate con lamette monouso e il DNA è stato estratto dall'agaroso utilizzando colonnine contenenti una membrana di resina di silice (Nucleo Spin Extract Kit, Macherey Nagel).

SEQUENZIAMENTO ED ANALISI DEGLI ELETTROFEROGRAMMI

Le reazioni di sequenza sono state allestite utilizzando la metodica BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, AB) che prevede l'uso di una Ready Reaction Mix contenente $MgCl_2$, Taq Polimerasi, i quattro dNTPs non marcati e i quattro ddNTPs marcati ciascuno con un diverso fluorocromo. Per ciascun campione è stata preparata sia la sequenza diretta che quella inversa, utilizzando rispettivamente gli oligonucleotidi “forward” e “reverse” di ciascuno degli esoni dei geni KIT e PDGFR α alla concentrazione finale di 2 μ M. La reazione di PCR per la sequenza è stata una reazione standard indicata dalla ditta AB ed è consistita di 25 cicli composti da denaturazione del DNA a 96°C per 10 sec, “annealing” dei primers a 50°C per 5 sec e estensione del filamento a 60°C per 4 min.

Terminata la reazione di sequenza, i campioni sono stati purificati dall'eccesso di ddNTPs marcati, sali e altre molecole a basso peso molecolare attraverso un sistema che prevede l'uso di colonnine da centrifuga contenenti una matrice gel idratata (Centri-Sep Columns, Princeton Separation).

I prodotti sono stati infine caricati su un sequenziatore automatico a capillare AB Prism 310 sottoposti ad elettroforesi.

L'analisi degli elettroferogrammi è stata fatta utilizzando i programmi:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq> e
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>,

che hanno permesso rispettivamente l'allineamento e il confronto di due sequenze tra di loro e consentito la verifica della sequenza in esame mediante l'appaiamento con sequenze fornite dalla banca dati.

e) Western blotting analysis

Le cellule di GIST sono state estratte con RIPA buffer (1% Triton X-100, 0,1%SDS, 1% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl ph 7, 0.4 mM Na_3VO_4 , inhibitor mix). I lisati cellulari sono stati centrifugati a 13,000 g per 10 minuti e i supernatanti sono stati raccolti e valutati per la concentrazione proteica con il “Bio-Rad protein assay method” (Biorad, Hercules, CA, USA). Le proteine sono state fatte correre su un SDS-PAGE (“Sodium Dodecyl Sulphate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis”, ossia elettroforesi su gel di

poliacrilammide in presenza di sodio dodecil solfato) in condizioni riducenti. Successivamente le proteine sono state trasferite su di un supporto di nitrocellulosa, incubate con gli anticorpi specifici e quindi rilevate con anticorpi secondari coniugati con perossidasi e reagente chemoluminescente ECL.

ANALISI STATISTICA

Lo studio della correlazione tra i parametri clinico-patologici, immunoistochimici e molecolari è stato realizzato mediante il test di Pearson, considerando statisticamente significativa una $p \leq 0,05$. La determinazione delle probabilità di sopravvivenza è stata eseguita mediante il test di Kaplan-Meier e le differenze confrontate statisticamente utilizzando il log-rank test di Mantel.

E' stata condotta l'analisi multivariata di DFS mediante "*Cox Proportional Hazard Regression Model*".

4.3 RISULTATI

a) DATI CLINICI

ALLA DIAGNOSI

Il gruppo (Tab. 4.2) si compone di 20 maschi (51,3%) e 19 femmine (48,57%) di età media alla diagnosi di 65 anni (intervallo 19-84 anni).

La sede della neoplasia era gastrica in 28 casi (71,8%), duodenale in 4 (10,2%), digiunale in 4 (10,2%), ileale, colica e rettale in un caso ciascuno (2,6%).

In 28 casi (71,8%) erano presenti sintomi che hanno indotto la diagnosi, mentre in 10 casi (25,6%) il riscontro è stato casuale, di un caso era sconosciuto l'esordio clinico. Il sintomo all'esordio più comune era il sanguinamento gastrointestinale (n=15, 37,5%), sotto forma di ematemesi, melena o anemizzazione; in 9 pazienti (22,5%) la malattia si è manifestata con dolore addominale.

Le dimensioni medie del tumore primitivo erano di 6 cm (intervallo di 1-25 cm).

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a resezione chirurgica: in 31 casi (79,5%) è stata eseguita una resezione completa limitata, in 5 casi (12,8%) una resezione completa radicale e infine in 3 pazienti (7,7%) una resezione incompleta.

In 25 pazienti (64,1%) il decorso post-operatorio è stato regolare, mentre in 11 casi (28,2%) si sono verificate complicanze, quali gastroparesi, deiscenza dell'anastomosi, fistola anastomotica, pancreatite, tromboembolia polmonare, raccolte addominali e sindrome da distress respiratorio dell'adulto (ARDS).

La crescita tumorale era di tipo esofitico in 31 pazienti (79,5%), endofitico in 6 (15,4%) e intramurale in 2 casi (5,1%); in 5 casi (12,8%) si è riscontrata infiltrazione di organi o strutture adiacenti.

In 3 pazienti (7,7%) erano presenti metastasi già al momento della diagnosi.

E' stata riscontrata in 14 casi (35,9%) la presenza di altri tumori primitivi, presenti già al momento della diagnosi o insorti successivamente., Tali tumori comprendevano un carcinoma dello stomaco, del colon, della prostata, del rene, del polmone e due paragangliomi cromaffini extrasurrenali, due carcinomi della mammella, due carcinomi del duodeno, due carcinomi della vescica e un carcinoma squamoso del cavo orale.

AL FOLLOW-UP

Nel corso del follow-up (Tab. 4.3) 11 pazienti (28,2%) hanno presentato ripresa di malattia, in 9 casi si è trattato di metastasi e in 2 casi vi è stata una recidiva in sede di pregresso intervento, in un caso di questi per tre volte nell'arco di 4 anni. Inoltre 6 pazienti (15,4%) sono stati sottoposti ad un nuova resezione chirurgica sia di malattia metastatica che della recidiva locale.

Gli 11 campioni tissutali prelevati dalle riprese di malattia comprendevano: 2 recidive locali in sede gastrica (18,2%), 5 metastasi epatiche (45,4%), una recidiva locale duodenale (9,1%) e 3 disseminazioni peritoneali (27,3%).

In un caso tutte le analisi sono state condotte solo sui due campioni di recidiva di malattia, in quanto il tumore primitivo era stato sottoposto a resezione chirurgica fuori Torino.

In 9 casi (23,1%), dopo chirurgia della recidiva (n = 7) o alla ripresa di malattia (n = 2) è stata iniziata la terapia con imatinib. In un caso si è avuta CR (11,1%), in 3 (33,3%) PR, in 2 (22,3%) SD e in altri 3 (33,3%) PD. La risposta farmacologica è stata mantenuta per meno di 6 mesi in 2 pazienti (22,2%), per 6-12 mesi in 3 casi (33,3%), per 12-18 mesi in 3 casi (33,3%) e per più di 18 mesi nel rimanente paziente (11,1%). E' stata identificata resistenza secondaria all'imatinib in 3 pazienti (33,3%). Un ulteriore caso privo del campione primitivo e dei relativi dati

di immunoistochimica e biologia molecolare (in quanto operato fuori Torino), ma comprendente solo recidive istologiche è stato trattato con imatinib e ha sviluppato resistenza secondaria.

Il follow-up medio della casistica completa è stato stimato di 80 mesi (range 5-220 mesi) ed ha fornito i seguenti esiti: 34 pazienti vivi (87,2%) e 5 casi deceduti per il tumore (12,8%).

E' stata rilevata una frequenza di associazione con altri tumori primitivi (sincroni o metacroni) del 35,9%, solo lievemente più elevata rispetto al 26,6% riportato in un recente lavoro²⁶⁸.

Tabella 4.2 Caratteristiche cliniche alla diagnosi dei pazienti inclusi nello studio

VARIABILE	VALORI
SESSO	
- maschi	20 (51,3%)
- femmine	19 (48,7%)
ETA' ALLA DIAGNOSI (anni)	MEDIA: 5 RANGE: 19-84
SINTOMI	
- assenti	10 (25,6%)
- dolore addominale	9 (23,1%)
- massa addominale	2 (5,1%)
- sanguinamento gastrointestinale	15 (38,5%)
- altro	2 (5,1%)
- non valutati	1 (2,6%)
MODALITA' DI DIAGNOSI	
- sintomatico clinico	28 (71,8%)
- incidentale clinico	10 (25,6%)
- non valutata	1 (2,6%)
SEDE	
- stomaco	28 (71,8%)
- intestino tenue	9 (23,1%)
- intestino crasso	2 (5,1%)
DIMENSIONI (cm)	MEDIA: 6 RANGE: 1-25
TIPO INTERVENTO	
- resezione completa radicale	5 (12,8%)
- resezione completa limitata	31 (79,5%)
- resezione incompleta	3 (7,7%)
COMPLICANZE POST-OPERATORIE	
- assenti	25 (64,1%)
- presenti	11 (28,2%)
- non valutate	3 (7,7%)
TIPO DI CRESCITA	
- endofitica	6 (15,4%)
- esofitica	31 (79,5%)

- intramurale	2 (5,1%)
INFILTRAZIONE DI ORGANI ADIACENTI	
- assente	33 (84,6%)
- presente	5 (12,8%)
- non valutata	1 (2,6%)
METASTASI A DISTANZA	
- assenti	28 (71,8%)
- sincrone	3 (7,7%)
- metacrone	8 (20,5%)
PRESENZA DI ALTRI TUMORI PRIMITIVI	
- assenti	25 (64,1%)
- presenti	14 (35,9%)

Tabella 4.3 Caratteristiche cliniche al follow-up dei pazienti inclusi nello studio

VARIABILE	VALORI
RECIDIVE	
- assenti	28 (71,8%)
- presenti	11 (28,2%)
REINTERVENTI	
- non eseguiti	33 (84,6%)
- eseguiti	6 (15,4%)
TIPO DI RISPOSTA ALL'IMATINIB	
- somministrato con CR	1 (11,1%)
- somministrato con PR	3 (33,3%)
- malattia stabile (SD)	2 (22,3%)
- malattia progressiva (PD)	3 (33,3%)
- non somministrato	30 (76,9%)
	(23,1%) pz trattati
DURATA DELLA RISPOSTA ALL'IMATINIB	
- risposta mantenuta per < 6 mesi	2 (22,2%)
- risposta mantenuta per 6-12 mesi	3 (33,3%)
- risposta mantenuta per 12-18 mesi	3 (33,3%)
- non somministrato	31 (76,9%)
	(23,1%) pz trattati
RESISTENZA II AL GLIVEC	
- assente	6 (66,7%)
- presente	3 (33,3%)
- non somministrato	31 (80%)
	(23,1%) pz trattati
MODALITA' DI USCITA DAL FOLLOW-UP	
- vivi	34 (87,2%)
- morti per la malattia	5 (12,8%)

b) ANALISI ISTOLOGICA E IMMUNOISTOCHEMICA (dati precedentemente pubblicati)

Nella Tab. 4.4 sono illustrate le caratteristiche istologiche e immunoistochimiche della casistica esaminata.

Tabella 4.4 Risultati delle analisi istologiche e immunoistochimiche nei 39 campioni dei tumori primitivi

VARIABILE	VALORI
CD 117	
- negativo	4 (10,3%)
- positivo	35 (89,7%)
▪ +	11 (31,4%)
▪ ++	10 (28,6%)
▪ +++	11 (31,4%)
▪ non valutata	3 (8,6%)
PDGFRA	
- negativo	16 (41%)
- positivo	23 (59%)
▪ +	7 (30,4%)
▪ ++	11 (47,8%)
▪ +++	5 (21,8)
CD 34	
- negativo	7 (18%)
- positivo	32 (82%)
VIMENTINA	
- negativo	1 (2,6%)
- positivo	20 (51,3%)
- non valutata	18 (46,1%)
ACTINA	
- negativo	20 (51,3%)
- positivo	13 (33,3%)
- non valutata	6 (15,4%)
DESMINA	
- negativo	20 (51,3%)
- positivo	1 (2,6%)
- non valutata	18 (46,1%)
S-100	
- negativo	28 (71,8%)
- positivo	2 (5,1%)
- non valutata	9 (23,1%)
ISTOTIPO	
- fusocellulare	24 (61,5%)
- epitelioide	4 (10,3%)
- misto	11 (28,2%)

DIFFERENZIAZIONE	
- muscolo liscio	11 (28,2%)
- neurale	0 (0%)
- muscolo liscio-neurale	2 (5,1%)
- indifferenziata	20 (51,3%)
- non valutata	6 (15,4%)
Ki-67 (%)	MEDIA: 7,7 DS 9,3 RANGE: 1-40
- ≤5%	26 (66,6%)
- >5%	13 (33,3%)
INDICE MITOTICO (num. mitosi/50 HPF)	MEDIA: 18,10 D.S.: 29,005 RANGE: 1-99
- ≤5%	24 (61,5%)
- >5%	15 (38,5)
NECROSI	
- assente	25 (64,1%)
- presente	13 (33,3%)
- non valutata	1 (2,6%)
EMORRAGIA	
- assente	26 (66,6%)
- presente	12 (30,8%)
- non valutata	1 (2,6%)
INVASIONE DELLA MUCOSA	
- assente	27 (69,2%)
- presente	9 (23,1%)
- non valutata	3 (7,7%)
ULCERAZIONE	
- assente	20 (51,3%)
- presente	16 (41%)
- non valutata	3 (7,7%)
CATEGORIA DI RISCHIO sec. Fletcher²⁶	
- molto basso	3 (7,7%)
- basso	8 (20,5%)
- intermedio	11 (28,2%)
- alto	17 (43,6%)
CATEGORIA DI RISCHIO sec. Miettinen³²⁹	
- nessuno	4 (10,3%)
- molto basso	8 (20,5%)
- basso	7 (18%)
- intermedio	10 (25,6%)
- alto	10 (25,6%)

La morfologia era fusocellulare in 24 casi (61,5%), mista in 11 (28,2%) e epitelioide in 4 (10,3%).

Trentacinque tumori (89,7%) erano CD117-positivi; 11 casi (31,4%) esprimevano una positività intensa (Fig. 4.1), mentre 10 (28,6%) e 11 (31,4%) di questi

campioni erano rispettivamente moderatamente (Fig. 4.2) e debolmente positivi (Fig. 4.3).

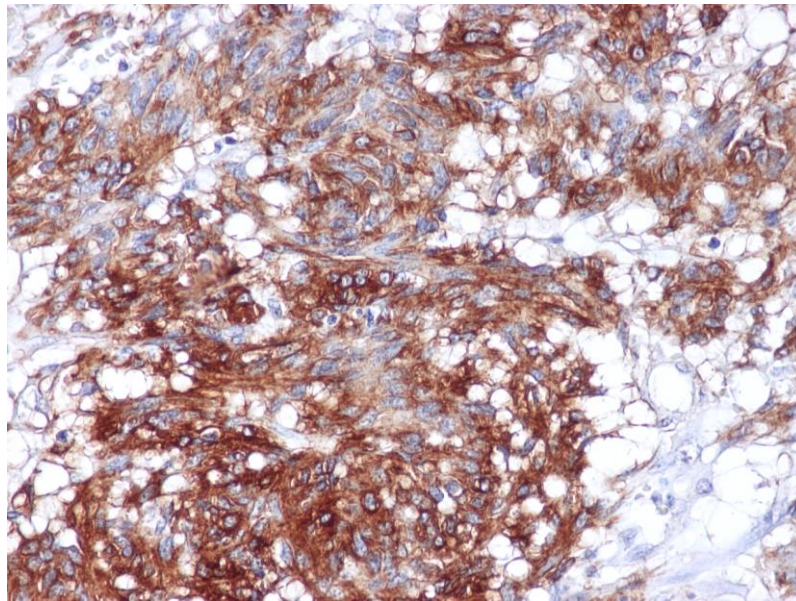


Figura 4.1 GIST con positività intensa di membrana per CD117

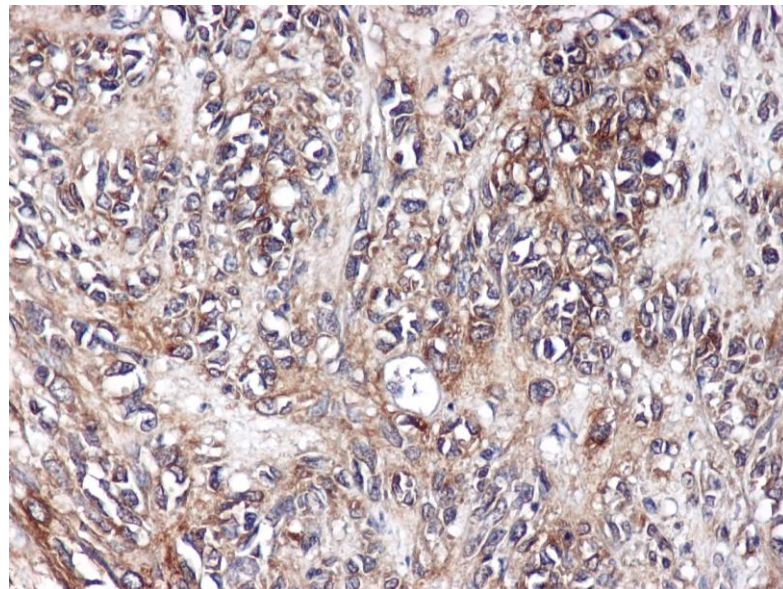


Figura 4.2 GIST con positività moderata di membrana per CD117

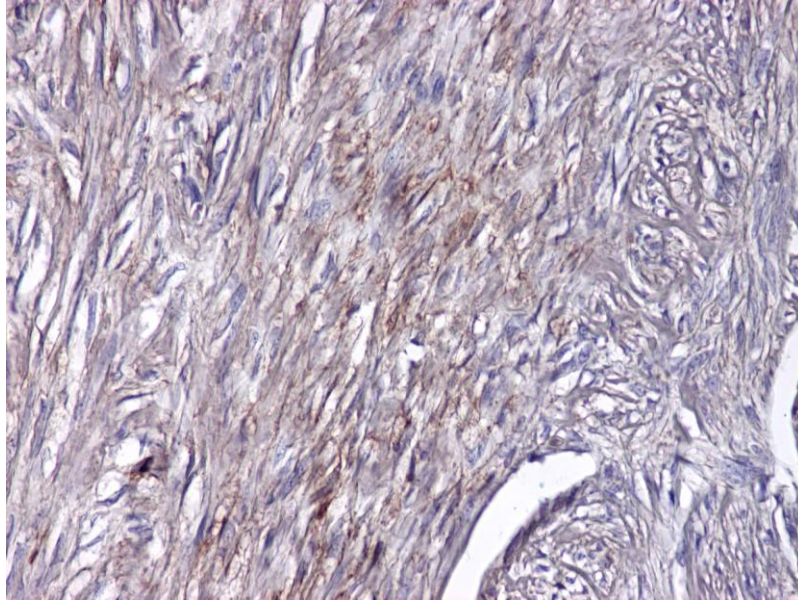


Figura 4.3 GIST con debole positività di membrana per CD117

La positività al PDGFRA è stata riscontrata in 23 casi (59%), di questi 5 (21,8%) è stato stimato 3+ (Fig. 4.4), 11 (47,8%) 2+ (Fig.4.5) e 7 (30,4%) 1+ (Fig.4.6) .

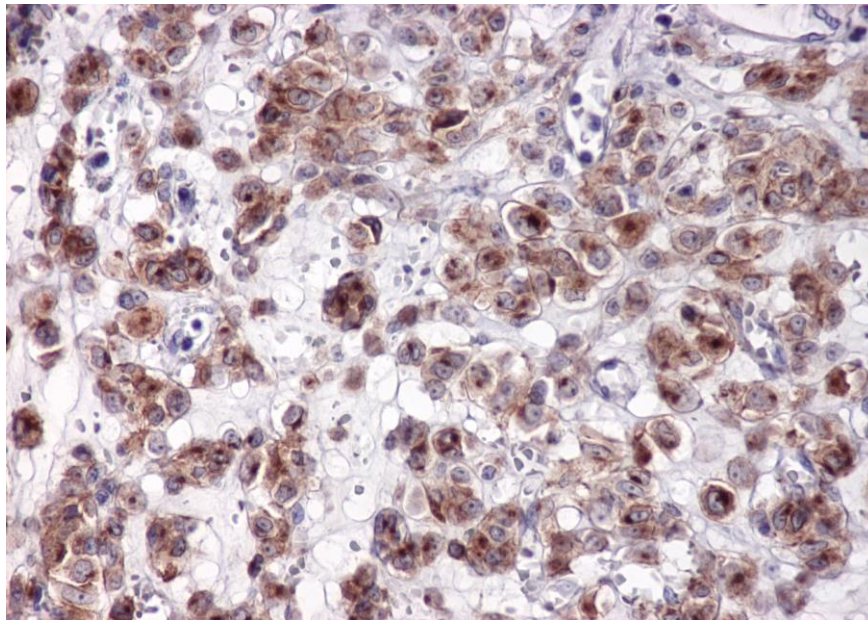


Figura 4.4 GIST con intensa positività citoplasmatica per PDGFRA e accentuazione perinucleare “dot-like” (“Golgi pattern”)

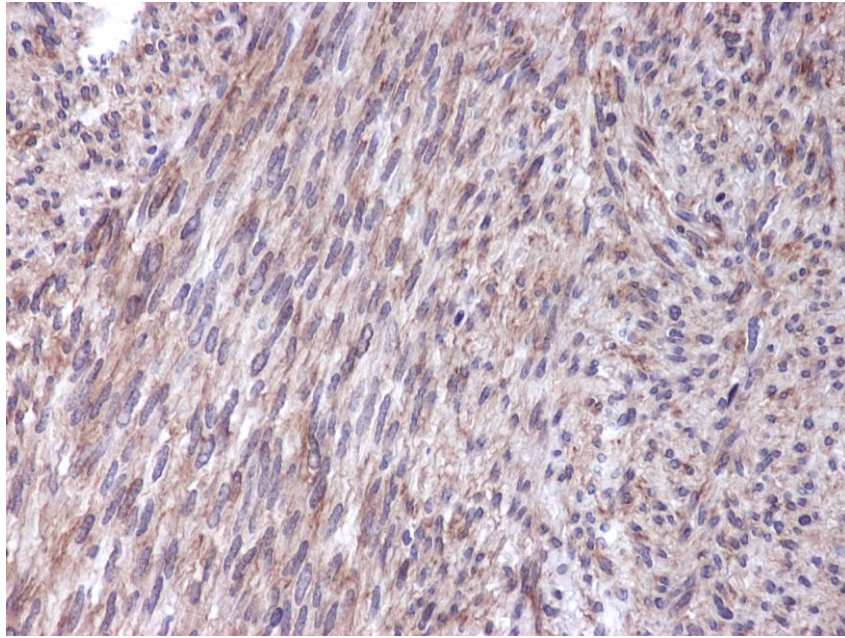


Figura 4.5 GIST con moderata positività per PDGFRA

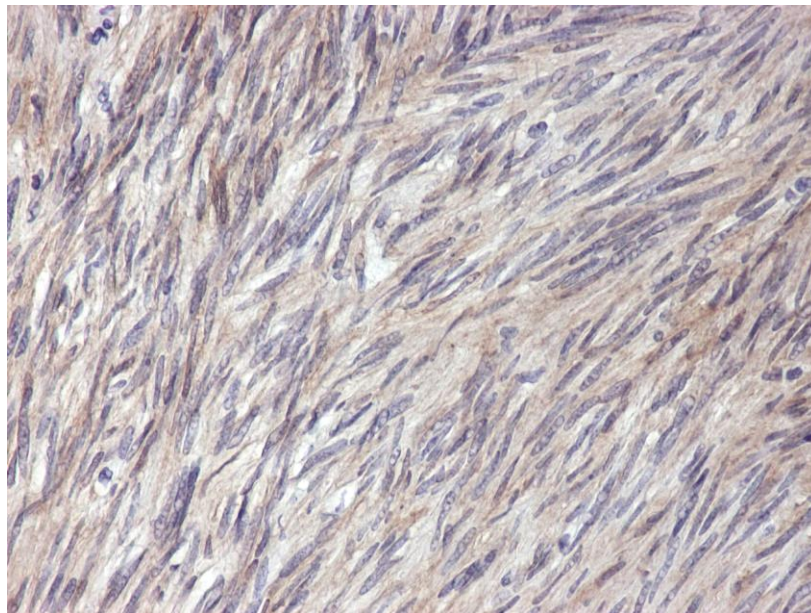


Figura 4.6 GIST con debole positività per PDGFRA

Trentadue casi (82%) esprimevano CD34, 20 (51,3%) la vimentina, 13 (33,3%) l'actina, un caso (2,6%) la desmina e 2 (5,1%) la proteina S-100.

In venti casi (51,3%) non era identificabile una linea differenziativa, 11 casi (28,2%) manifestavano una differenziazione muscolare liscia e 2 (5,1%) una differenziazione di tipo misto neurale-muscolare liscia.

La percentuale di cellule Ki-67 positive è risultata in media del 7,7% (range dell'1-40%); scegliendo come *cut-off* il 5% 26 pazienti (66,6%) appartenevano al gruppo con valore $\leq 5\%$ e 13 (33,3%) a quello $>5\%$.

L'indice mitotico è risultato in media di 18,10 mitosi per 50 HPF in un range di 1-99; scegliendo come *cut-off* il 5% 24 pazienti (61,5%) appartenevano al gruppo con valore $\leq 5\%$ e 15 (38,5%) a quello $>5\%$.

E' stata inoltre dimostrata una correlazione statisticamente significativa tra le variabili Ki-67 e indice mitotico con una p inferiore allo 0,0001.

Sono state rilevate aree di necrosi in 13 tumori (33,3%) e di emorragia in 12 casi (30,8%). La neoplasia invadeva la mucosa in 9 casi (23,1%) ed era presente ulcerazione in 16 casi (41%).

Secondo le categorie di rischio di *Fletcher et al.*²⁶ (Tab.4.4): 3 casi (7,7%) rientravano nel rischio molto basso, 8 (20,5%) nel basso, 11 (28,2%) nell'intermedio e 17 (43,6%) nell'alto. Considerando invece le categorie di rischio sec. *Miettinen et al.*³²⁹ 4 pazienti (10,3%) non presentavano nessun rischio di potenziale maligno, 8 (20,5%) appartenevano al gruppo a rischio molto basso, 7 (18%) a quello basso, 10 (25,6%) a quello intermedio ed i restanti 10 (25,6%) a quello alto.

c) ANALISI MOLECOLARE (dati precedentemente pubblicati)

Mutazioni del gene KIT (Tab. 4.5) sono state osservate in 25 casi alla diagnosi (64,1%), di queste 24 (96%) erano localizzate nell'esone 11 e 1 (4%) nell'esone 9. Non sono state identificate mutazioni negli esoni 13 e 17 di KIT.

Le mutazioni di KIT individuate erano 12 delezioni (48%), 6 mutazioni puntiformi (24%), 3 mutazioni puntiformi e delezioni (12%), 3 duplicazioni (12%) e un'inserzione (4%).

Le mutazioni di KIT erano tutte differenti, ad eccezione di due casi che presentavano la stessa delezione di 6 paia di basi a livello dei codoni 557-558 dell'esone 11 e di altri tre casi che mostravano la stessa mutazione puntiforme V559D.

Dei 14 casi KIT-WT (35,9%), 6 (42,6%) presentavano mutazioni del gene PDGFRA e di queste 5 erano a livello dell'esone 18 e uno nell'esone 12.

Globalmente le mutazioni di PDGFRA sono state rilevate in 6 GIST primitivi (15,4%), di queste 4 erano delezioni e 2 mutazioni puntiformi (Tab 4.6).

In 8 casi (20,5%) non sono state individuate mutazioni nè del gene KIT, nè di PDGFRA.

Tabella 4.5 Risultati delle analisi molecolari dei geni KIT e PDGFRA

VARIABILE	N° PZ (%)
PRESENZA DI MUTAZIONI DI C-KIT	
- wt	14 (35,9)
- esone 11	24 (96)
- esone 9	1 (4)
- esone 13	0 (0)
- esone 17	0 (0)
	} 25(64,1) pz KIT-mutati
TIPO DI MUTAZIONI DI C-KIT	
- wt	14 (35,9)
- delezioni	12 (48)
- mutazioni puntiformi	6 (24)
- delezioni+mutazioni puntiformi	3 (12)
- duplicazioni	3 (12)
- inserzioni	1 (4)
	} 25 (64,1) pz KIT-mutati
PRESENZA DI MUTAZIONI DI PDGFRA	
- wt	33 (84,6)
- esone 12	1 (16,6)
- esone 18	5 (83,3)
	} 6 (15,4) pz PDGFRA-mutati
TIPO DI MUTAZIONI DI PDGFRA	
- wt	33 (83,3)
- delezioni	4 (66,7)
- mutazioni puntiformi	2 (33,3)
- delezioni+mutazioni puntiformi	0 (0)
- inserzioni	0 (0)
	} 6 (15,4) pz PDGFRA-mutati

Tabella 4.6 Mutazioni del gene PDGFRA nei 6 GIST della casistica

MUTAZIONE PDGFRA	NUMERO DI CASI
esone 18	
DelIMHD	3
D842S	1
D842V	1
esone 12	
DelPDGHE	1

d) ESPRESSIONE DELLA CAVEOLINA-1 NEI TUMORI PRIMITIVI-Analisi descrittive

La Cav1 è risultata positiva da debolmente (+) ad intensamente (+++) in 16/39 (41%) casi di tumori primitivi con un'estensione variabile dal 10 al 100% delle cellule (Fig. 4.7, 4.8, 4.9). (Tab. 4.7).

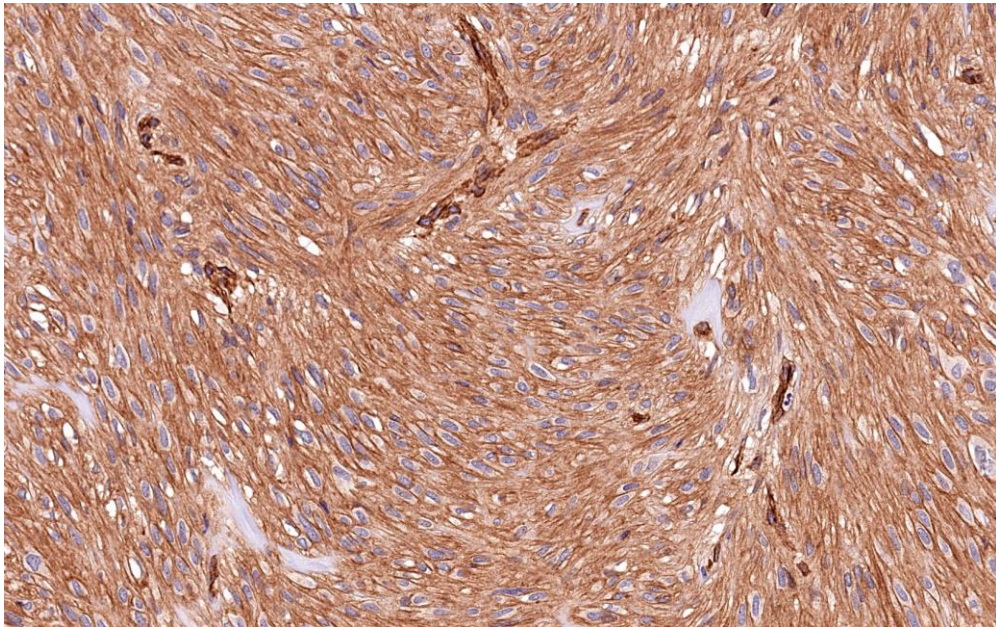


Fig. 4.7 GIST con positività intensa (+++) per Cav1

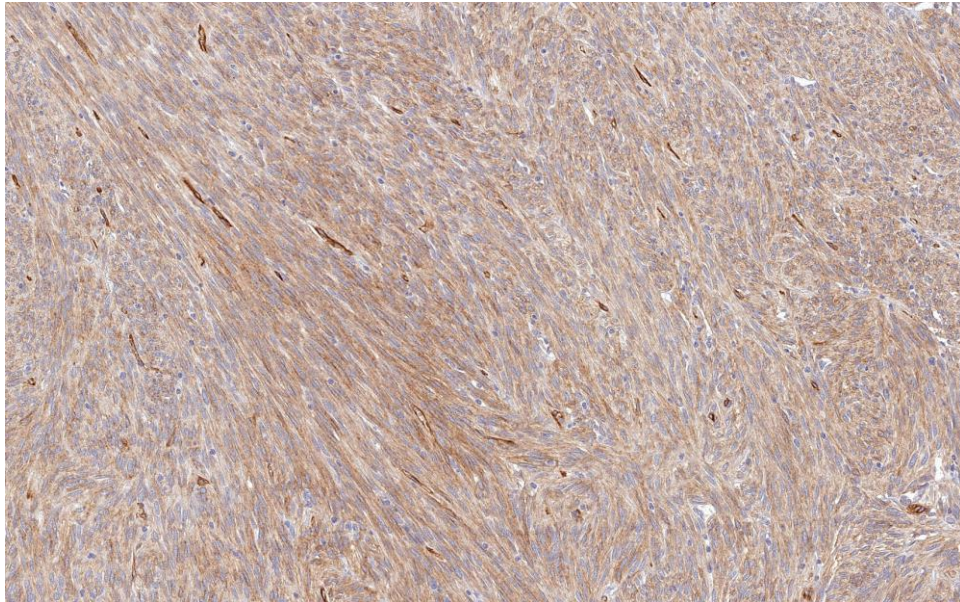


Fig. 4.8 GIST con positività moderata (++) per Cav1

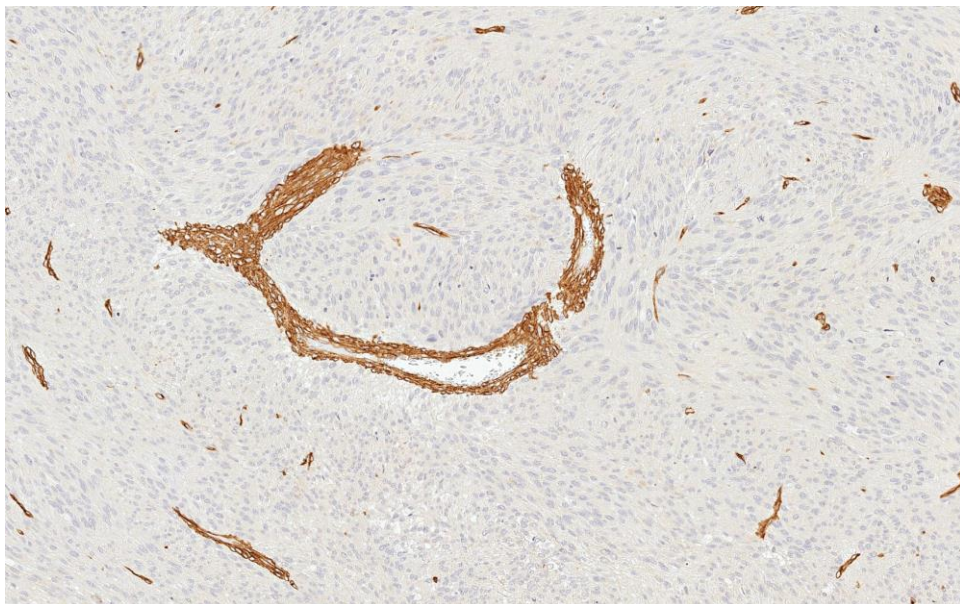


Fig. 4.9 GIST negativo per Cav1 (positività di controllo esclusivamente nelle strutture vascolari)

Tab. 4.7 Espressione di Cav1 nei GIST primitivi

Cav1		
-	negativa	23 (59%)
-	positiva	16 (41%)
	▪ +/++ (< 50% cellule)	6 (37,5%)
	▪ +/++ (50-99% cellule)	4 (25%)
	▪ ++ (100% cellule)/ +++	6 (37,5%)

La maggior parte dei casi positivi per Cav1 dimostravano una differenziazione verso muscolo liscio (espressione di actina muscolare liscia o desmina) o mista muscolare liscia-neurale (espressione di actina muscolare liscia o desmina e di S100) (p=0.02) (Tab. 4.8).

Tabella 4.8 Correlazione tra espressione di Cav1 e differenziazione

			Espressione CAV1		Totale
			negativa	positiva	
DIFFERENZIAZIONE	Muscolare	Conteggio	4	9	13
	liscia/ mista	% entro DIFFERENZ	30,8%	69,2%	100,0%
	muscolare liscia-neurale	% entro CAV1	21,1%	64,3%	39,4%
	indifferenziato	Conteggio	15	5	20
		% entro DIFFERENZ	75,0%	25,0%	100,0%
		% entro CAV1	78,9%	35,7%	60,6%
Totale		Conteggio	19	14	33*
		% entro DIFFERENZ	57,6%	42,4%	100,0%
		% entro CAV1	100,0%	100,0%	100,0%

$$\chi^2 = 4.629 \text{ p} = 0.02$$

* 6 casi in cui differenziazione non valutata

L'espressione di Cav1 correlava inoltre significativamente con la positività immunohistochimica per PDGFRA (p=0.002) (Tab. 4.9) ed in particolare tutti i casi intensamente positivi per PDGFRA (pattern dot-like) erano contemporaneamente positivi per la caveolina-1 (p=0.008) (Tab. 4.10).

Tabella 4.9 Correlazione tra espressione di Cav1 e di PDGFRA

			CAV1		Totale
			negativa	positiva	
PDGFRA	negativa	Conteggio	13	3	16
		% entro PDGFRA	81,3%	18,8%	100,0%
		% entro CAV1	56,5%	18,8%	41,0%
	positiva	Conteggio	10	13	23
		% entro PDGFRA +/-	43,5%	56,5%	100,0%
		% entro CAV1	43,5%	81,3%	59,0%

Totale	Conteggio	23	16	39
	% entro PDGFRA	59,0%	41,0%	100,0%
	% entro CAV1	100,0%	100,0%	100,0%

$$\chi^2 = 4.112 \quad p = 0.02$$

Tabella 4.10 Correlazione tra espressione di Cav1 e intensità di positività per PDGFRA

			CAV1		Totale
			1	2	
PDGFRA INTENSITA'	negativa	Conteggio	13	3	16
		% entro PDGFRA INTENSITA'	81,3%	18,8%	100,0%
		% entro CAV1	56,5%	18,8%	41,0%
+		Conteggio	5	2	7
		% entro PDGFRA INTENSITA'	71,4%	28,6%	100,0%
		% entro CAV1	21,7%	12,5%	17,9%
++		Conteggio	5	6	11
		% entro PDGFRA INTENSITA'	45,5%	54,5%	100,0%
		% entro CAV1	21,7%	37,5%	28,2%
+++		Conteggio	0	5	5
		% entro PDGFRA INTENSITA'	,0%	100,0%	100,0%
		% entro CAV1	,0%	31,3%	12,8%
Totale		Conteggio	23	16	39
		% entro PDGFRA INTENSITA'	59,0%	41,0%	100,0%
		% entro CAV1	100,0	100,0%	100,0%

$$\chi^2 = 11.749 \quad p = 0.008$$

Come precedentemente riportato²⁵⁴ la positività immunoistochimica con accentuazione perinucleare dot-like per PDGFRA correlava con la presenza di mutazione nel corrispondente gene ($p < 0.0001$) ed infatti allo stesso modo la Cav1 è stata associata all'evidenza di mutazioni in PDGFRA ($p=0.03$) (Tab. 4.11).

Tabella 4.11 Correlazione tra espressione di Cav1 e stato mutazionale di PDGFRA

			CAV1		Totale
			1	2	
PDGFRA WT MUTAZIONI	Conteggio		22	11	33
	% entro PDGFRA		66,7%	33,3%	100,0%
	% entro CAV1		95,7%	68,8%	84,6%
Mutazioni ex12 o ex 18	Conteggio		1	5	6
	% entro PDGFRA		16,7%	83,3%	100,0%
	% entro CAV1		4,3%	31,3%	15,4%
Totale	Conteggio		23	16	39
	% entro PDGFRA		59,0%	41,0%	100,0%
	% entro CAV1		100,0%	100,0%	100,0%

$$\chi^2 = 3.383 \text{ p} = 0.03$$

La maggioranza dei casi esprimenti Cav1 dimostravano inoltre un numero di mitosi $\leq 5/50$ hpf ($p=0.049$) (Tab. 4.12) ed un indice proliferativo MIB1 $\leq 5\%$ ($p=0.003$) (Tab. 4.13).

Tabella 4.12 Correlazione tra espressione di Cav1 e indice mitotico

			CAV1		Totale
			negativa	positiva	
MITOSI $\leq 5/50$	Conteggio		11	13	24
	% entro MITOSI		45,8%	54,2%	100,0%
	% entro CAV1		47,8%	81,3%	61,5%
$>5/50$	Conteggio		12	3	15
	% entro MITOSI		80,0%	20,0%	100,0%
	% entro CAV1		52,2%	18,8%	38,5%
Totale	Conteggio		23	16	39
	% entro MITOSI		59,0%	41,0%	100,0%
	% entro CAV1		100,0%	100,0%	100,0%

$$\chi^2 = 3.154 \text{ p} = 0.049$$

Tabella 4.13 Correlazione tra espressione di Cav1 e indice proliferativo-MIB1

			CAV1		Totale
			negativa	positiva	
MIB1	≤ 5%	Conteggio	11	15	26
		% entro MIB1	42,3%	57,7%	100,0%
		% entro CAV1	47,8%	93,8%	66,7%
	>5%	Conteggio	12	1	13
		% entro MIB1	92,3%	7,7%	100,0%
		% entro CAV1	52,2%	6,3%	33,3%
Totale	Conteggio	23	16	39	
	% entro MIB1	59,0%	41,0%	100,0%	
	% entro CAV1	100,0%	100,0%	100,0%	

$$\chi^2 = 7.008 \text{ p} = 0.005$$

I casi positivi per Cav1 presentavano infatti un numero medio di mitosi di 7,38 vs 25,57 di quelli negativi (Tab.4.14).

Tabella 4.14 Correlazione tra espressione di Cav1 e valori medi di indice proliferativo-MIB1 e numero di mitosi

CAV1		N	Media	Deviazione std.
MIB1	negativa	23	9,48	8,999
	positiva	16	5,13	9,401
MITOSI	negativa	23	25,57	34,093
	positiva	16	7,38	14,778

Test per campioni indipendenti

		Test t di uguaglianza delle medie			
		t	df	Sig. (2-code)	Differenza fra medie
KI67	Assumi varianze uguali	1,459	37	,153	4,353
	Non assumere varianze uguali	1,447	31,493	,158	4,353
MITOSI	Assumi varianze uguali	2,001	37	,053	18,190
	Non assumere varianze uguali	2,270	32,059	,030	18,190

MITOSI: p= 0.03

MIB1 n.s. (p=0,15)

La positività per Cav1 è stata inoltre associata a categorie di rischio molto basso-intermedio sec. Fletcher²⁶ (p=0.05) (Tab. 4.15) e nessuno-basso sec. Miettinen³²⁹ (p=0,05) (Tab. 4.16).

Tabella 4.15 Correlazione tra espressione di Cav1 e categorie di rischio sec. Fletcher²⁶

					CAV1		Totale
					negativa	positiva	
CATEGORIA RISCHIO SEC. FLETCHER	Molto	Conteggio			2	1	3
	basso	% entro	CATEGORIA		66,7%	33,3%	100,0%
		RISCHIO					
		% entro CAV1			8,7%	6,3%	7,7%
basso	Conteggio				3	5	8
	% entro	CATEGORIA			37,5%	62,5%	100,0%
		RISCHIO					
	% entro CAV1				13,0%	31,3%	20,5%
interm edio	Conteggio				4	7	11
	% entro	CATEGORIA			36,4%	63,6%	100,0%
		RISCHIO					
	% entro CAV1				17,4%	43,8%	28,2
alto	Conteggio				14	3	17
	% entro	CATEGORIA			82,4%	17,6%	100,0%
		RISCHIO					
	% entro CAV1	99%=3; +++ o ++ 100%=4)			60,9%	18,8%	43,6%
Totale	Conteggio				23	16	39
	% entro	CATEGORIA			59,0%	41,0%	100,0%
		RISCHIO					
	% entro CAV1				100,0%	100,0%	100,0%

$$\chi^2 = 3.104 \text{ p} = 0.05$$

Tabella 4.16 Correlazione tra espressione di Cav1 e categorie di rischio sec.**Miettinen³²⁹**

			Categoria di rischio sec. Miettinen		Totale
			Nessuno, molto basso, basso	Moderato-alto	
CAV1 negativa	Conteggio		8	15	23
	% entro CAV1		34,8%	65,2%	100,0%
	% entro Categoria di rischio		42,1%	75,0%	59,0%
CAV1 positiva	Conteggio		11	5	16
	% entro CAV1		68,8%	31,3%	100,0%
	% entro Categoria di rischio		57,9%	25,0%	41,0%
Totale	Conteggio		19	20	39
	% entro CAV1		48,7%	51,3%	100,0%
	% entro Categoria di rischio		100,0%	100,0%	100,0%

$$\chi^2 = 3.104 \text{ p} = 0.05$$

Pur non raggiungendo la significatività statistica si è osservato un trend per quanto riguardava la correlazione tra espressione di Cav1 e la presenza di necrosi e emorragia: infatti rispettivamente il 76,9% dei casi con aree di necrosi ed il 75% di quelli con emorragia risultavano negativi per Cav1. Allo stesso modo il 77,8% dei casi con invasione della mucosa ed il 75% di quelli con ulcerazione non esprimevano Cav1 (p = ns).

Tutti i 5 casi che mostravano al momento dell'intervento chirurgico infiltrazione di organi o strutture adiacenti erano negativi per Cav1 con una correlazione ai limiti della significatività statistica (p=0.06). In modo analogo l'81,8% dei casi che presentavano metastasi sincrone o metacrone non esprimevano Cav1 (p=0.08).

L'espressione della Cav1 non è stata correlata significativamente con la sede primitiva del tumore (p=0.47) ma l'81,3% dei casi positivi per la proteina erano localizzati nello stomaco.

La positività per Cav1 non è stata associata in modo significativo a p130Cas ma è stata osservata in 3 casi la presenza di una eterogeneità intratumorale dell'espressione delle due proteine con positività in aree speculari, come a

selezionare cloni differenti all'interno dello stesso tumore del singolo paziente (Fig 4.10).

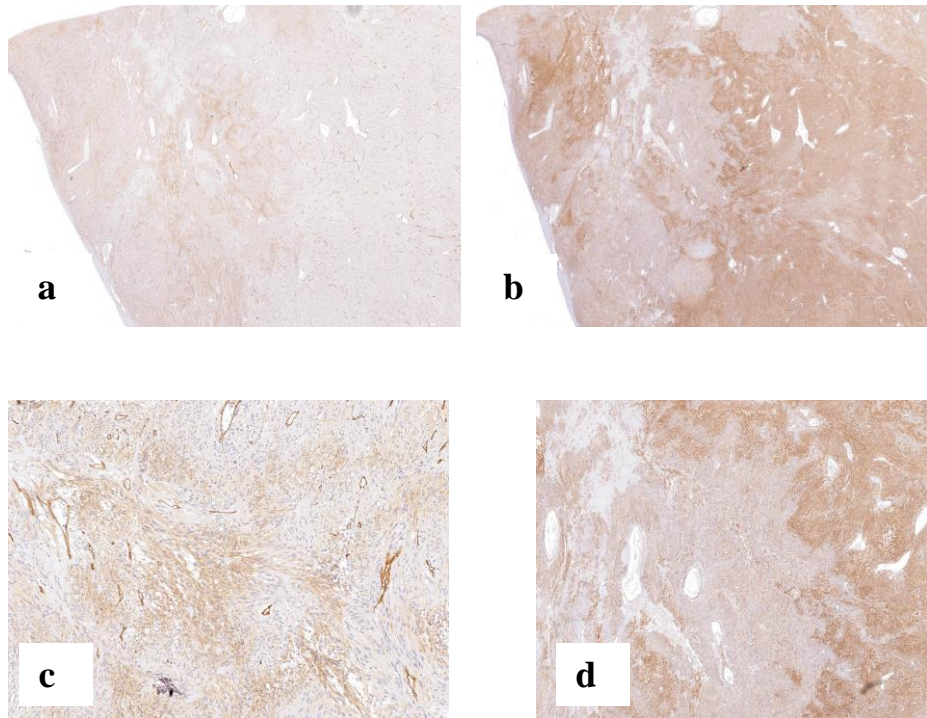


Fig. 4.10 Espressione delle due proteine Cav1 (a,c) e p130Cas (b,d) con positività in aree speculari nello stesso campione di GIST (a, b: piccolo ingrandimento; c,d: inset a maggiore ingrandimento)

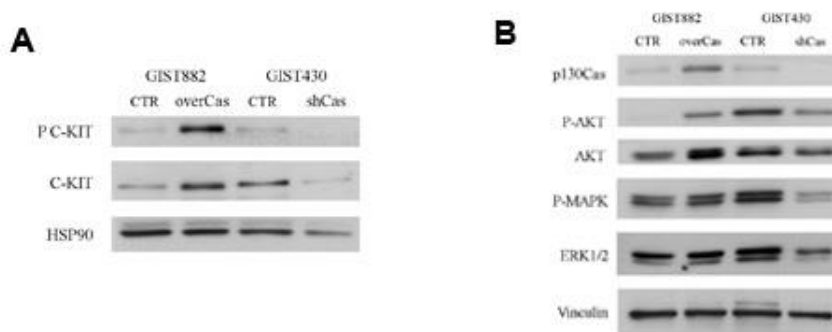
La Cav1 non ha ovviamente dimostrato alcuna associazione con la risposta alla terapia con Glivec e con la resistenza secondaria, dal momento che l'87,5% dei casi positivi per la proteina non sono stati trattati con Glivec, in virtù anche delle loro migliori caratteristiche biologiche e prognostiche.

e) Valutazione di p130Cas in linee cellulari di GIST

In questo studio, per capire quali vie di segnalazione siano attivate da p130Cas/BCAR1 nei GIST, sono stati condotti esperimenti in vitro utilizzando linee cellulari di GIST sensibili e resistenti alla terapia con imatinib. Le linee cellulari di GIST sensibili all'imatinib (GIST 882) sono state infettate con vettori lentivirali che trasportavano il cDNA di p130Cas. I risultati ottenuti tramite

western blot indicano come alti livelli di p130Cas siano sufficienti ad indurre l'attivazione di KIT e delle sue vie di signalling a valle (Akt, MAPK) (Fig. 4.11 A-B), in modo analogo agli eventi descritti durante l'acquisizione di resistenza secondaria. Al contrario il silenziamento di p130Cas nelle linee cellulari di GIST resistenti (GIST430R) determina una ridotta attivazione ed espressione di KIT e dei suoi effettori a valle (Fig 4.11 A-B).

Fig. 4.11A-B) Analisi di Western Blot in linee cellulari di GIST sensibili (GIST882) e resistenti (GIST430), in cui è stata rispettivamente iperespressa e silenziata p130Cas.



Quindi l'iperespressione di p130Cas in linee cellulari di GIST sensibili all'imatinib induce un'attivazione forte sia di AKT sia di MAPK ed in modo diametralmente opposto l'inibizione della proteina nelle linee resistenti è sufficiente per ridurre l'attivazione di entrambe AKT e MAPK.

f) ESPRESSIONE DI p130Cas NEI TUMORI PRIMITIVI- Analisi descrittive

In considerazione di questi esperimenti in vitro è stata valutata l'espressione immunostochimica di p130Cas nei 39 campioni di tumore primitivo: 37 casi primitivi (95% circa) sono risultati positivi per p130Cas ma con differenti gradi di intensità (da + a +++/dot-like) (Tab. 4.17) e di estensione (dal 10 al 100% delle cellule neoplastiche) (Fig. 4.12, 4.13) . Gli unici 2 casi negativi o sostanzialmente negativi della casistica erano KIT e PDGFRA wild-type (Fig. 4.14).

Tabella 4.17 Espressione di p130Cas nei GIST primitivi

p130Cas		
-	negativa	2 (5,1%)
-	positiva	37 (94,9%)
	▪ +	18 (48,7%)
	▪ ++	11 (29,7%)
	▪ +++	8 (21,6)

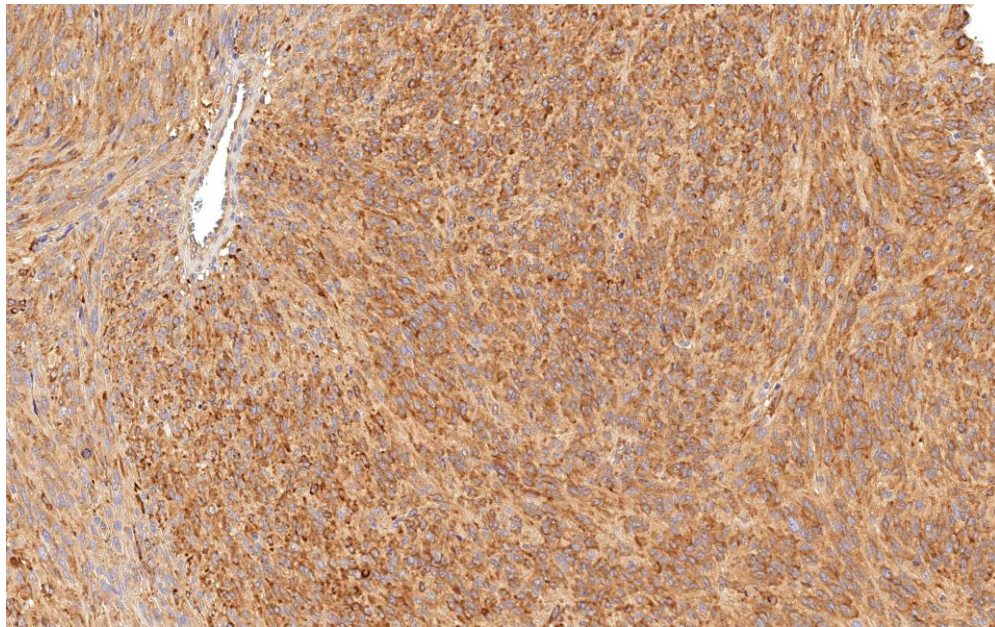


Fig. 4.12 GIST intensamente positivo (+++, pattern dot-like) per p130Cas

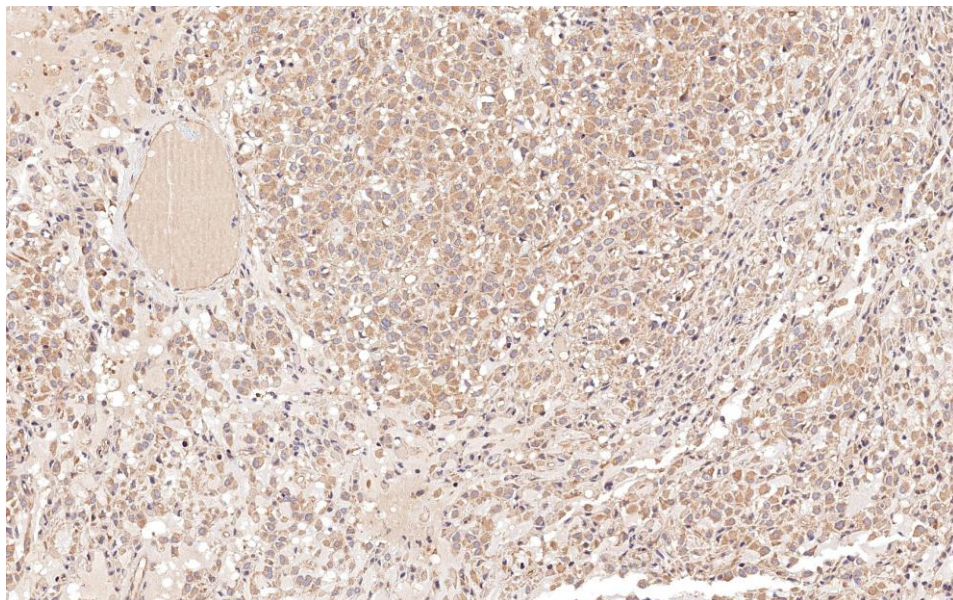


Fig. 4.13 GIST moderatamente positivo per p130Cas

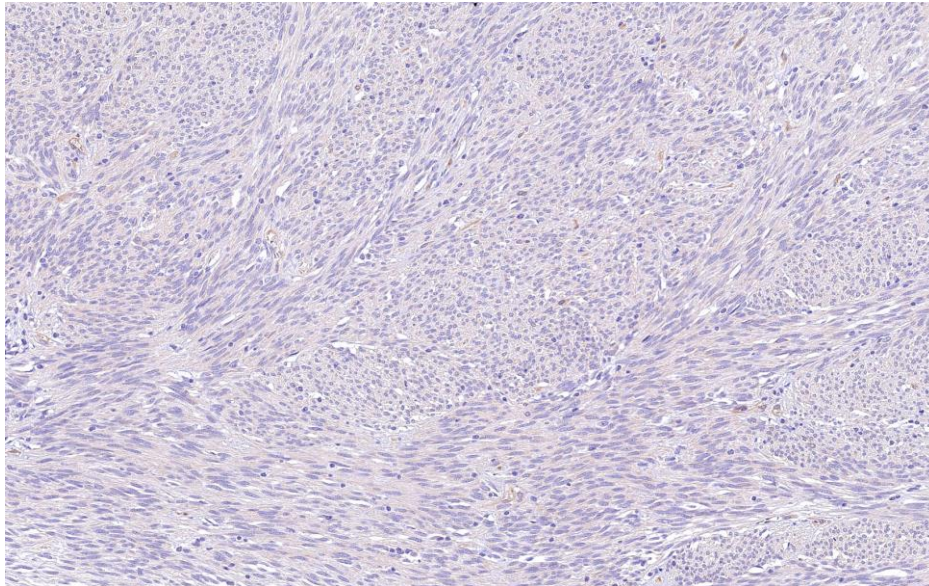


Fig. 4.14 GIST negativo per p130Cas

Tutti gli 8 casi intensamente positivi (+++) erano associati a categorie di rischio moderato-alto sec. Miettinen ($p=0,01$) (Tab. 4.18) e avevano presentato sintomi all'esordio (Tab. 4.19).

Tabella 4.18 Correlazione tra espressione di p130Cas e categorie di rischio sec. Miettinen³²⁹

			Categoria di rischio sec.		Totale
			Miettinen		
			Nessuno, molto basso, basso	Moderato-alto	
p130cas Negativa/ sostanzialmente negativa	Conteggio		2	0	2
	% entro p130cas		100,0%	,0%	100,0%
	% entro Categoria di rischio		10,5%	,0%	5,1%
Debolmente positiva (+)	Conteggio		11	7	18
	% entro p130cas		61,1%	38,9%	100,0%
	% entro Categoria di rischio		57,9%	35,0%	46,2%
Moderatamente positiva (++)	Conteggio		6	5	11
	% entro p130cas		54,5%	45,5%	100,0%
	% entro Categoria di rischio		31,6%	25,0%	28,2%
Intensamente positiva (+++)	Conteggio		0	8	8
	% entro p130cas		,0%	100,0%	100,0%
	% entro Categoria di rischio		,0%	40,0%	20,5%
Totale	Conteggio		19	20	39

% entro p130cas	48,7%	51,3%	100,0%
% entro Categoria di rischio	100,0%	100,0%	100,0%

$$\chi^2 = 10.961 \text{ p} = 0.01$$

Tabella 4.19 Correlazione tra espressione di p130Cas e presenza di sintomi all'esordio

			p130cas				Totale
			Negativa/ sostanzialmente negativa	Debolmente positiva (+)	Moderatamente positiva (++)	Intensamente positiva (+++)	
SINTOMI assenti	Conteggio		2	3	5	0	10
	% entro		20,0%	30,0%	50,0%	0%	100%
	SINTOMI						
	% entro		100,0%	16,7%	50,0%	0%	26,3%
SINTOMI presenti	Conteggio		0	15	5	8	28
	% entro		,0%	53,6%	17,9%	28,6%	21,1%
	SINTOMI						
	% entro		,0%	83,3%	50,0%	100%	100%
Totale	Conteggio		2	18	10	8	38
	% entro		5,3%	47,4%	26,3%	21,1%	100%
	SINTOMI						
	% entro		100,0%	100,0%	100,0%	100%	100%

$$\chi^2 = 12,214 \text{ p} = 0.007$$

L'87,5% dei casi intensamente positivi per p130Cas (comprendenti anche gli unici 4 casi con pattern dot-like) mostravano mutazioni in c-kit (Tab. 4.20 p=0.05), al contrario nessuno dei 6 casi PDGFRA mutati mostravano una positività intensa per p130Cas pur non raggiungendo la significatività statistica (p=0.1).

Tabella 4.20 Correlazione tra espressione di p130Cas e stato mutazione di c-kit

		p130cas				Totale
		Negativa/ sostanzialmente negativa	Debolmente positiva (+)	Moderatamente positiva (++)	Intensamente positiva (+++)	
CKIT WT	Conteggio	2	5	6	1	14
	% entro CKIT	14,3%	35,7%	42,9%	7,1%	
	% entro p130cas	100,0%	27,8%	54,5%	12,5%	
MUTATO	Conteggio	0	13	5	7	25
	% entro CKIT	,0%	52,0%	20,0%	28%	100%
	% entro p130cas	,0%	72,2%	45,5%	87,5%	64,1%
Totale	Conteggio	2	18	11	8	39
	% entro CKIT	5,1%	46,2%	28,2%	20%	100%
	% entro p130cas	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100%

$$\chi^2 = 7,653 \text{ p} = 0.05$$

9 pazienti (9/39 23%) sono stati trattati con imatinib e 3 di questi hanno sviluppato resistenza secondaria dopo una iniziale risposta. Un ulteriore caso privo del campione primitivo ma comprendente solo recidive istologiche è stato trattato con imatinib e ha sviluppato resistenza secondaria. Sebbene la bassa numerosità campionaria dei pazienti trattati non abbia permesso di condurre analisi statisticamente significative, si è osservata un'estesa positività per p130Cas (90-100% delle cellule, ma con positività variabile dal debole all'intenso) in 3/4 casi che hanno sviluppato resistenza secondaria e in realtà anche nel restante caso resistente il primo campione primitivo risultava debolmente positivo solo nel 10% delle cellule, ma alla terza recidiva (pre-glivec) la positività era nettamente incrementata al 100% delle cellule.

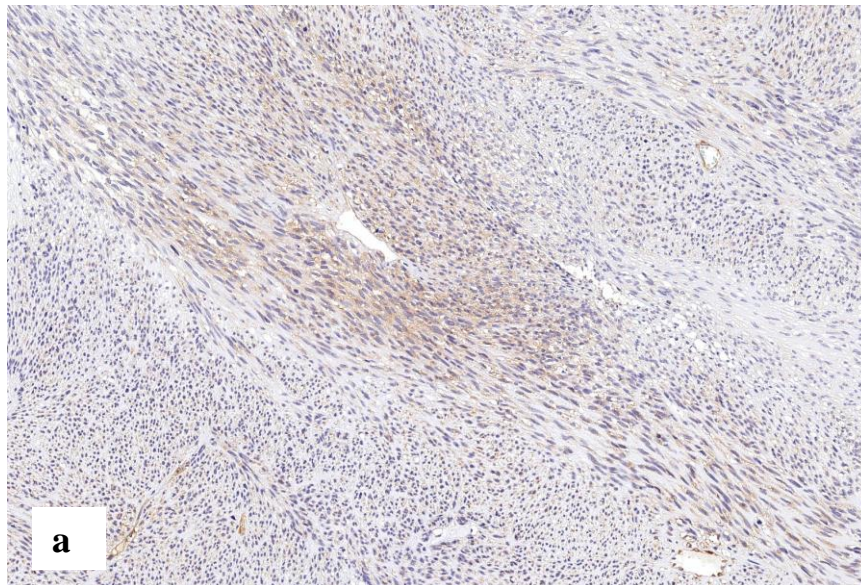
Inoltre i 4 casi che hanno dimostrato una progressione di malattia durante il trattamento con imatinib erano tutti diffusamente positivi per p130Cas (100% ++/+++).

Dal punto di vista prognostico p130Cas non ha mostrato nessuna correlazione statisticamente significativa con le altre variabili clinico-patologiche in esame, si è però osservato un trend per quanto riguarda l'indice mitotico in quanto il 75% dei

casi intensamente positivi per la proteina mostravano un numero di mitosi $> 5/50$ hpf ($p=0.08$).

g) ESPRESSIONE DELLA CAVEOLINA-1 E DI p130Cas NELLE RECIDIVE TUMORALI

Nessuno degli 11 campioni (relativi a 7 pazienti) di recidiva tumorale analizzati esprimeva Cav1 ($p=0.01$), al contrario non è stata dimostrata alcuna associazione tra la positività per p130Cas valutata nel gruppo dei tumori primitivi rispetto ai campioni delle recidive neoplastiche. In 6 dei 7 casi con uno o più campioni di recidiva tumorale si è osservato però un incremento della quota di cellule neoplastiche positive per p130Cas (o una stabilità nel caso di massima positività 100% +++) (Fig. 4.15 a-b)



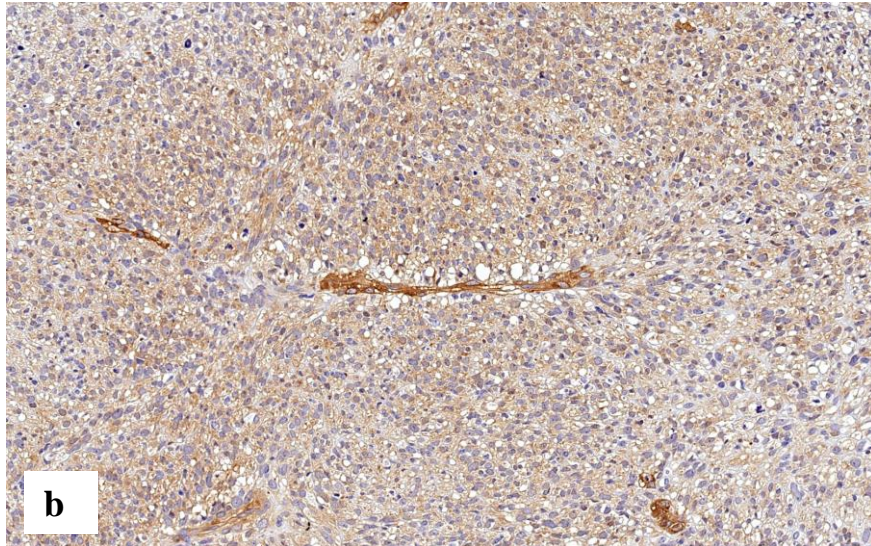


Fig. 4.15 a-b) Incremento della quota di cellule neoplastiche positive per p130Cas dal tumore primitivo (a: 10% delle cellule debolmente positive) a quello della terza recidiva neoplastica nello stesso paziente (b: 100% delle cellule debolmente positive)

g) ANALISI DI SOPRAVVIVENZA

E' stata valutata la correlazione tra le diverse variabili incluse nello studio e la sopravvivenza globale (OS) e quella libera da malattia (DFS), che è stata calcolata dal momento dell'intervento chirurgico alla comparsa di recidiva o all'ultimo controllo di follow-up.

Anche in considerazioni delle caratteristiche clinico-patologiche descritte nei paragrafi precedenti, in analisi univariata la positività per Cav1 correlava con una prognosi migliore, sia in termini di sopravvivenza globale ($p=0.02$) (fig 4.16) che di sopravvivenza libera da malattia ($p=0.01$) (fig 4.17), in modo parallelo a quanto precedentemente dimostrato con i casi PDGFRA positivi ($p=0.007$) con un valore di p ancora più significativo dopo l'aggiornamento del follow-up (fig 4.18).

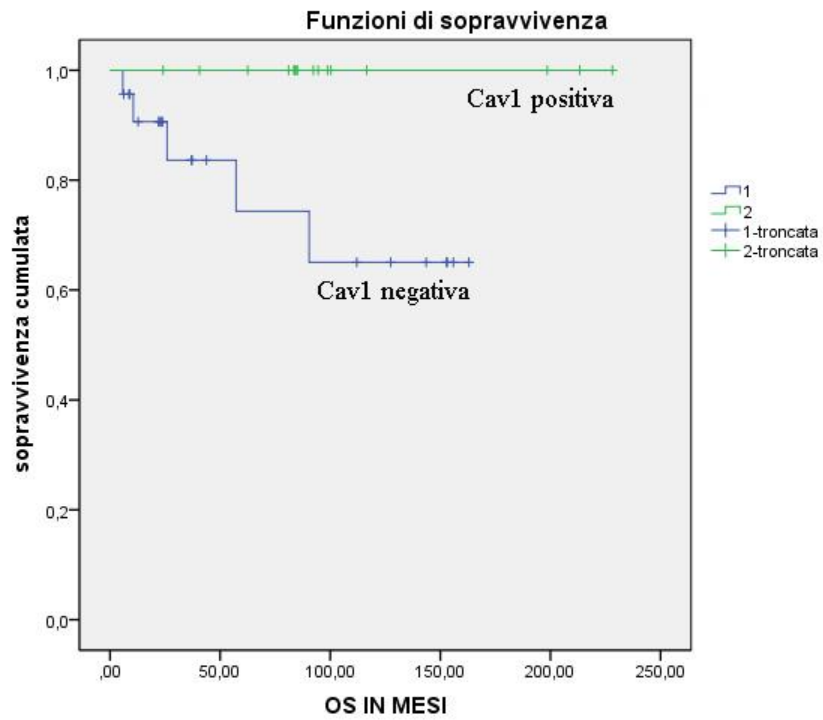


Figura 4.16 Curve di Kaplan-Meyer di OS in relazione all'espressione di Cav1

$p=0.02$

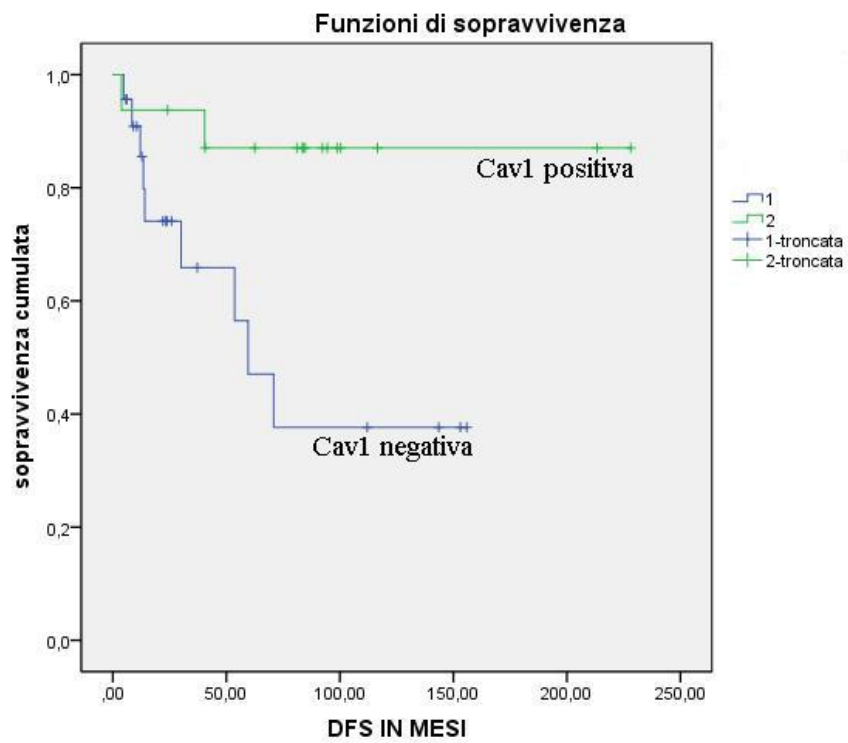


Figura 4.17 Curve di Kaplan-Meyer di DFS in relazione all'espressione di Cav1

$p=0.01$

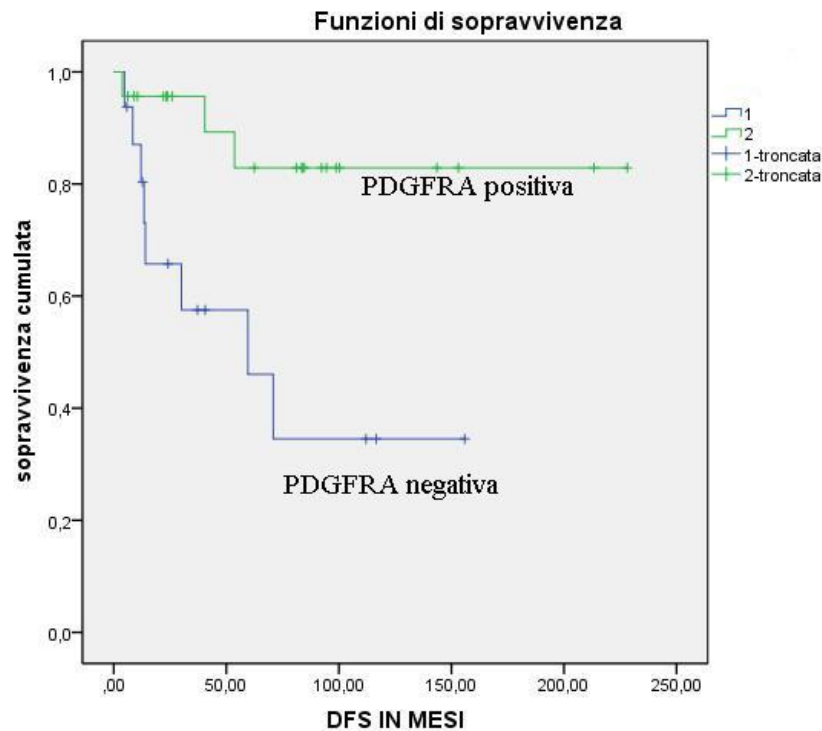


Figura 4.18 Curve di Kaplan-Meier di DFS in relazione all'espressione di PDGFRA
 $p=0.007$

L'espressione di PDGFRA non costituiva però un fattore predittivo di OS. Come atteso, le categorie di rischio sec. Miettinen³²⁹ stratificate nei 2 gruppi (rischio nessuno, molto basso e basso vs rischio moderato e alto) sono risultate un fattore predittivo di DFS (0,04) (fig. 4.19), mentre non è stata dimostrata una correlazione con l'OS. In modo analogo le categorie di rischio sec. Fletcher²⁶ stratificate nei due gruppi (rischio molto basso e basso vs intermedio e alto) hanno dato gli stessi risultati nelle analisi di DFS ($p=0.02$) (fig 4.20).

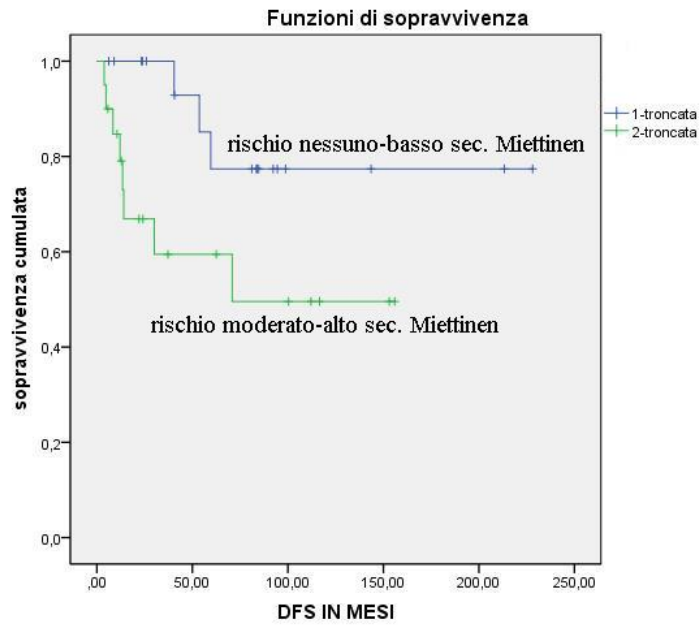


Figura 4.19 Curve di Kaplan-Meyer di DFS nei due sottogruppi delle categorie di rischio sec. Miittinen³²⁹

(rischio nessuno,molto basso e basso vs rischio moderato e alto)

p=0.04

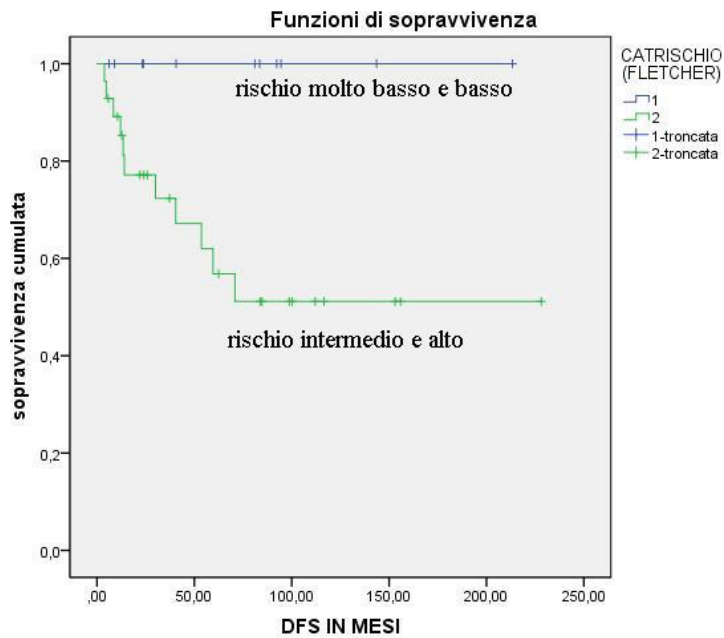


Figura 4.20 Curve di Kaplan-Meyer di DFS nei due sottogruppi delle categorie di rischio sec. Fletcher²⁶

(rischio molto basso e basso vs rischio moderato e alto)

p=0.02

Anche dopo l'aggiornamento del follow-up l'indice mitotico stratificato nei due gruppi ($\leq 5/50\text{HPF}$ vs $> 5/50\text{ HPF}$; $p=0.001$) e l'indice proliferativo MIB1 ($\leq 5\%$ vs $> 5\%$; $p< 0.0001$) sono risultati essere correlati con la DFS (fig. 4.21, 4.22) con un miglioramento della significatività statistica, mentre non sono stati associati con l'OS.

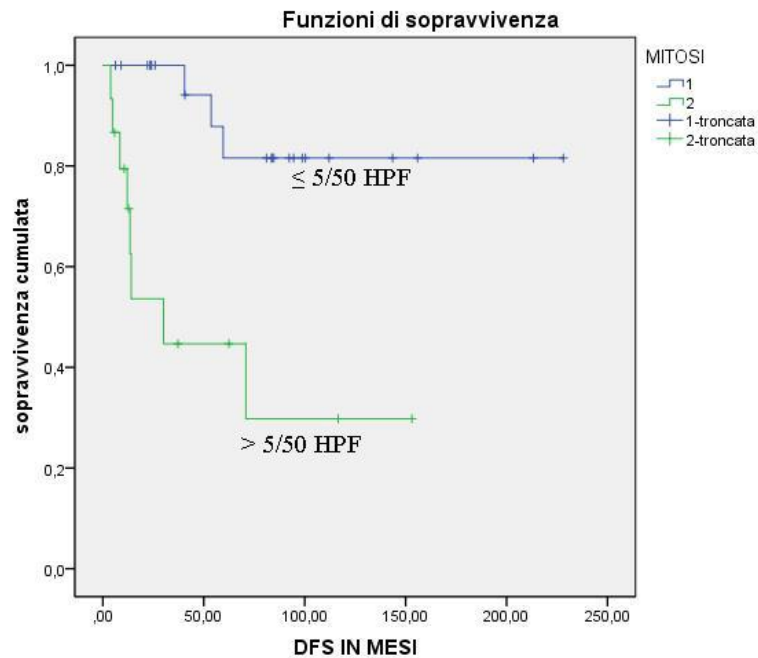


Figura 4.21 Curve di Kaplan-Meier di DFS nei due sottogruppi di indice mitotico ($\leq 5/50\text{ HPF}$ vs $> 5/50\text{ HPF}$)
 $p=0.001$

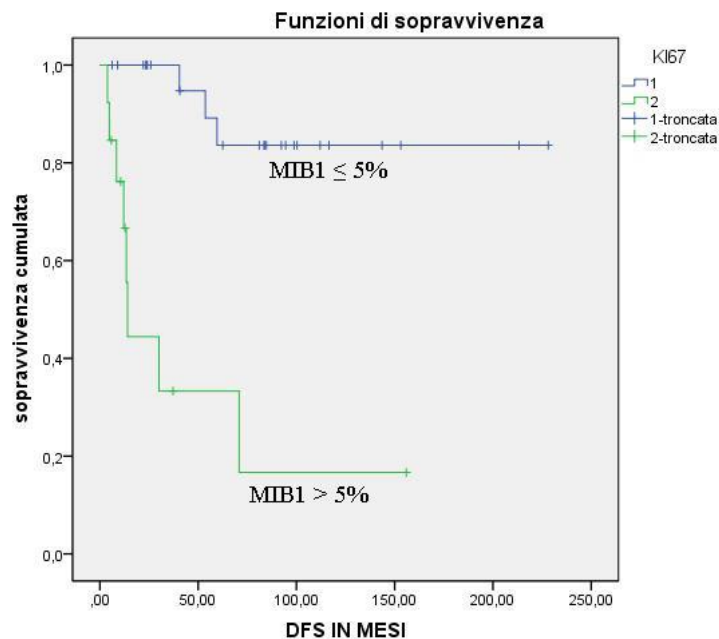


Figura 4.22 Curve di Kaplan-Meyer di DFS nei due sottogruppi di indice proliferativo MIB1 ($\leq 5\%$ vs $> 5\%$)

$p < 0.0001$

Con l'aggiornamento del follow up anche la presenza di sintomi alla diagnosi si associava con una ridotta DFS ($p=0.02$) (fig. 4.23), mentre la sede gastrica della neoplasia era correlata ad una migliore DFS ($p=0.002$) (fig. 4.24).

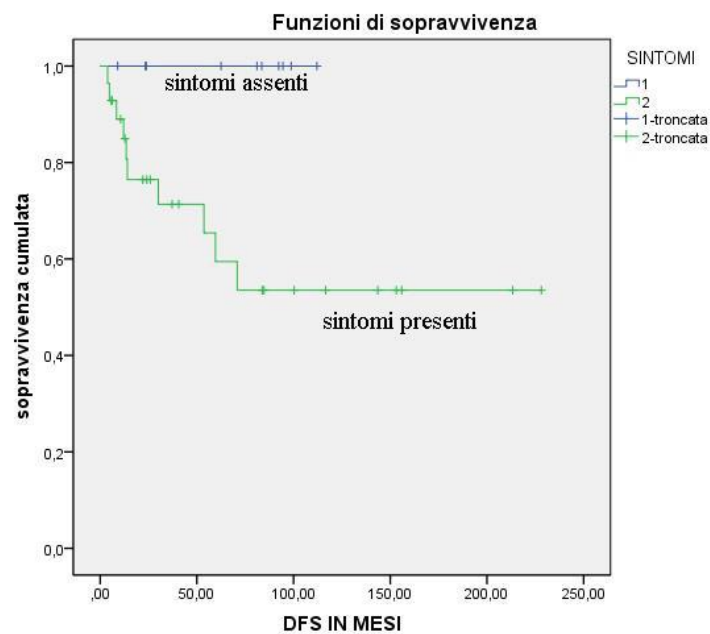


Figura 4.23 Curve di Kaplan-Meyer di DFS in relazione alla presenza di sintomi alla diagnosi

$p=0.02$

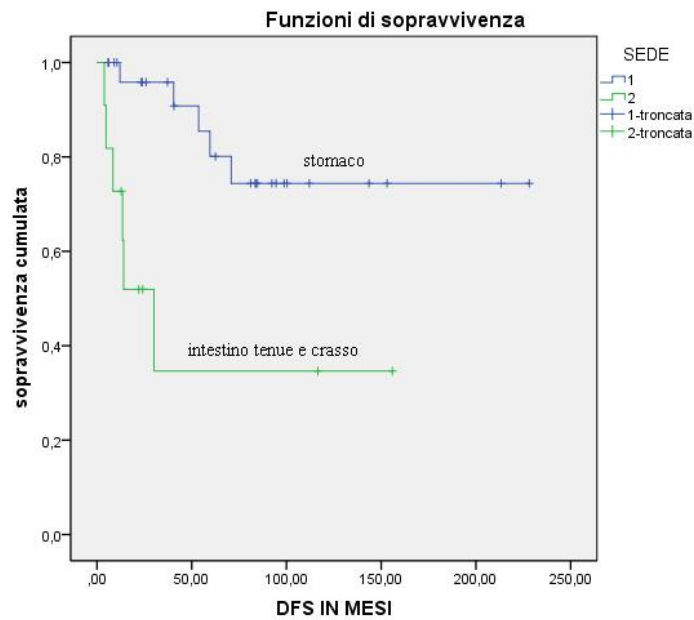


Figura 4.24 Curve di Kaplan-Meier di DFS in relazione alla sede tumorale
 $p=0.002$

Altre variabili, risultate statisticamente non significative per la DFS, sono state il sesso, l'età alla diagnosi, la modalità di diagnosi, le dimensioni tumorali, il tipo di intervento chirurgico, la presenza di complicanze post-operatorie, l'espressione immunoistochimica di CD117, di p130Cas, la sede delle mutazioni in KIT e la localizzazione e il tipo di mutazioni in PDGFRA. Si è osservato però un trend per quanto riguarda il tipo di mutazione in KIT: infatti, come precedentemente pubblicato, i tumori con delezioni e inserzioni mostravano una ridotta DFS rispetto a quelli con mutazioni puntiformi, delezioni insieme a mutazioni puntiformi e duplicazioni ($p=0.07$) (fig. 4.25).

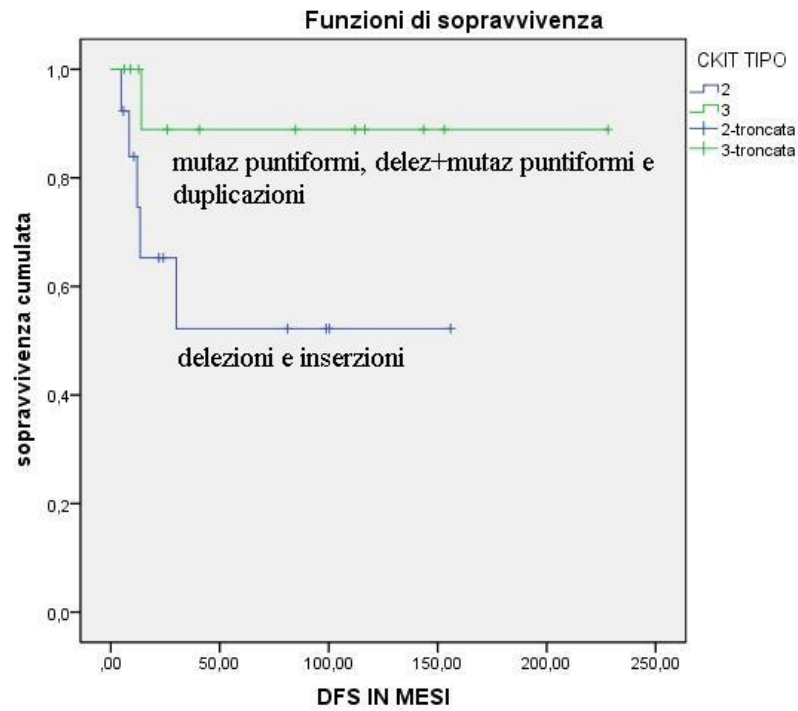


Figura 4.25 Curve di Kaplan-Meier di DFS in relazione al tipo di mutazione in KIT stratificato nei 2 sottogruppi (mutazioni puntiformi, delezioni + mutazioni puntiformi e duplicazioni vs delezioni e inserzioni)

$p=0.07$

Allo stesso modo pur non raggiungendo la significatività statistica è emerso come i casi intensamente positivi per p130Cas abbiano una DFS ridotta (fig. 4.26).

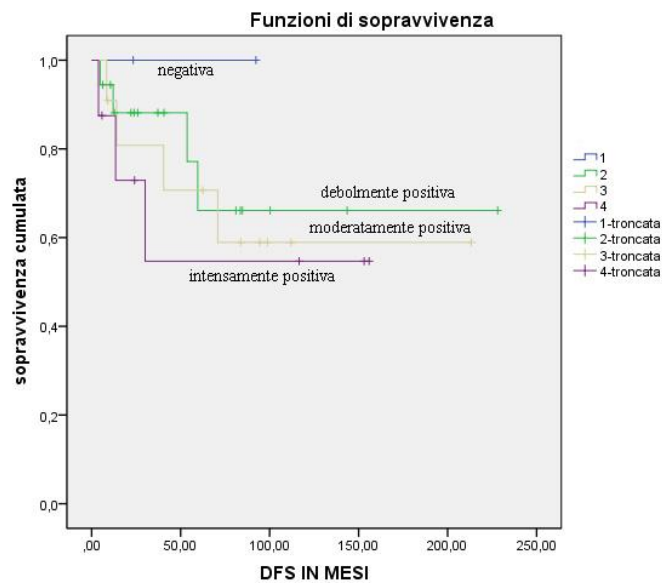


Figura 4.26 Curve di Kaplan-Meier di DFS in relazione all'espressione di p130Cas

$p=0.71$

h) ANALISI MULTIVARIATA DI DFS

Con regressione di Cox (analisi multivariata), l'unico fattore prognostico indipendente risultava essere la sede della neoplasia primitiva ($\chi^2 = 4.629$ $p=0.04$).

4.4 DISCUSSIONE

Questo lavoro si è prefisso di valutare il ruolo delle proteine Cav1 e p130Cas in una casistica di GIST.

I risultati dello studio hanno dimostrato come l'espressione tumorale di Cav1 nei GIST sia associata ad una prognosi favorevole in termini di sopravvivenza sia globale sia libera da malattia. La positività per tale proteina identifica un sottogruppo di tumori con comportamento biologico meno aggressivo caratterizzati da un ridotto numero di mitosi ed indice proliferativo e da categorie di rischio non alto secondo entrambe le classificazioni di Fletcher²⁶ e Miettinen³²⁹. Tale sottogruppo si associava e sovrapponeva con i casi PDGFRA mutati e con positività immunohistochimica per PDGFRA. Questi ultimi, come avevamo precedentemente dimostrato²⁵⁴, erano anche essi caratterizzati da una migliore DFS. Tale associazione con PDGFRA ha un substrato molecolare in quanto differenti studi hanno dimostrato che tale recettore inizia la trasduzione del segnale dalle caveolae^{319, 320, 1997}). Le caveolae costituiscono infatti la principale localizzazione dei PDGFR sulla superficie cellulare e al momento del legame del PDGF con il suo recettore molte proteine delle caveolae vengono fosforilate nei residui tirosinici. A sua volta PDGF stimola l'associazione della Cav1 con una fosfoproteina di 190kDa. Successivamente è stato dimostrato come le Cav1 e Cav3, ma non la Cav2, inibiscono l'autofosforilazione dei PDGFR con una modalità dose-dipendente³⁸⁸. La Cav1 è quindi un altro fattore di regolazione dell'attività chinasi del PDGFRA.

Da un punto di vista biologico si può ipotizzare che la Cav1, che caratteristicamente è particolarmente espressa in cellule di natura mesenchimale terminalmente differenziate come endotelio, adipociti e cellule muscolari riconosca, fra le cellule tumorali dei GIST, quelle che mantengono maggiormente un fenotipo differenziato in senso "mesenchimale", come d'altronde dimostrato dalla sua associazione con la presenza di una differenziazione in senso muscolare liscio/ mista muscolare liscio-neurale. Come già evidenziato in precedenza la Cav1 ha inoltre un ruolo fondamentale come modulatore maggiore del signalling nelle ICC, che sono le cellule da cui originano proprio i GIST. In considerazione di ciò l'espressione della Cav1 potrebbe rappresentare un dato di maggiore

legame e somiglianza con la componente cellulare originaria. L'osservazione in tre casi di una eterogeneità intratumorale dell'espressione della Cav1 rispetto a p130Cas, come a selezionare cloni differenti all'interno dello stesso tumore del singolo paziente, potrebbe analogamente riflettere la presenza di aree con maggiore differenziazione. La down-regolazione o perdita della Cav1 potrebbe contribuire o seguire alla trasformazione maligna e alla dedifferenziazione in modo simile a quanto dimostrato in altri sarcomi²⁵⁶.

Concludendo si può supporre che la Cav1 potrebbe avere quindi nei GIST un ruolo di soppressore tumorale.

L'intensa positività riscontrata per p130Cas nei GIST è un rilievo di un certo interesse osservato per la prima volta in una casistica di tali tumori e la frequenza di positività per tale proteina è superiore a quella per CD117 (95% circa vs 89,7%). La positività intensa è stata correlata significativamente con la categoria di rischio moderato-alto sec. Miettinen e con la presenza di sintomi alla diagnosi, contrariamente a quanto riscontrato per Cav1. Inoltre la descrizione di un incremento della positività nelle recidive di malattia potrebbe suggerire una selezione di cloni più aggressivi con iperespressione della proteina. Questi risultati, anche se preliminari e non correlati significativamente con altre caratteristiche clinico-patologiche dei tumori in esame, potrebbero essere suggestivi per una associazione di p130Cas con GIST dal comportamento biologico più maligno.

L'evidenza di una associazione tra l'espressione intensa di p130Cas e la presenza di mutazioni in KIT costituisce un altro elemento diametralmente opposto a quanto osservato con Cav1, come a ipotizzare che le due proteine identifichino sottogruppi biologicamente differenti all'interno dei GIST.

Nonostante i risultati in vitro abbiano suggerito un coinvolgimento di p130Cas nei meccanismi di tumorigenesi e resistenza, la valutazione della proteina sui campioni istologici non ha dimostrato un ruolo definito di p130Cas come fattore predittivo di risposta all'imatinib, ma tale dato potrebbe dipendere dal limitato numero di pazienti trattati e in particolare che hanno sviluppato resistenza secondaria. Sarebbe infatti auspicabile valutare l'espressione di p130Cas in una casistica più ampia di pazienti affetti da GIST e sottoposti a trattamento, suddivisi in tre categorie in base alla risposta terapeutica all'imatinib: pazienti che hanno risposto, pazienti con resistenza primaria e secondaria. Ulteriori esperimenti in

in vitro dovrebbero essere condotti per testare se le alterazioni dei livelli di p130Cas siano sufficienti per mediare la resistenza a imatinib. Le cellule GIST882 wt e sovra-esprimenti p130Cas e le cellule GIST430R wt e silenziate per p130Cas dovranno essere trattate con imatinib ed eseguiti esperimenti per valutare la sopravvivenza di queste cellule dopo la terapia.

L'aggiornamento del follow-up ha inoltre confermato i risultati precedentemente pubblicati nel 2011 relativi al ruolo prognostico dell'espressione immunoistochimica di PDGFRA, della sede tumorale, dell'indice proliferativo e mitotico e delle categorie di rischio sec. Fletcher²⁶ e Miettinen³²⁹ (in precedenza non considerate nella valutazione), migliorando per molte variabili la significatività statistica.

I risultati osservati in questo studio sia per Cav1 sia per p130Cas necessitano quindi di una validazione su una casistica più ampia e multicentrica. Sono inoltre necessari ulteriori studi per caratterizzare il meccanismo di down-regolazione di Cav1 nei GIST e per valutare l'effetto diretto dell'inibizione di p130Cas utilizzando xenograft derivati da campioni di GIST.

La re-espressione ectopica di Cav1 o l'introduzione di un "caveolin scaffolding domain" (CSD) potrebbero costituire nuove opzioni terapeutiche nei GIST. Infatti l'induzione dell'espressione di Cav1 ha ridotto con successo la crescita tumorale di cellule di carcinoma della mammella³¹⁶ e la capacità invasiva di cellule tumorali pancreatiche²⁹⁴ e della mammella³⁷².

E' stato infatti dimostrato come l'inoculazione di CSD peptidi fusi all'estremo C-terminale della sequenza di internalizzazione della *Drosophila antennapedia* (AP) in tumori murini impiantati in sede sottocutanea inibisca la progressione tumorale tramite la riduzione della permeabilità vascolare ed un effetto anti-angiogenico diretto²⁹².

Inoltre una migliore e più precisa conoscenza delle proteine e molecole di signalling che interagiscono con Cav1 potrebbe costituire la base per lo sviluppo di nuove terapie a bersaglio nei GIST.

Allo stesso modo p130Cas e i suoi effettori a valle potrebbero quindi essere studiati come nuovi bersagli terapeutici mirati.

PARTE V**5.1 RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI**

- 1) Golden T, Stout AP. Smooth muscle tumors of the gastrointestinal tract and retroperitoneal tissues. *Surg. Gynecol. Obstet.* 1941; 73: 784-810.
- 2) Welsh RA, Meyer AT. Ultrastructure of gastric leiomyoma. *Arch. Pathol.* 1969; 87: 71-81.
- 3) Franquemont DW. Differentiation and risk assessment of gastrointestinal stromal tumors. *Am. J. Clin. Pathol.* 1995; 103: 41-47.
- 4) Mazur MT, Clark HB. Gastric stromal tumors. Reappraisal of histogenesis. *Am. J. Surg. Pathol.* 1983; 7: 507-519.
- 5) Herrera GA, Pinto de Moraes H, Grizzle WE, Han SG. Malignant small bowel neoplasm of enteric plexus derivation (plexosarcoma). Light and electron microscopic study confirming the origin of the neoplasm. *Dig Dis Sci* 1984; 29: 275-284
- 6) Herrera GA, Cerezo L, Jones JE. Gastrointestinal autonomic nerve tumors. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1989; 113: 846-853.
- 7) Miettinen M, Virolainen M, Sarlomo-Rikala M. Gastrointestinal stromal tumors: value of CD34 antigen in their identification and separation from true leiomyomas and schwannomas. *Am J Surg Pathol* . 1995;19: 207-216
- 8) Majumder S, Brown K, Qiu FH. c-Kit protein, a transmembrane kinase: identification in tissue and characterization. *Mol Cell Biol* 1988; 8: 4896-4902
- 9) Dei Tos A. The reappraisal of gastrointestinal stromal tumors: from Stout to the KIT revolution. *Virchows Arch* 2003; 442: 421-428
- 10) Nakama A, Hirota S. Disturbed pyloric motility in Ws/Ws mutant rats due to deficiency of c-kit-expressing interstitial cell of Cajal. *Pathol Int* 1998; 48: 843-849
- 11) Hirota S, Isozaki K. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 1998;279: 577-580

- 12) Sircar K, Hewlett BR. Interstitial cells of Cajal as precursors of gastrointestinal stromal tumors. *Am J Surg Pathol* 1999;23: 377-389
- 13) Miettinen M, Monihan JM. GIST primary in the omentum and mesentery: clinico-pathologic and immunohistochemical study of 26 cases. *Am J Surg Pathol* 1999;23: 1109-18
- 14) Lee JR, Joshi V. Gastrointestinal autonomic nerve tumors: immunohistochemical and molecular identity with gastrointestinal stromal tumor. *Am J Surg Pathol* 2001;25: 979-987
- 15) Heinrich MC, Corless CL. PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* 2003;299: 708-10
- 16) Hirota S, Ohashi A. Gain-of-function mutations of PDGFRA gene in gastrointestinal stromal tumors. *Gastroenterology* 2003;125: 660-7
- 17) Hasegawa T, Matsuno Y. Gastrointestinal stromal tumor: consistent CD117 immunostaining for diagnosis, and prognostic classification based on tumor size and MIB-1 grade. *Hum Pathol* 2002;33: 669-676
- 18) Ihor P, Richard T. Gastrointestinal stromal tumors: current diagnosis, biologic behavior, and management. *Annals Surg Oncol* 2000;7: 705-712
- 19) Corless C, Fletcher J. Biology of gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* 2004;22: 3813-3825
- 20) Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors-definition, clinical, histological, immunohistochemical, and molecular genetic features and differential diagnosis. *Virchow Arch* 2001;438: 1-12
- 21) Min K-W. Small intestinal stromal tumors with skeinoid fibers. Clinicopathological, immunohistochemical, and ultrastructural investigations. *Am J Surg Pathol* 1992;16: 145-155
- 22) Miettinen M, Majidi M. Pathology and diagnostic criteria of gastrointestinal stromal tumors: a review. *Eur J Cancer* 2002;38 (suppl 5): S39-S51
- 23) Suster S, Fletcher CD. Gastrointestinal stromal tumors with prominent signet ring-cell features. *Mod Pathol* 1996;9: 609-613

- 24) Graadt van Roggen JF, Van Velthuysen MLF. The histopathological differential diagnosis of gastrointestinal stromal tumours. *J Clin Pathol* 2001;54: 96-102
- 25) Miettinen M, Sobin LH. 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
- 26) Fletcher CD, Berman JJ. Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: a consensus approach. *Hum Pathol* 2002;33: 459-465
- 27) Blay J-Y, Bonvalot S. Consensus meeting for the management of gastrointestinal stromal tumors. *Annals of Oncol* 2005;16: 566-578
- 28) van de Rijn M, Hendrickson MR. CD34 expression by gastrointestinal tract stromal tumors. *Hum Pathol* 1994;25: 766-771
- 29) Kindblom LG, Remotti HE. Gastrointestinal pacemaker cell tumor (GIPACT): gastrointestinal stromal tumors show phenotypic characteristics of the interstitial cells of Cajal. *Am J Pathol* 1998;152: 1259-1269
- 30) Mikhael AI, Bacchi CE. CD34 expression in stromal tumors of the gastrointestinal tract. *Appl Immuno-histochem* 1994;2: 89-93
- 31) Sarlomo-Rikala M, Kovatich AJ. CD117: a sensitive marker for gastrointestinal stromal tumors that is more specific than CD34. *Mod Pathol* 1998;11: 728-734
- 32) Medeiros F, Corless CL. KIT-negative gastrointestinal stromal tumors: proof of concept and therapeutic implications. *Am J Surg Pathol* 2004;28: 889-894
- 33) Debiec-Rychter M, Wasag B. Gastrointestinal stromal tumors (GISTs) negative for KIT (CD117 antigen) immunoreactivity. *J Pathol* 2004;202: 430-438
- 34) West RB, Corless CL. The novel marker, DOG1, is expressed ubiquitously in gastrointestinal stromal tumors irrespective of KIT or PDGFRA mutation status. *Am J Pathol* 2004;165: 107-113
- 35) Nielsen TO, West RB. Molecular characterisation of soft tissue tumours: a gene expression study. *Lancet* 2002;359: 1301-1307

- 36) Allander SV, Nupponen NN. Gastrointestinal stromal tumors with KIT mutations exhibit a remarkably homogeneous gene expression profile. *Cancer Res* 2001;61: 8624-8628
- 37) Rubin BP. Gastrointestinal stromal tumours: an update. *Histopathology* 2006; 48: 83-96.
- 38) Blay P, Astudillo A. Protein kinase C theta is highly expressed in gastrointestinal stromal tumors but not in other mesenchymal neoplasias. *Clin Cancer Res* 2004;10: 4089-4095
- 39) Reith JD, Goldblum JR. Extragastrintestinal (soft tissue) stromal tumors: an analysis of 48 cases with emphasis on histologic predictors of outcome. *Mod Pathol* 2000;13: 577-585
- 40) Blume-Jensen P, Wernstedt C. Identification of the major phosphorylation sites for protein kinase C in kit-stem cell factor receptor in vitro and in intact cells. *J Biol Chem* 1995;270: 14192-14200
- 41) Atsushi M, Shinji S. PKC theta, a novel immunohistochemical marker for gastrointestinal stromal tumors (GIST), especially useful for identifying KIT-negative tumors. *Pathol International* 2005;55: 106-112
- 42) Miettinen M, Sobin LH. Immunohistochemical spectrum of GISTs at different sites and their differential diagnosis with a reference to CD117 (KIT). *Mod Pathol* 2000;13: 1134-1142
- 43) Miettinen M, Sarlomo-Rikala M. Calponin and h-caldesmon in soft tissue tumors: consistent h-caldesmon immunoreactivity in gastrointestinal stromal tumors indicate traits of smooth muscle differentiation. *Mod Pathol* 1999;12: 756-762
- 44) Ueyama T, Guo K-J. A clinicopathologic and immunohistochemical study of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer* 1992;69: 947-955
- 45) Miettinen M, Sarlomo-Rikala M. Esophageal stromal tumors: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 17 cases and comparison with esophageal leiomyomas and leiomyosarcomas. *Am J Surg Pathol* 2000;24: 211-222
- 46) Arber DA, Tamayo R. Paraffin section detection of the c-kit gene product (CD117) in human tissues: value in the diagnosis of mast cell disorders. *Hum Pathol* 1998;29: 498-504

- 47) Montone KT, van Belle P. Proto-oncogene c-kit expression in malignant melanoma: protein loss with tumor progression. *Mod Pathol* 1997;10: 939-944
- 48) Tsuura Y, Hiraki H. Preferential localization of c-kit product in tissue mast cells, basal cells of skin, epithelial cells of breast, small cell lung carcinoma, and seminoma/disgerminoma in human: immunohistochemical study of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Virchow Arch* 1994;424: 135-141
- 49) Miettinen M, Sarlomo-Rikala M. Mesenchymal tumors of muscularis mucosae of colon and rectum are benign leiomyomas that should be separated from gastrointestinal stromal tumors – a clinicopathologic and immunohistochemical study of eighty-eight cases. *Mod Pathol* 2001;14: 950-956
- 50) Miettinen M, Sarlomo-Rikala M. Gastrointestinal stromal tumors and leiomyosarcomas in the colon: a clinicopathologic, immunohistochemical and molecular genetic study of 44 cases. *Am J Surg Pathol* 2000;24: 1339-1352
- 51) Miettinen M, Furlong M. Gastrointestinal stromal tumors, intramural leiomyomas, and leiomyosarcomas in the rectum and anus. A clinicopathologic, immunohistochemical and molecular genetic study of 144 cases. *Am J Surg Pathol* 2001;25: 1121-1133
- 52) Appelman HD, Helwig EB. Glomus tumors of the stomach. *Cancer* 1969;23: 203-213
- 53) Daimaru Y, Kido H. Benign schwannoma of the gastrointestinal tract : a clinicopathologic and immunohistochemical study. *Hum Pathol* 1988;19: 257-264
- 54) Miettinen M, Shekitka KM. Schwannomas in the colon and rectum: a clinico-pathologic and immunohistochemical study of 20 cases. *Am J Surg Pathol* 2001;25: 846-855
- 55) van de Rijn M, Hendrickson MR. An immunohistochemical study of inflammatory fibroid polyps of the gastrointestinal tract. *Appl Immunohistochem* 1994;2: 54-59
- 56) Hasegawa T, Yang P. CD34 expression by inflammatory fibroid polyps of the stomach. *Mod Pathol* 1997;10: 451-456

- 57) Coffin CM, Dehner LP. Inflammatory myofibroblastic tumor, inflammatory fibrosarcoma, and related lesions: an historical review with differential diagnostic considerations. *Semin Diagn Pathol* 1998;15: 102-110
- 58) Henricks W, Chu YC. Dedifferentiated liposarcoma. A clinicopathological analysis of 155 cases with a proposal for an expanded definition of dedifferentiation. *Am J Surg Pathol* 1997;21: 271-281
- 59) Boyce GA, Sivak MV. Evaluation of submucosal upper gastrointestinal tract lesions by endoscopic ultrasound. *Gastroint Endosc* 1991;37: 449-454
- 60) Ludwig DJ, Traverso LW. Gut stromal tumors and their clinical behavior. *Am J Surg* 1997;173: 390-394
- 61) DeMatteo RP, Lewis JJ. Two hundred gastrointestinal stromal tumors. Recurrence patterns and prognostic factors for survival. *Ann Surg* 2000;136: 383-389
- 62) van der Zwan SM, DeMatteo RP. Gastrointestinal stromal tumor: 5 years later. *Cancer* 2005;104: 1781-1788
- 63) Yasuda K, Cho E. Diagnosis of submucosal lesions of the upper gastrointestinal tract by endoscopic ultrasonography. *Gastroint Endosc* 1990;36: S17-20
- 64) Nickl NJ. Gastrointestinal stromal tumors: new progress, new questions. *Current Opinion in Gastroenterology* 2004;20: 482-487
- 65) Nickl NJ, Gress F. Hypoechoic intramural tumor study: final report. *Gastrointest Endosc* 2002;55: AB98
- 66) Ando N, Goto H. The diagnosis of GI stromal tumors with EUS-guided fine needle aspiration and immunohistochemical analysis. *Gastrointest Endosc* 2002;55: 37-43
- 67) Davila RE, Faigel DO. GI stromal tumors. *Gastrointest Endosc* 2003;58: 80-88
- 68) Chan JKC. Mesenchymal tumors of the gastrointestinal tract: a paradise for acronyms (STUMP, GIST, GANT, and now GIPACT). Implications of c-kit in genesis, and yet another of many emerging roles of the interstitial cell of Cajal in the pathogenesis of gastrointestinal disease. *Adv Anat Pathol* 1996;6: 19-40

- 69) Miettinen M, Kopczynski J. Gastrointestinal stromal tumors, intramural leiomyomas, and leiomyosarcomas in the duodenum: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 167 cases. *Am J Surg Pathol* 2003;27: 625-641
- 70) Yantiss RK, Spiro IJ. Gastrointestinal stromal tumor versus intra-abdominal fibromatosis of the bowel wall: a clinically important differential diagnosis. *Am J Surg Pathol* 2000;24: 947-957
- 71) Connolly EM, Gaffney E. Gastrointestinal stromal tumours. *British J Surg* 2003;90: 1178-1186
- 72) Kindblom LG, Meis-Kindblom JM. Incidence, prevalence, phenotype and biologic spectrum of gastrointestinal stromal cell tumors (GIST): a population-based study of 600 cases. *Ann Oncol* 2003;13: 157
- 73) Miettinen M, Sarlomo-Rikala M. Gastrointestinal stromal tumors: recent advances in understanding of their biology. *Hum Pathol* 1999;30: 1213-1220
- 74) Clary BM, DeMatteo RP. Gastrointestinal stromal tumors and leiomyosarcoma of the abdomen and retroperitoneum: a clinical comparison. *Ann Surg Oncol* 2001;8: 290-299
- 75) Bucher P, Villiger P. Management of gastrointestinal stromal tumours: from diagnosis to treatment. *Swiss Med WKLY* 2004;134: 145-153
- 76) Nilsson B, Bummig P. 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: 821-829
- 77) Thomas RM, Sobin LH. Gastrointestinal cancer. *Cancer* 1995;75: 154-170
- 78) Tran T, Davila A. The epidemiology of malignant gastrointestinal stromal tumors: an analysis of 1458 cases from 1992 to 2000. *Am J Gastroenterol* 2005;100: 162-168
- 79) Goettsch WG, Bos SD. Incidence of gastrointestinal stromal tumours is underestimated: result of a nation-wide study. *Eur J Cancer* 2005;41: 2868-2872

- 80) Lasota J, Carlson JA. Spindle cell tumor of urinary bladder sierosa with phenotypic and genotypic features of gastrointestinal stromal tumor. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124: 894-897
- 81) Ortiz-Hidalgo C, de Leon Bojorge B. Stromal tumor of the gallbladder with phenotype of interstitial cells of Cajal. A previously unrecognized neoplasm. *Am J Surg Pathol* 2000;24: 1420-1423
- 82) Goldblum JR, Appelman HD. Stromal tumors of the duodenum: a histologic and immunohistochemical study of 20 cases. *Am J Surg Pathol* 1995;19: 71-80
- 83) Tworek JA, Appelman HD. Stromal tumors of the jejunum and ileum. *Mod Pathol* 1997;10: 200-209
- 84) Tworek JA, Goldblum JR. Stromal tumors of the abdominal colon: a clinicopathologic study of 20 cases. *Am J Surg Pathol* 1999;23: 937-945
- 85) Tworek JA, Goldblum JR. Stromal tumors of the anorectum: a clinicopathologic study of 22 cases. *Am J Surg Pathol* 1999;23: 946-954
- 86) Daum O, Klecka J. Gastrointestinal stromal tumor of the pancreas: case report with documentation of KIT gene mutation. *Virchows Arch* 2005;446: 470-472
- 87) Miettinen M, Sobin LH. Gastrointestinal stromal tumors in the appendix: a clinicopathologic and immunohistochemical study of four cases. *Am J Surg Pathol* 2001;25: 1433-1437
- 88) Agaimy A, Wunsch 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;391: 322-329
- 89) Emory TS, Sobin LH. Prognosis of gastrointestinal smooth muscle (stromal) tumors: dependence on anatomic site. *Am J Surg Pathol* 1999;23: 82-87
- 90) Pidhorecky I, Cheney RT. Gastrointestinal stromal tumors: current diagnosis, biologic behavior, and management. *Ann Surg Oncol* 2000;7: 705-712

- 91) Berman J, O'Leary TJ. Gastrointestinal stromal tumor workshop. *Hum Pathol* 2001;32: 578-582
- 92) Miettinen M, Sarlomo-Rikala M. Gastrointestinal stromal tumours. *Ann Chir Gynaecol* 1998;87: 278-281
- 93) van Gelder T, Vuzevski VD. EBV in smooth-muscle tumors. *N Engl J Med* 1995;332: 1719
- 94) Liebowitz D. Epstein-Barr virus an old dog with new tricks. *N Engl J Med* 1995;332: 55-57
- 95) Nishida T, Hirota S. Familial gastrointestinal stromal tumours with germline mutation of the KIT gene. *Nat Genet* 1998;19: 323-324
- 96) Hirota S, Nishida T. Familial gastrointestinal stromal tumors associated with dysphagia and novel type germline mutation of KIT gene. *Gastroenterology* 2002;122: 1493-1499
- 97) Li FP, Fletcher JA. Familial gastrointestinal stromal tumor syndrome: phenotypic and molecular features in a kindred. *J Clin Oncol* 2005;23: 2735-2743
- 98) Maeyama H, Hidaka E. Familial gastrointestinal stromal tumor with hyperpigmentation: association with a germline mutation of the c-kit gene. *Gastroenterology* 2001;120: 210-215
- 99) Beghini A, Tibiletti MG. Germline mutation in the juxtamembrane domain of the kit gene in a family with gastrointestinal stromal tumors and urticaria pigmentosa. *Cancer* 2001;92: 657-662
- 100) Isozaki K, Terris B. Germline-activating mutation in the kinase domain of KIT gene in familial gastrointestinal stromal tumors. *Am J Pathol* 2000;157: 1581-1585
- 101) Handra-Luca A, Flejou JF. Familial multiple gastrointestinal stromal tumours with associated abnormalities of the myenteric plexus layer and skeinoid fibres. *Histopathology* 2001;39: 359-363
- 102) Chompret A, Kannengiesser C. PDGFRA germline mutation in a family with multiple cases of gastrointestinal stromal tumor. *Gastroenterology* 2004;126: 318-321

- 103) Sommer G, Agosti V. Gastrointestinal stromal tumors in a mouse model by targeted mutation of the kit receptor tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100: 6706-6711
- 104) Chen H, Hirota S. Polyclonal nature of diffuse proliferation of interstitial cells of Cajal in patients with familial and multiple gastrointestinal stromal tumours. *Gut* 2002;51: 793-796
- 105) Carney JA, Sheps SG. The triad of gastric leiomyosarcoma, functioning extra-adrenal paraganglioma, and pulmonary chondroma. *N Engl J Med* 1977;296: 1517-1518
- 106) Carney JA. The triad of gastric epithelioid leiomyosarcoma, functioning extra-adrenal paraganglioma, and pulmonary chondroma. *Cancer* 1979;43: 374-382
- 107) Carney JA. Gastric stromal sarcoma, pulmonary chondroma, and extra-adrenal paraganglioma (Carney Triad): natural history, adrenocortical component, and possible familial occurrence. *Mayo Clin Proc* 1999;74: 543-552
- 108) Prakash S, Sarran L. Gastrointestinal stromal tumors in children and young adults: a clinicopathologic, molecular, and genomic study of 15 cases and review of the literature. *J Pediatr Hematol Oncol* 2005;27: 179-187
- 109) Diment J, Tamborini E. Carney triad: case report and molecular analysis of gastric tumor. *Hum Pathol* 2005;36: 112-116
- 110) Carney J, Stratakis CA. Familial paraganglioma and gastric stromal sarcoma: a new syndrome distinct from the Carney triad. *Am J Med Genet* 2002;108: 132-139
- 111) Zoller ME, Rembeck B. Malignant and benign tumors in patients with neurofibromatosis type I in a defined Swedish population. *Cancer* 1997;79: 2125-2131
- 112) Takazawa Y, Sakurai S. Gastrointestinal stromal tumors of neurofibromatosis type I (von Recklinghausen's disease). *Am J Surg Pathol* 2005;29: 755-763
- 113) Yantiss RK, Rosenberg AE. Multiple gastrointestinal stromal tumors in type I neurofibromatosis: a pathologic and molecular study. *Mod Pathol* 2005;18: 475-484

- 114) Kinoshita K, Hirota S. Absence of c-kit gene mutations in gastrointestinal stromal tumours from neurofibromatosis type 1 patients. *J Pathol* 2004;202: 80-85
- 115) Neurofibromatosis. Conference statement. National Institutes of Health Consensus Development Conference. *Arch Neurol* 1988;45: 575-578
- 116) Feldkamp MM, Gutmann DH. Neurofibromatosis type 1: piecing the puzzle together. *Can J Neurol Sci* 1998;25: 181-191
- 117) Xu GF, O'Connell P. The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP. *Cell* 1990;62: 599-608
- 118) Fuller CE, Williams GT. Gastrointestinal manifestations of type 1 neurofibromatosis. *Histopathology* 1991;19: 1-11
- 119) Giuly JA, Picand R. Von Recklinghausen disease and gastrointestinal stromal tumors. *Am J Surg* 2003;185: 86-87
- 120) Ghrist TD. Gastrointestinal involvement in neurofibromatosis. *Arch Intern Med* 1963;112: 357-362
- 121) Miettinen M, Fetsch JF. Gastrointestinal stromal tumors in patients with neurofibromatosis type 1. A clinicopathologic and molecular genetic study of 45 cases. *Am J Surg Pathol* 2006;30: 90-96
- 122) Bummig P, Nilsson B. Use of 2-tracer PET to diagnose gastrointestinal stromal tumour and pheochromocytoma in patients with Carney triad and neurofibromatosis type 1. *Scandin J Gastroenterol* 2006;41: 626-630
- 123) Chabot B, Stephenson DA. The proto-oncogene c-kit encoding a trans-membrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus. *Nature* 1988;335: 88-89
- 124) Yarden Y, Kuang W. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J* 1991;6: 3341-3351
- 125) Rosnet O, Marchetto S. Murine Flt3, a gene encoding a novel tyrosine kinase receptor of the PDGFR/CSF1R family. *Oncogene* 1991;6: 1641-1650

- 126) Russell ES. Hereditary anemias of the mouse: a review for geneticists. *Adv Genet* 1979;20: 357-459
- 127) Besmer P, Murphy JE. A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene v-kit with the protein kinase gene family. *Nature* 1986;320: 415-421
- 128) Furitsu T, Tsujimura T. Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. *J Clin Invest* 1993;92: 1736-1744
- 129) Kitamura Y, Hirota S. Kit as a human oncogenic tyrosina kinase. *Cell Mol Life Sci* 2004;61: 2924-2931
- 130) Witte ON. Steel locus defines new multipotent growth factor. *Cell* 1990;63: 5-6
- 131) Weiler SR, Mou S. JAK2 is associated with the c-kit proto-oncogene product and is phosphorylated in response to stem cell factor. *Blood* 1996;87: 3688-3693
- 132) Linnekin D, DeBerry C. Lyn associates with the juxtamembrane region of c-kit and is activated by stem cell factor in hematopoietic cell lines and normal progenitor cells. *J Biol Chem* 1997;272: 27450-27455
- 133) Hibi K, Takahashi T. Coexpression of stem cell factor and the c-kit genes in small-cell lung cancer. *Oncogene* 1991;6: 2291-2296
- 134) Geissler EN, Ryan MA. The dominant-white spotting (W) locus of the mouse encodes the c-kit proto-oncogene. *Cell* 1988;55: 185-192
- 135) Bellone G, Silvestri S. Growth stimulation of colorectal cancer carcinoma cells via the c-kit receptor is inhibited by TGF-beta1. *J Cell Physiol* 1997;172: 1-11
- 136) Tsuura Y, Suzuki T. Expression of c-kit protein in proliferative lesions of human breast: sexual difference and close association with phosphotyrosine status. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002;128: 239-246
- 137) Ronnstrand L. Signal transduction via the stem cell factor receptor/c-Kit. *Cell Mol Life Sci* 2004;61: 2535-2548

- 138) Jones AV, Cross NCP. Oncogenic derivatives of platelet-derived growth factor receptors. *Cell Mol Life Sci* 2004;61: 2912-2923
- 139) Claesson-Welsh L. Platelet-derived growth factor receptor signals. *J Biol Chem* 1994;269: 32023-32026
- 140) Mariani S, Basciani S. PDGF and the testis. *Trends Endocrinol Metab* 2002;13: 11-17
- 141) Heuchel R, Berg A. Platelet-derived growth factor beta receptor regulates interstitial fluid homeostasis through phosphatidylinositol-3' kinase signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96: 11410-11415
- 142) Sirvent N, Maire G. Genetics of dermatofibrosarcoma protuberans family of tumors: from ring chromosome to tyrosine kinase inhibitor treatment. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;37: 1-19
- 143) Corless CL, McGreevey L. KIT mutations are common in incidental gastrointestinal stromal tumors one centimeter or less in size. *Am J Pathol* 2002;160: 1567-1572
- 144) Heinrich MC, Corless CL. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* 2003;21: 4342-4349
- 145) Heinrich MC, Rubin BP. Biology and genetic aspects of gastrointestinal stromal tumors: KIT activation and cytogenetic alterations. *Hum Pathol* 2002;33: 484-495
- 146) Rubin BP, Singer S. KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 2001;61: 8118-8121
- 147) Lux ML, Rubin BP. KIT extracellular and kinase domain mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Am J Pathol* 2000;156: 791-795
- 148) Antonescu CR, Sommer G. Association of KIT exon 9 mutations with nongastric primary site and aggressive behavior: KIT mutation analysis and clinical correlates of 120 gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 2003;9: 3329-3337
- 149) Hirota S, Nishida T. Gain-of-function mutation at the extracellular domain of KIT in gastrointestinal stromal tumours. *J Pathol* 2001;193: 505-510

- 150) Lasota J, Wozniak A. Mutations in exon 9 and 13 of KIT gene are rare events in gastrointestinal stromal tumors. A study of 200 cases. *Am J Pathol* 2000;157: 1091-1095
- 151) Kinoshita K, Isozaki K. c-kit gene mutation at exon 17 or 13 is very rare in sporadic gastrointestinal stromal tumors. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18: 147-151
- 152) Corless CL, Schroeder A. PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors: frequency, spectrum and in vitro sensitivity to imatinib. *J Clin Oncol* 2005;23: 5357-5364
- 153) Subramanian S, West RB. Gastrointestinal stromal tumors (GISTs) with KIT and PDGFRA mutations have distinct gene expression profiles. *Oncogene* 2004;23: 7780-7790
- 154) Antonescu CR, Viale A. Gene expression in gastrointestinal stromal tumors is distinguished by KIT genotype and anatomic site. *Clin Cancer Res* 2004;10: 3282-3290
- 155) Kitayama H, Kanakura Y. Constitutively activating mutations of c-kit receptor tyrosine kinase confer factor-independent growth and tumorigenicity of factor-dependent hemopoietic cell lines. *Blood* 1995;85: 790-798
- 156) Chan PM, Ilangumaran S. Autoinhibition of the kit receptor tyrosine kinase by the cytosolic juxtamembrane region. *Mol Cell Biol* 2003;23: 3067-3078
- 157) Singer S, Rubin BP. Prognostic value of KIT mutation type, mitotic activity, and histologic subtype in gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* 2002;20: 3898-3905
- 158) Taniguchi M, Nishida T. Effect of c-kit mutation on prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 1999;59: 4297-4300
- 159) Lasota J, Jasinski M. Mutations in exon 11 of c-kit occur preferentially in malignant versus benign gastrointestinal stromal tumors and do not occur in leiomyomas or leiomyosarcomas. *Am J Pathol* 1999;154: 53-60
- 160) Wardelmann E, Neidt I. C-kit mutations in gastrointestinal stromal tumors occur preferentially in the spindle rather than in the epithelioid cell variant. *Mod Pathol* 2002;15: 125-136

- 161) Wardelmann E, Losen I. Deletion of Trp-557 and Lys-558 in the juxtamembrane domain of the c-kit protooncogene is associated with metastatic behavior of gastrointestinal stromal tumors. *Int J Cancer* 2003;106: 887-895
- 162) Martin J, Poveda A. Deletions affecting codons 557-558 of the C-KIT gene indicate a poor prognosis in patients with completely resected gastrointestinal stromal tumors: a study by the Spanish Group for Sarcoma Research (GEIS). *J Clin Oncol* 2005;23: 6190-6198
- 163) Ma Y, Cunningham ME. Inhibition of spontaneous receptor phosphorylation by residues in a putative alpha-helix in the KIT intracellular juxtamembrane region. *J Biol Chem* 1999;19: 13399-13402
- 164) Sakurai S, Oguni S. Mutations in c-kit exons 9 and 13 in gastrointestinal stromal tumors among Japanese. *J Cancer Res* 2001;92: 494-498
- 165) Andersson J, Sjogren H. The complexity of KIT gene mutations and chromosome rearrangements and their clinical correlation in gastrointestinal stromal (pacemaker cell) tumor. *Am J Pathol* 2002;160: 15-22
- 166) Vu H, Xinh P. A recurrent duodenal gastrointestinal stromal tumor with a frameshift mutation resulting in a stop codon in KIT exon13. *Genes, Chromos & Cancer* 2005;42:179-183
- 167) Penzel R, Aulmann S. The location of KIT and PDGFRA gene mutations in gastrointestinal stromal tumours is site and phenotype associated. *J Clin Pathol* 2005;58: 634-639
- 168) Miettinen M, El-Rifai W. Evaluation of malignancy and prognosis of gastrointestinal stromal tumors: a review. *Hum Pathol* 2002;33: 478-483
- 169) Kim TW, Lee H. Prognostic significance of c-kit mutation in localized gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 2004;10: 3076-3081
- 170) Liu XH, Bai CG. Prognostic value of KIT mutation in gastrointestinal stromal tumors. *World J Gastroenterol* 2005;11: 3948-3952

- 171) Lasota J, Stachura J. GISTs with PDGFRA exon 14 mutations represent subset of clinically favorable gastric tumor with epithelioid morphology. *Laboratory Investigation* 2006;86: 94-100
- 172) Lasota J, Sobin L. A great majority of GISTs with PDGFRA mutations represent gastric tumors of low or no malignant potential.
- 173) Bergmann F, Gunawan B. Cytogenetic and morphologic characteristics of gastrointestinal stromal tumors. Recurrent rearrangement of chromosome 1 and losses of chromosome 14 and 22 as common anomalies. *Verh Dtsch Ges Pathol* 1998;82: 275-278
- 174) Kim NG, Kim JJ. Putative chromosomal deletions on 9p, 9q and 22q occur preferentially in malignant gastrointestinal stromal tumors. *Int J Cancer* 2000;85: 633-638
- 175) Ricci R, Arena V. Role of p16/INK4a in gastrointestinal stromal tumor progression. *Am J Clin Pathol* 2004;122: 35-43
- 176) Sabah M, Cummins R. Loss of heterozygosity of chromosome 9p and loss of p16INK4a expression are associated with malignant gastrointestinal stromal tumors. *Mod Pathol* 2004;17: 1364-1371
- 177) El-Rifai W, Sarlomo-Rikala M. DNA sequence copy number changes in gastrointestinal stromal tumors: tumor progression and prognostic significance. *Cancer Res* 2000;60: 3899-3903
- 178) Schneider-Stock R, Boltze C. Loss of p16 protein defines high-risk patients with gastrointestinal stromal tumors: a tissue microarray study. *Clin Cancer Res* 2005;11: 638-645
- 179) DeMatteo RP, Heinrich MC. Clinical management of gastrointestinal stromal tumors before and after STI-571. *Hum Pathol* 2002;33: 466-477
- 180) Dagher R, Cohen M. Report from the FDA. Approval summary: imatinib mesylate in the treatment of metastatic and/or unresectable malignant gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 2002;8: 3034-3038
- 181) Yao KA, Talamonti MS. Primary gastrointestinal sarcomas: analysis of prognostic factors and results of surgical management. *Surgery* 2000;128: 604-612

- 182) Langer C, Gunawan B. Prognostic factor influencing surgical management and outcome of gastrointestinal stromal tumours. *Br J Surg* 2003;90: 332-339
- 183) Matthews BD, Walsh RM. Laparoscopic vs open resection of gastric stromal tumors. *Surg Endosc* 2002;16: 403-407
- 184) Bedard ELR, Mamazza J. Laparoscopic resection of gastrointestinal stromal tumors. *Surg Endosc* 2006;20: 500-503
- 185) Lai IR, Lee WJ. Minimally invasive surgery for gastric stromal cell tumors: intermediate follow-up results. *J Gastroint Surg* 2006;10: 563-566
- 186) Novitsky YW, Kercher KW. Long-term outcomes of laparoscopic resection of gastrointestinal stromal tumors. *Annals of Surgery* 2006;243: 738- 747
- 187) Raut C, Posner M. Surgical management of advanced gastrointestinal stromal tumors after treatment with targeted systemic therapy using kinase inhibitors. *J Clin Oncol* 2006;24: 2325-2331
- 188) Heinrich M, Corless C. Gastric GI stromal tumors: the role of surgery in the era of targeted therapy. *J Surg Oncol* 2005;90: 195-207
- 189) Demetri GD, Benjamin RS. NCCN Task force report: optimal management of patients with gastrointestinal stromal tumor. *J Natl Comp Cancer Network* 2004;2: S1-S26
- 190) Buchdunger E, Cioffi CL. Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;295: 139-145
- 191) Heinrich MC, Griffith DJ. Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI571, a selective tyrosine kinase inhibitor. *Blood* 2000;96: 925-932
- 192) Tuveson DA, Willis NA. STI571 inactivation of the gastrointestinal stromal tumor c-kit oncoprotein: biological and clinical implications. *Oncogene* 2001;20:5054-5058
- 193) Joensuu H, Roberts PJ. Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor. *N Engl J Med* 2001;344: 1052-1056

- 194) van Oosterom AT, Judson I. Safety and efficacy of imatinib (STI571) in metastatic gastrointestinal stromal tumours: a phase I study. *Lancet* 2001;358: 1421-1423
- 195) Demetri GD, von Mehren M. Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med* 2002;347: 472-480
- 196) Doi T, Nihida T. Phase II clinical study of STI571 in Japanese patients with malignant gastrointestinal stromal tumors: results of the B 1201 study. *J Clin Oncol* 2004;22: 4078
- 197) Rankin C, von Mehren M. Dose effect of imatinib in patients with metastatic GIST – Phase III Sarcoma Group Study S0033. *J Clin Oncol* 2004;22: 9005
- 198) Verweij J, Casali P. Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumours with high-dose imatinib: randomised trial. *Lancet* 2004;364: 1127-1134
- 199) Ray-Coquard I, Perol D. Prognostic factors for progression free and overall survival in advanced GIST: result from the BRF14 phase III trial of the French Sarcoma Group. *J Clin Oncol* 2005;23: 9035
- 200) Demetri GD, Desai J. SU11248, a multi-targeted tyrosine kinase inhibitor, can overcome imatinib resistance caused by diverse genomic mechanisms in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* 2004;22: 3001
- 201) Maki RG, Fletcher JA. Results from a continuation trial of SU11248 in patients with imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* 2005;23: 9011
- 202) Demetri GD, van Oosterom A. Improved survival and sustained clinical benefit with SU11248 in patients with GIST after failure of imatinib mesylate therapy in a phase III trial. *Gastroint Cancers Symposium* 2006; Abstract n. 8
- 203) Casali PG, Garret CR. Updated results from a phase III trial of sunitinib in GIST patients for whom imatinib therapy has failed due to resistance or intolerance. *J Clin Oncol* 2006;24: 9513

- 204) Antonescu CR, Besmer P. Acquired resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumor occurs through secondary gene mutation. *Clin Cancer Res* 2005;11: 4182-4190
- 205) Chen LL, Trent JC. A missense mutation in KIT kinase domain 1 correlates with imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 2004;64: 5913-5919
- 206) Fletcher JA, Corless CL. Mechanism of resistance to imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2003;22: 815
- 207) Debiec-Rychter M, Cools J. Mechanism of resistance to imatinib mesylate in gastrointestinal stromal tumors and activity of the PKC412 inhibitor against imatinib-resistant mutants. *Gastroenterol* 2005;128: 270-279
- 208) Vanel D, Albiter M. Role of computed tomography in the follow-up of hepatic and peritoneal metastases of GIST under imatinib mesylate treatment: a prospective study of 54 patients. *Eur J Radiol* 2005;54: 118-123
- 209) Prenen H, Cools J. Efficacy of the kinase inhibitor SU11248 against gastrointestinal stromal tumor mutants refractory to imatinib mesylate. *Clin Cancer Res* 2006;12: 2622-2627
- 210) Akwari OE, Dozois RR. Leiomyosarcoma of the small and large bowel. *Cancer* 1978;42: 1375-1384
- 211) Shiu et al. Myosarcomas of the stomach: natural history, prognostic factors and management. *Cancer* 1982;49: 177-187
- 212) McGrath PC, Neifeld JP. Gastrointestinal sarcomas. Analysis of prognostic factors. *Ann Surg* 1987;206: 706-710
- 213) Ng EH, Pollock RE. Prognostic factors influencing survival in gastrointestinal leiomyosarcomas. Implications for surgical management and staging. *Ann Surg* 1992;215: 68-77
- 214) Crosby JA, Catton CN. Malignant gastrointestinal stromal tumors of the small intestine: a review of 50 cases from a prospective database. *Ann Surg Oncol* 2001;8: 50-59

- 215) Fujimoto Y, Nakanishi Y. Clinicopathologic study of primary malignant gastrointestinal stromal tumor of the stomach, with special reference to prognostic factor: analysis of results in 140 surgically resected patients. *Gastric Cancer* 2003;6: 39-48
- 216) Miettinen M, Makhlof H. Gastrointestinal stromal tumors of the jejunum and ileum. A clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 906 cases before imatinib with long-term follow-up. *Am J Surg Pathol* 2006;30: 477-489
- 217) Eunhee SY, Curtis RS. Epithelioid gastrointestinal stromal tumor with PDGFRA activating mutation and immunoreactivity. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2005;13: 157-161
- 218) Wardelmann E, Hrchyk A. Association of platelet-derived growth factor receptor α mutations with gastric primary site and epithelioid or mixed cell morphology in gastrointestinal stromal tumors.
- 219) Rossi G, Valli R. PDGFR expression in differential diagnosis between KIT-negative gastrointestinal stromal tumours and other primary soft tissue tumours of the gastrointestinal tract.
- 220) Pauls K, Merkelbach-Bruse S. PDGFR α - and c-kit-mutated gastrointestinal stromal tumours are characterized by distinctive histological and immunohistochemical features. *Histopathology* 2005;46: 166-175
- 221) Loughrey MB, Trivett M. KIT immunohistochemistry and mutation status in gastrointestinal stromal tumours evaluated for treatment with imatinib. *Histopathology* 2006;49: 52-65
- 222) Montgomery E, Abraham SC. CD44 loss in gastric stromal tumors as a prognostic marker. *Am J Surg Pathol* 2004;28: 168-177
- 223) Hillemanns M, Pasold S. Prognostic factors of gastrointestinal stromal tumors of the stomach. *Verh Dtsch Ges Pathol* 1998;82: 261-266
- 224) Rudolph P, Gloeckner K. Immunophenotype, proliferation, DNA ploidy, and biological behavior of gastrointestinal stromal tumors: a multivariate clinicopathologic study. *Hum Pathol* 1998;29: 791-800
- 225) Carrillo R, Candia A. Prognostic significance of DNA ploidy and proliferative index (MIB-1 index) in gastrointestinal stromal tumors. *Hum Pathol* 1997;28: 160-165

- 226) Toquet C, Le Neel JC. Elevated ($\geq 10\%$) MIB-1 proliferative index correlates with poor outcome in gastric stromal tumor patients: a study of 35 cases. *Dig Dis Sci* 2002;10: 2247-2253
- 227) Wong NACS, Young R. Prognostic indicators for gastrointestinal tumors: a clinicopathological and immunohistochemical study of 108 resected cases of the stomach. *Histopathology* 2003;43: 118-126
- 228) Iesalnieks I, Rummele P. Factors associated with disease progression in patients with gastrointestinal stromal tumors in the pre-*imatinib* era. *Am J Clin Pathol* 2005;124: 740-748
- 229) Yan H, Marchettini P. Prognostic assessment of gastrointestinal stromal tumor. *Am J Clin Oncol* 2003;26: 221-228
- 230) Shimoda T, Fujimoto Y. A concept and issue of GISTs. *Pathol Clin Med* 2002;20: 134-140
- 231) Wang X, Mori I. Gastrointestinal stromal tumors: clinicopathological study of chinese cases. *Pathol Int* 2001;51: 701-706
- 232) Ozcug H, Yilmazlar T. Analysis of prognostic and immunohistochemical factors in gastrointestinal stromal tumors with malignant potential. *J Gastroint Surg* 2005;9: 418-429
- 233) Mochizuki Y, Kodera Y. Treatment and risk factors for recurrence after curative resection of gastrointestinal stromal tumors of the stomach. *World J Surg* 2004;28: 870-875
- 234) Ma CK, De Peralta MN. Small intestinal stromal tumors: a clinicopathologic study of 20 cases with immunohistochemical assessment of cell differentiation and the prognostic role of proliferation antigens. *Am J Clin Pathol* 1995;19: 71-80
- 235) Evans HL. Smooth muscle tumors of the gastrointestinal tract: a study of 56 cases for a minimum of 10 years. *Cancer* 1985;56: 2242-2250
- 236) Emory TS, Derringer GA. Ki-67 (MIB-1) immunohistochemistry as a prognostic factor in gastrointestinal smooth-muscle tumors. *J Surg Pathol* 1997;2: 239-242
- 237) Aparicio T, Boige V. Prognostic factors after surgery of primary resectable gastrointestinal stromal tumours. *EJSO* 2004;30: 1098-1103

- 238) Ballarini C, Intra M. Gastrointestinal stromal tumors: a “benign” tumor with hepatic metastasis after 11 years. *Tumori* 1998;84: 78-81
- 239) Tornoczky T, Kover E. Frequent occurrence of low grade cases among metastatic gastrointestinal stromal tumours. *J Clin Pathol* 2003;56: 363-367
- 240) Inoue T, Suzuki T. Immunohistopathological and molecular genetic features of a case in which gastrointestinal stromal tumor recurred five times. *Pathol International* 2004;54: 196-200
- 241) Naor D, Nedvetzki S. CD44 in cancer. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 2002;39: 527-579
- 242) Nishida T, Hirota S. Biological and clinical review of stromal tumors in the gastrointestinal tract. *Histol Histopathol* 2000;15: 1293-1301
- 243) Agaimy A, Wunsch PH, Dirnhofer S et al. Microscopic gastrointestinal stromal tumors in esophageal and intestinal surgical resection specimens: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular study of 19 lesions. *Am. J. Surg. Pathol.* 2008; 32; 867–873
- 244) Agaimy A, Wunsch PH, Hofstaedter F et al. Minute gastric sclerosing stromal tumors (GIST tumorlets) are common in adults and frequently show c-KIT mutations. *Am. J. Surg. Pathol.* 2007; 31; 113–120.
- 245) Agaimy A, Markl B, Arnholdt H, et al. Multiple sporadic gastrointestinal stromal tumours arising at different gastrointestinal sites: pattern of involvement of the muscularis propria as a clue to independent primary GISTs. *Virchows Arch* 2009;455:101-8.
- 246) Agaimy A, Terracciano LM, Dirnhofer S, et al. V600E BRAF mutations are alternative early molecular events in a subset of KIT/PDGFRα wild-type gastrointestinal stromal tumours. *J Clin Pathol* 2009;62:613-6.
- 247) Agaram NP, Wong GC, Guo T, Maki RG, Singer S, Dematteo RP, et al. Novel V600E BRAF mutations in imatinib-naive and imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors. *Genes Chromosomes Cancer.* 2008;47:853–9.

- 248) Ambrogio C, Voena C, Manazza AD, et al. p130Cas mediates the transforming properties of the anaplastic lymphoma kinase. *Blood* 2005;106:3907-16.
- 249) Andersson J, Sihto H, Meis-Kindblom JM, et al. NF1-associated gastrointestinal stromal tumors have unique clinical, phenotypic, and genotypic characteristics. *Am J Surg Pathol.* 2005; 29:1170–1176.
- 250) A. Astier, et al., *The Journal of Biological Chemistry* 272 (1) (1997) 228–232.
- 251) H.K. Avraham, et al., *The Journal of Biological Chemistry* 278 (38) (2003) 36661–36668.
- 252) Auvinen M, Paasinen-Sohns A, Hirai H, Andersson LC, Holtta E. Ornithine decarboxylase- and ras-induced cell transformations: reversal by protein tyrosine kinase inhibitors and role of pp130CAS. *Mol Cell Biol* 1995;15:6513-25.
- 253) Bandyopadhyay C, Veetil MV, Dutta S, Chandran B. p130Cas scaffolds the signalosome to direct adaptor-effector cross talk during Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus trafficking in human microvascular dermal endothelial cells. *J Virol.* 2014 Dec;88(23):13858-78
- 254) Barreca A, Fornari A, Bonello L, Tondat F, Chiusa L, Lista P and Pich A. KIT and PDGFRA mutations and PDGFRA immunostaining in gastrointestinal stromal tumors. *Molecular Medicine REPORTS* 4: 3-8, 2011
- 255) Barrett A, Caroline Pellet-Many a, Ian C. Zachary a, Ian M. Evans a, Paul Frankel. p130Cas: A key signalling node in health and disease. *Cellular Signalling* 25 (2013) 766–777
- 256) Bayer-Garner I, Morgan M, Smoller BR. Caveolin expression is common among benign and malignant smooth muscle and adipocyte neoplasms. *Mod Pathol.* 2002; 15:1-5.
- 257) Belinsky MG, Rink L, Cai KQ, et al. Somatic loss of function mutations in neurofibromin 1 and MYC associated factor X genes identified by exome-wide sequencing in a wild-type GIST case. *BMC Cancer.* 2015;15:887.

- 258) Boikos SA, Pappo AS, Killian JK, et al. Molecular subtypes ofKIT/PDGFR α wild-type gastrointestinal stromal tumors: a report from the national institutes of health gastrointestinal stromal tumor clinic. *JAMA Oncol.* 2016;2:922–928.
- 259) J. Brabek, et al., *Oncogene* 23 (44) (2004) 7406–7415
- 260) Burgermeister E, Liscovitch M, Rocken C et al Caveats of caveolin-1 in cancer progression. *Cancer letters* 2008;268:187-201
- 261) Campbell L, Gumbleton M, Griffiths DF. Caveolin-1 overexpression predicts poor disease-free survival of patients with clinically confined renal cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2003 ;89:1909-13.
- 262) Cantiani L, Manara MC, Zucchini C, De Dancatis P, Zuntini M, Valvassori L, Serra M, Olivero M, Di Renzo MF, Colombo MP, Picci P, Scotlandi K. Caveolin-1 reduces osteosarcoma metastases by inhibiting c-Src activity and met signalling. *Cancer Res.* 2007; 67: 7675-7685.
- 263) A.Casamassima, E. Rozengurt, *The Journal of Biological Chemistry* 273 (40)(1998)26149–26156.
- 264) Cho WJ, Daniel EE. Proteins of interstitial cells of Cajal and intestinal smooth muscle, colocalized with caveolin-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005 Mar;288(3):G571-85
- 265) Cho WJ, Daniel EE. Colocalization between caveolin isoforms in the intestinal smooth muscle and interstitial cells of Cajal of the Cav1(+/+) and Cav1 (-/-) mouse. *Histochem Cell Biol.* 2006 Jul;126(1):9-16.
- 266) Choi H, Charnsangavej C, Faria SC, Macapinlac HA, Burgess MA, Patel SR, Chen LL, Podoloff DA, Benjamin RS. 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 May 1;25(13):1753-9.
- 267) Cohen AW, Hnasko R, Schubert W, Lisanti MP. Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiol Rev.* 2004;84:1341-79.
- 268) D'Ambrosio L, Palesandro E, Boccone P, Tolomeo F, Miano S, Galizia D, Manca A, Chiara G, Bertotto I, Russo F, Campanella D, Venesio T, Sangiolo D, Pignochino Y, Siatis D, De Simone M, Ferrero A, Pisacane A, Dei Tos AP, Aliberti S, Aglietta M, Grignani G. Impact of a

- risk-based follow-up in patients affected by gastrointestinal stromal tumour. *Eur J Cancer*. 2017 Jun;78:122-132.
- 269) Y. Dai, et al., *Cell Biochemistry and Function* 29 (8) (2011) 625–629.
- 270) Daniel EE. Communications between ICC and gastrointestinal muscle. *Gastroenterol Mot* 16, Suppl 1: 188–122, 2004.
- 271) Daniel EE, Thomas J, Ramnarain M, Bowes TJ, and Jury J. Do gap Junctions couple interstitial cells of Cajal pacing and ICC neurotransmission to gastrointestinal smooth muscle. *Neurogastroenterol Motil* 13:297–307, 2001.
- 272) Daniels M, Lurkin I, Pauli R, et al. Spectrum of KIT/PDGFR α /BRAF mutations and phosphatidylinositol-3-kinase pathway gene alterations in gastrointestinal stromal tumors (GIST). *Cancer Lett* 2011;312:43-54.
- 273) Darby PJ and Daniel EE. Caveolae from canine airway smooth muscle contain the necessary components for a role in Ca²⁺ handling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L1226–L1235, 2000.
- 274) Dematteo RP, Ballman KV, Antonescu CR, Maki RG, Pisters PW, Demetri GD, Blackstein ME, Blanke CD, von Mehren M, Brennan MF, Patel S, McCarter MD, Polikoff JA, Tan BR, Owzar K; American College of Surgeons Oncology Group (ACOSOG) Intergroup Adjuvant GIST Study Team. Adjuvant imatinib mesylate after resection of localised, primary gastrointestinal stromal tumour: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2009 Mar 28;373(9669):1097-104.
- 275) DeWitt J, Emerson RE, Sharman S, et al. Endoscopic ultrasound-guided trucut biopsy of gastrointestinal mesenchymal tumor. *Surg Endosc*. 2011; 25:192–202.
- 276) Doyle LA, Nelson D, Heinrich MC, et al. Loss of succinate dehydrogenase subunit B (SDHB) expression is limited to a distinctive subset of gastric wild-type gastrointestinal stromal tumours: a comprehensive genotype-phenotype correlation study. *Histopathology*. 2012;61:801–809.
- 277) Dorssers, L. C. et al. The prognostic value of BCAR1 in patients with primary breast cancer. *Clin. Cancer Res*. 10, 6194–6202 (2004).

- 278) Dorssers, L. C. et al. Tamoxifen resistance in breast cancer: elucidating mechanisms. *Drugs* 61,1721–1733 (2001).
- 279) Duregon E, Senetta R, Bertero L, Bussolati B, Annaratone L, Pittaro A, Papotti M, Marchiò C, Cassoni P. Caveolin 1 expression favors tumor growth and is associated with poor survival in primary lung adenocarcinomas. *Tumour Biol.* 2017 Feb;39(2):1010428317694311.
- 280) Duregon E, Senetta R, Pittaro A, Verdun di Cantogno L, Stella G, De Blasi P, Zorzetto M, Mantovani C, Papotti M, Cassoni P . CAVEOLIN-1 expression in brain metastasis from lung cancer predicts worse outcome and radioresistance, irrespective of tumor histotype. *Oncotarget.* 2015 Oct 6;6(30):29626-36.
- 281) Engelman JA, Zhang XL, Lisanti MP Genes encoding human caveolin-1 and -2 are co-localized to the D7S522 locus (7q31.1), a known fragile site (FRA7G) that is frequently deleted in human cancers. *FEBS Lett* 1998;36:403-410
- 282) I.M. Evans, et al., *Molecular and Cellular Biology* 31 (6) (2011) 1174–1185.
- 283) Faggi F, Mitola S, Sorci G et al. Phosphocaveolin-1 enforces tumor growth and chemoresistance in rhabdomyosarcoma. *PLoS One* 2014;9:e84618
- 284) Falchook GS, Trent JC, Heinrich MC, et al. BRAF mutant gastrointestinal stromal tumor: first report of regression with BRAF inhibitor dabrafenib (GSK2118436) and whole exomic sequencing for analysis of acquired resistance. *Oncotarget.* 2013;4:310–315.
- 285) Fra A.M., Williamson E., Simons K. and Parton R.G., De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1995; 92: 8655–8659.
- 286) Gasparotto D, Rossi S, Polano M, et al. Quadruple-negative GIST is a sentinel for unrecognized neurofibromatosis type 1 syndrome. *Clin Cancer Res.* 2017;23:273–282.
- 287) George S, Wang Q, Heinrich MC, Corless CL, Zhu M, Butrynski JE, Morgan JA, Wagner AJ, Choy E, Tap WD, Yap JT, Van den Abbeele AD, Manola JB, Solomon SM, Fletcher JA, von Mehren M, Demetri GD. Efficacy and safety of regorafenib in patients with metastatic and/or

- unresectable GI stromal tumor after failure of imatinib and sunitinib: a multicenter phase II trial. *J Clin Oncol*. 2012 Jul 1;30(19):2401-7.
- 288) Glenney J.R., Tyrosine phosphorylation of a 22-kDa protein is correlated with transformation by Rous sarcoma virus *J. Biol. Chem.* 1989;264: 20163-20166.
- 289) Goetz JG, Lajoie P, Wiseman SM, Nabi IR. Caveolin-1 in tumor progression: the good, the bad and the ugly. *Cancer Metastasis Rev* 2008;27:715-35.
- 290) Gold JS, Gönen M, Gutiérrez A, Broto JM, García-del-Muro X, Smyrk TC, Maki RG, Singer S, Brennan MF, Antonescu CR, Donohue JH, DeMatteo RP. Development and validation of a prognostic nomogram for recurrence-free survival after complete surgical resection of localised primary gastrointestinal stromal tumour: a retrospective analysis. *Lancet Oncol*. 2009 Nov;10(11):1045-52.
- 291) Gorodinsky and D.A. Harris, Glycolipid-anchored proteins in neuroblastoma cells form detergent-resistant complexes without caveolin, *J. Cell Biol.* 1995; 129:619–627.
- 292) Gratton JP, Lin MI, Yu J, Weiss ED, Jiang ZL, Fairchild TA, Iwakiri Y, Groszmann R, Claffey KP, Cheng YC, Sessa WC. Selective inhibition of tumor microvascular permeability by cavtratin blocks tumor progression in mice. *Cancer Cell*. 2003; 4: 31-39.
- 293) Haller F, Moskalev EA, Faucz FR, et al. Aberrant DNA hypermethylation of SDHC: a novel mechanism of tumor development in Carney triad. *Endocr Relat Cancer*. 2014;21:567–577.
- 294) Han F, Zhu HG. Caveolin-1 regulating the invasion and expression of matrix metalloproteinase (MMPs) in pancreatic carcinoma cells. *J Surg Res*. 2010; 159: 443-450.
- 295) D. Hanahan, R.A. Weinberg, *Cell* 144 (5) (2011) 646–674.
- 296) M.T. Harte, et al., *The Journal of Biological Chemistry* 271 (23) (1996) 13649–13655.
- 297) Hayer A, Stoeber M, Ritz D, et al. Caveolin-1 is ubiquitinated and targeted to intraluminal vesicles in endolysosomes for degradation. *J Cell Biol*. 2010; 191: 615–29.

- 298) Hostein I, Faur N, Primois C, et al. BRAF mutation status in gastrointestinal stromal tumors. *Am J Clin Pathol* 2010;133:141-8.
- 299) Huertas-Martínez J, Rello-Varona S, Herrero-Martín D, Barrau I, García-Monclús S, Sáinz-Jaspeado M, Lagares-Tena L, Núñez-Álvarez Y, Mateo-Lozano S, Mora J, Roma J, Toran N, Moran S, López-Alemaný R, Gallego S, Esteller M, Peinado MA, Del Muro XG, Tirado OM. Caveolin-1 is down-regulated in alveolar rhabdomyosarcomas and negatively regulates tumor growth. *Oncotarget*. 2014 Oct 30;5(20):9744-55.
- 300) Hill MM, Bastiani M, Luetterforst R, et al. PTFR-Cavin, a conserved cytoplasmic protein required for caveola formation and function. *Cell*. 2008; 132: 113–24
- 301) H. Honda, et al., *Nature Genetics* 19 (4) (1998) 361–365.
- 302) Huss S, Pasternack H, Ihle MA, et al. Clinicopathological and molecular features of a large cohort of gastrointestinal stromal tumors (GISTs) and review of the literature: BRAF mutations in KIT/PDGFR α wildtype GISTs are rare events. *Hum Pathol* 2017;62:206–214.
- 303) Janeway KA, Kim SY, Lodish M, et al. Defects in succinate dehydrogenase in gastrointestinal stromal tumors lacking KIT and PDGFR α mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:314–318.
- 304) Janeway KA, Liegl B, Harlow A, et al. Pediatric KIT wild-type and platelet-derived growth factor receptor α -wild-type adult gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res*. 2007;67:9084–9088.
- 305) Joensuu H. Risk stratification of patients diagnosed with gastrointestinal stromal tumor. *Hum Pathol*. 2008 Oct;39(10):1411-9
- 306) Joensuu H, Eriksson M, Sundby Hall K, Hartmann JT, Pink D, Schütte J, Ramadori G, Hohenberger P, Duyster J, Al-Batran SE, Schlemmer M, Bauer S, Wardelmann E, Sarlomo-Rikala M, Nilsson B, Sihto H, Monge OR, Bono P, Kallio R, Vehtari A, Leinonen M, Alvegård T, Reichardt P. One vs three years of adjuvant imatinib for operable gastrointestinal stromal tumor: a randomized trial. *JAMA*. 2012 Mar 28;307(12):1265-72.

- 307) Joshi B, Bastiani M, Strugnell SS, et al. Phosphocaveolin-1 is a mechanotransducer that induces caveola biogenesis via Egr1 transcriptional regulation. *J Cell Biol.* 2012;199: 425–35.
- 308) Karam JA, Lotan Y, Roehrborn CG, Ashfaq R, Karakiewicz PI, Shariat SF. Caveolin-1 overexpression is associated with aggressive prostate cancer recurrence. *Prostate.* 2007 ;67:614-22.
- 309) Kawanowa K, Sakuma Y, Sakurai S et al. High incidence of microscopic gastrointestinal stromal tumors in the stomach. *Hum. Pathol.* 2006; 37; 1527–1535.
- 310) R. Korah, et al., *Breast Cancer Research and Treatment* 88 (1) (2004) 17–28.
- 311) S.B. Kanner, et al., *The EMBO Journal* 10 (7) (1991) 1689–1698.
- 312) Kim EJ, Sohn JH, Kim MK, Chae SW et al. The Loss of Expression of Caveolin-1 in Gastrointestinal Stromal Tumors. *The Korean Journal of Pathology* 2005;39(5): 338-344.
- 313) Lasota J and Miettinen M, Clinical significance of oncogenic KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumours. *Histopathology* 2008;53:245-266
- 314) Lasota J, Xi L, Coates T, Dennis R, Evbuomwan MO, Wang ZF, Raffeld M, Miettinen M. No KRAS mutations found in gastrointestinal stromal tumors (GISTs): molecular genetic study of 514 cases. *Mod Pathol.* 2013 Nov;26(11):1488-91.
- 315) Lasota J, Felisiak-Golabek A, Wasag B, Kowalik A, Zięba S, Chłopek M, Wang ZF, Coates T, Kopczynski J, Gozdz S, Sarlomo-Rikala M, Miettinen M. Frequency and clinicopathologic profile of PIK3CA mutant GISTs: molecular genetic study of 529 cases. *Mod Pathol.* 2016 Mar;29(3):275-82.
- 316) Lee, C.L. Reimer, P. Oh, D.B. Campbell and J.E. Schnitzer, Tumor cell growth inhibition by caveolin re-expression in human breast cancer cells, *Oncogene* 1998;16:1391–1397
- 317) Lee CH, Liang CW, Espinosa I. The utility of discovered on gastrointestinal stromal tumor 1 (DOG1) antibody in surgical pathology-the GIST of it. *Adv Anat Pathol.* 2010 May;17(3):222-32.

- 318) Liegl B, Hornick JL, Corless CL, Fletcher CD. Monoclonal antibody DOG1.1 shows higher sensitivity than KIT in the diagnosis of gastrointestinal stromal tumors, including unusual subtypes. *Am J Surg Pathol*. 2009 Mar;33(3):437-46.
- 319) Liu P, Anderson RG. Compartmentalized production of ceramide at the cell surface. *J Biol Chem*. 1995 Nov 10;270(45):27179-85.
- 320) Liu P, Ying Y, Ko YG, Anderson RG. Localization of platelet-derived growth factor-stimulated phosphorylation cascade to caveolae. *J Biol Chem*. 1996 Apr 26;271(17):10299-303.
- 321) Li w.p., Liu P., Pilcher B., et al., Cell-specific targeting of caveolin-1 to caveolae, secretory vesicles, cytoplasm or mitochondria. *J Cell Sci*. 2001;114(Pt 7):1397-408.
- 322) Liu P, Ying Y, Anderson RG. Platelet-derived growth factor activates mitogen-activated protein kinase in isolated caveolae. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Dec 9;94(25):13666-70.
- 323) Martinho O, Gouveia A, Viana-Pereira M, et al. Low frequency of MAP kinase pathway alterations in KIT and PDGFRA wild-type GISTs. *Histopathology* 2009;55:53-62.
- 324) Mason EF, Hornick JL. Conventional risk stratification fails to predict progression of succinate dehydrogenase-deficient gastrointestinal stromal tumors: a clinicopathologic study of 76 cases. *Am J Surg Pathol*. 2016;40:1616–1621.
- 325) Matyakhina L, Bei TA, McWhinney SR, et al. Genetics of carney triad: recurrent losses at chromosome 1 but lack of germline mutations in genes associated with paragangliomas and gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92:2938–2943.
- 326) Mayordomo E, Machado I, Giner F, Kresse SH, Myklebost O, Carda C, Navarro S, Llombart-Bosch A. A tissue microarray study of osteosarcoma: histopathologic and immunohistochemical validation of xenotransplanted tumors as preclinical models. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2010; 18: 453-461.
- 327) McWhinney SR, Pasini B, Stratakis CA. Familial gastrointestinal stromal tumors and germ-line mutations. *N Engl J Med*. 2007;357:1054–6.

- 328) Mercier I, Jasmin JF, Pavlides S, Minetti C, Flomenberg N, Pestell RG, Frank PG, Sotgia F, Lisanti MP. Clinical and translational implications of the caveolin gene family: lessons from mouse models and human genetic disorders. *Lab Invest.* 2009;89:614-23
- 329) Miettinen M1, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: pathology and prognosis at different sites. *Semin Diagn Pathol.* 2006 May;23(2):70-83.
- 330) 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 Sep;33(9):1401-8.
- 331) Miettinen M, Fetsch JF, Sobin LH, et al. Gastrointestinal stromal tumors in patients with neurofibromatosis 1: a clinicopathologic and molecular genetic study of 45 cases. *Am J Surg Pathol.* 2006;30:90–96.
- 332) Miettinen M1, Wang ZF, Sarlomo-Rikala M, Osuch C, Rutkowski P, Lasota J. Succinate dehydrogenase-deficient GISTs: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 66 gastric GISTs with predilection to young age. *Am J Surg Pathol.* 2011 Nov;35(11):1712-21.
- 333) Miettinen M and Jerzy Lasota. GASTROINTESTINAL STROMAL TUMORS. *Gastroenterol Clin North Am.* 2013 June ; 42(2): 399–415.
- 334) Miotti S, Tomassetti A, Facetti I, Sanna E, Berno V, Canevari S. Simultaneous expression of caveolin-1 and E-cadherin in ovarian carcinoma cells stabilizes adherens junctions through inhibition of src-related kinases. *Am J Pathol.* 2005;167:1411-27.
- 335) Miranda C, Nucifora M, Molinari F, et al. KRAS and BRAF mutations predict primary resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res.* 2012;18:1769–1776.
- 336) C. Mirre, L. Monlauzeur, M. Garcia, M.H. Delgrossi and A. Le Bivic, Detergent-resistant membrane microdomains from Caco-2 cells do not contain caveolin, *Am. J. Physiol.* 1996;271:C887–C894
- 337) Miselli f, Millefanti C, Conca E, Negri T, Piacena C, Pierotti MA, Tamborini E and Pilotti S: PDGFRARA immunostaining can help in the diagnosis of gastrointestinal stromal tumors. *Am J Surg Pathol* 32: 738-743, 2008.

- 338) Montemurro M, Schöffski P, Reichardt P, Gelderblom H, Schütte J, Hartmann JT, von Moos R, Seddon B, Joensuu H, Wendtner CM, Weber E, Grünwald V, Roth A, Leyvraz S. Nilotinib in the treatment of advanced gastrointestinal stromal tumours resistant to both imatinib and sunitinib. *Eur J Cancer*. 2009 Sep;45(13):2293-7.
- 339) Montemurro M, Gelderblom H, Bitz U, Schütte J, Blay JY, Joensuu H, Trent J, Bauer S, Rutkowski P, Duffaud F, Pink D. Sorafenib as third- or fourth-line treatment of advanced gastrointestinal stromal tumour and pretreatment including both imatinib and sunitinib, and nilotinib: A retrospective analysis. *Eur J Cancer*. 2013 Mar;49(5):1027-31.
- 340) Munshi N, Groopman JE, Gill PS, Ganju RK. c-Src mediates mitogenic signals and associates with cytoskeletal proteins upon vascular endothelial growth factor stimulation in Kaposi's sarcoma cells. *J Immunol*. 2000 Feb 1;164(3):1169-74.
- 341) I. Nakamura, G.A. Rodan, T. Duong le, *Endocrinology* 144 (11) (2003) 4739–4741.
- 342) K. Ogden, et al., *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 291 (6) (2006) H2857–H2863.
- 343) M. Ojaniemi, K. Vuori, *The Journal of Biological Chemistry* 272 (41) (1997) 25993–25998.
- 344) Palade G.E., Fine structure of blood capillaries, *J Appl. Phys.* 1953; 24:1424
- 345) Ganjoo KN, Villalobos VM, Kamaya A, Fisher GA, Butrynski JE, Morgan JA, Wagner AJ, D'Adamo D, McMillan A, Demetri GD, George S. A multicenter phase II study of pazopanib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumors (GIST) following failure of at least imatinib and sunitinib. *Ann Oncol*. 2014 Jan;25(1):236-40.
- 346) Park SH, Ryu MH, Ryoo BY, Im SA, Kwon HC, Lee SS, Park SR, Kang BY, Kang YK. Sorafenib in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumors who failed two or more prior tyrosine kinase inhibitors: a phase II study of Korean gastrointestinal stromal tumors study group. *Invest New Drugs*. 2012 Dec;30(6):2377-83.
- 347) Parolini, I., Sargiacomo, M., Galbiati, F., Rizzo, G., Grignani, F., Engelman, J. A., Okamoto, T., Ikezu, T., Scherer, P. E., Mora, R., Rodriguez-Boulan, E., Peschle, C., and Lisanti, M. P. J. Expression of

- Caveolin-1 Is Required for the Transport of Caveolin-2 to the Plasma Membrane: retention of caveolin-2 at the level of the Golgi complex. *Biol. Chem.* 1999;274: 25718-25725
- 348) Pasini B, McWhinney SR, Bei T, et al. Clinical and molecular genetics of patients with the Carney-Stratakis syndrome and germline mutations of the genes coding for the succinate dehydrogenase subunits SDHB, SDHC, and SDHD. *Eur J Hum Genet.* 2008;16:79–88.
- 349) L. Pelkmans, T. Burli, M. Zerial and A. Helenius, Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic, *Cell* 2004; 118:767–780.
- 350) Peterson MR, Piao Z, Weidner N and Yi ES: Strong PDGFRARA positivity is seen in GISTs but not in other intra-abdominal mesenchymal tumors: immunohistochemical and mutational analyses. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 14: 390-396, 2006
- 351) Pierotti MA, Tamborini E, Negri T, Priol S, Pilotti S. Targeted therapy in GIST: in silico modeling for prediction of resistance. *Nat Rev Clin Oncol* 2011;8:161–70.
- 352) S. Rankin, E. Rozengurt, *The Journal of Biological Chemistry* 269 (1) (1994) 704–710.
- 353) Razani B., Combs T.P., Wang Xb., et al. Caveolin-1-deficient mice are lean, resistant to diet-induced obesity, and show hypertriglyceridemia with adipocyte abnormalities. *J Biol Chem.* 2002;277:8635-47.
- 354) G.M. Rivera, et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (25) (2006) 9536–9541.
- 355) Rossi S1, Miceli R, Messerini L, Bearzi I, Mazzoleni G, Capella C, Arrigoni G, Sonzogni A, Sidoni A, Toffolatti L, Laurino L, Mariani L, Vinaccia V, Gnocchi C, Gronchi A, Casali PG, Dei Tos AP. Natural history of imatinib-naive GISTs: a retrospective analysis of 929 cases with long-term follow-up and development of a survival nomogram based on mitotic index and size as continuous variables. *Am J Surg Pathol.* 2011 Nov;35(11):1646-56.
- 356) Rossi S, Gasparotto D, Miceli R, et al. KIT, PDGFRA, and BRAF mutational spectrum impacts on the natural history of imatinib-naive localized GIST: a population-based study. *Am J Surg Pathol* 2015;39:922-30.

- 357) Rossi S, Sbaraglia M, Dell'Orto MC, et al. Concomitant KIT/BRAF and PDGFRA/BRAF mutations are rare events in gastrointestinal stromal tumors. *Oncotarget* 2016;24:30109-18.
- 358) K.G. Rothberg, J.E. Heuser, W.C. Donzell, Y.S. Ying, J.R. Glenney and R.G. Anderson, Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats, *Cell* 1992;68: 673–682.
- 359) Sainz-Jaspeado M, Lagares-Tena L, Lasheras, et al. Caveolin-1 modulates the ability of Ewing's sarcoma to metastasize. *Mol Cancer Res.* 2010; 8: 1489–500.
- 360) Sainz-Jaspeado M, Martin-Liberal J, Lagares-Tena L, et al. Caveolin-1 in sarcomas: friend or foe? *Oncotarget.* 2011; 2(4): 305–12.
- 361) R. Sakai, et al., *The EMBO Journal* 13 (16) (1994) 3748–3756.
- 362) Salgia, R. et al. p130CAS forms a signaling complex with the adapter protein CRKL in hematopoietic cell transformed by the BCR/ABL oncogene. *J. Biol. Chem.* 271, 25198–25203 (1996).
- 363) Savage K, Lambros MB, Robertson D, Jones RL, Jones C, Mackay A, James M, Hornick JL, Pereira EM, Milanezi F, Fletcher CD, Schmitt FC, Ashworth A, Reis-Filho JS. Caveolin 1 is overexpressed and amplified in a subset of basal-like and metaplastic breast carcinomas: a morphologic, ultrastructural, immunohistochemical, and in situ hybridization analysis. *Clin Cancer Res.* 2007 ;13:90-101.
- 364) Sawaki A, Nishida T, Doi T, Yamada Y, Komatsu Y, Kanda T, Kakeji Y, Onozawa Y, Yamasaki M, Ohtsu A. Phase 2 study of nilotinib as third-line therapy for patients with gastrointestinal stromal tumor. *Cancer.* 2011 Oct 15;117(20):4633-41.
- 365) Schaefer IM, Mariño-Enríquez A, Fletcher JA. What is New in Gastrointestinal Stromal Tumor? *Adv Anat Pathol.* 2017 Sep;24(5):259-267.
- 366) Schaefer IM, Wang Y, Liang CW, et al. MAX inactivation is an early event in GIST development that regulates p16 and cell proliferation. *Nat Commun.* 2017;8:14674.

- 367) Scheiffele, P., Verkade, Fra, M., Virta, Simons, and Ikonen. Caveolin-1 and -2 in the Exocytic Pathway of MDCK Cells *J. Cell Biol.* 1998;140: 795-806.
- 368) Senetta R, Stella G, Pozzi E, Sturli N, Massi D, Cassoni P. Caveolin-1 as a promoter of tumour spreading: when, how, where and why. *J Cell Mol Med.* 2013 Mar;17(3):325-36.
- 369) Serrano C, Wang Y, Marino-Enriquez A, et al. KRAS andKIT gatekeeper mutations confer polyclonal primary imatinib resistance in GI stromal tumors: relevance of concomitant phosphatidylinositol 3-kinase/AKT dysregulation. *J Clin Oncol.* 2015;33:e93–e96.
- 370) Simionescu, N. Simionescu and G.E. Palade, Morphometric data on the endothelium of blood capillaries, *J. Cell Biol.* 1974;60:128–152.
- 371) Sinha B, Koster D, Ruez R, et al. Cells respond to mechanical stress by rapid disassembly caveolae. *Cell.* 2010; 144: 402–13.
- 372) Sloan EK, Stanley KL, Anderson RL. Caveolin-1 inhibits breast cancer growth and metastasis. *Oncogene.* 2004; 23:7893-7897.
- 373) Smart, E. J., Graf, G. A., McNiven, M. A., Sessa, W. C., Engelman, J. A., Scherer, P. E., Okamoto, T., and Lisanti, M. P. Caveolins, Liquid-Ordered Domains, and Signal Transduction *Mol. Cell. Biol* 1999;19:7289-7304
- 374) Stratakis CA, Carney JA. The triad of paragangliomas, gastric stromal tumours and pulmonary chondromas (Carney triad),and the dyad of paragangliomas and gastric stromal sarcomas (Carney-Stratakis syndrome): molecular genetics and clinical implications. *J Intern Med.* 2009;266:43–52.
- 375) D.D. Tang, *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics* 14 (2) (2009)89–98
- 376) Thao le B1, Vu HA, Yasuda K, Taniguchi S, Yagasaki F, Taguchi T, Watanabe T, Sato Y. Cas-L was overexpressed in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor cells. *Cancer Biol Ther.* 2009 Apr;8(8):683-8.
- 377) Tirado OM, Mateo-Lozano S, Villar J, Dettin LE, Llorca A, Gallego S, Ban J, Kovar H, Notario V. Caveolin-1 (CAV1) is a target of EWS/FLI-1

- and a key determinant of the oncogenic phenotype and tumorigenicity of Ewing's sarcoma cells. *Cancer Res.* 2006; 66: 9937-9947.
- 378) Tirado OM, MacCarthy CM, Fatima N, Villar J, Mateo-Lozano S, Notario V. Caveolin-1 promotes resistance to chemotherapy-induced apoptosis in Ewing's sarcoma cells by modulating PKC α phosphorylation. *Int J Cancer.* 2010; 126: 426-436.
- 379) Tornillo G, Elia AR, Castellano I, Spadaro M, Bernabei P, Bisaro B, Camacho-Leal Mdel P, Pincini A, Provero P, Sapino A, Turco E, Defilippi P, Cabodi S. p130Cas alters the differentiation potential of mammary luminal progenitors by deregulating c-Kit activity. *Stem Cells.* 2013 Jul;31(7):1422-33
- 380) van der Flier, S. et al. BCAR1/p130Cas expression in untreated and acquired tamoxifen-resistant human breast carcinomas. *Int. J. Cancer* 89, 465–468 (2000).
- 381) Zheng S, Huang KE, Pan YL, et al. KIT and BRAF heterogeneous mutations in gastrointestinal stromal tumors after secondary imatinib resistance. *Gastric Cancer* 2015;18:796-802.
- 382) Wang Y, Marino-Enriquez A, Bennett RR, et al. Dystrophin is a tumor suppressor in human cancers with myogenic programs. *Nat Genet.* 2014;46:601–606.
- 383) Wardelmann E, Merkelbach-Bruse S, Pauls K, Thomas N, Schildhaus HU, Heinicke T, Speidel N, Pietsch T, Buettner R, Pink D, Reichardt P, Hohenberger P. Polyclonal evolution of multiple secondary KIT mutations in gastrointestinal stromal tumors under treatment with imatinib mesylate. *Clin Cancer Res.* 2006 Mar 15;12(6):1743-9.
- 384) M. Way and R.G. Parton, M-caveolin, a muscle-specific caveolin-related protein, *FEBS Lett.* 1995;376:108–112.
- 385) Wiechen K, Sers C, Agoulnik A, Arlt K, Dietel M, Schlag PM, Schneider U. Down-regulation of caveolin-1, a candidate tumor suppressor gene, in sarcomas. *Am J Pathol.* 2001;158:833-9.
- 386) Williams TM, Lisanti MP. Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005;288:C494-506.
- 387) Williamson, Adipose tissue. Morphological changes associated with lipid mobilization, *J. Cell Biol.* 1964;20:57–74

- 388) X.A. Zhang, et al., *The Journal of Biological Chemistry* 278 (29) (2003) 27319–27328.
- 389) Yamamoto M, Toya Y, Jensen RA, Ishikawa Y. Caveolin is an inhibitor of platelet-derived growth factor receptor signaling. *Exp Cell Res.* 1999 Mar 15;247(2):380-8.
- 390) Casali PG, Le Cesne A, Poveda Velasco A, Kotasek D, Rutkowski P, Hohenberger P, Fumagalli E, Judson IR, Italiano A, Gelderblom H, Adenis A, Hartmann JT, Duffaud F, Goldstein D, Broto JM, Gronchi A, Dei Tos AP, MARRÉAUD S, van der Graaf WT, Zalcborg JR, Litière S, Blay JY. Time to Definitive Failure to the First Tyrosine Kinase Inhibitor in Localized GI Stromal Tumors Treated With Imatinib As an Adjuvant: A European Organisation for Research and Treatment of Cancer Soft Tissue and Bone Sarcoma Group Intergroup Randomized Trial in Collaboration With the Australasian Gastro-Intestinal Trials Group, UNICANCER, French Sarcoma Group, Italian Sarcoma Group, and Spanish Group for Research on Sarcomas. *J Clin Oncol.* 2015 Dec 20;33(36):4276-83
- 391) Enache S, Arsene D, Iosif C, Stoicea M, Grigore A, Petrescu A, Enache V, Ardeleanu C. Nestin and caveolin-1 in the diagnosis of GISTs. *Rom J Morphol Embryol.* 2012;53(1):41-6.
- 392) Cabodi, S., Tinnirello, A., Bisaro, B., Tornillo, G., del Pilar Camacho-Leal, M., Forni, G., Cojoca, R., Iezzi, M., Amici, A., Montani, M., Eva, A., Di Stefano, P., Muthuswamy, S.K., Tarone, G., Turco, E., Defilippi, P., 2010. p130Cas is an essential transducer element in ErbB2 transformation. *FASEB J.* 24, 3796–3808