

I.O.S.U.D. - Universitatea de Vest „Vasile Goldiș” din Arad  
ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ

# TEZĂ DE DOCTORAT

## REZUMAT

Doctorand:

**KORODI DAN ANDREI**

Conducător de doctorat:

**Prof.univ.dr. MIUȚESCU EFTIMIE**

Arad, 2019-2020





# TEZĂ DE DOCTORAT

## *Angiogeneza în tumorile gastrointestinale stromale GIST*

Doctorand:

**KORODI DAN ANDREI**

Conducător de doctorat:

**Prof.univ.dr. MIUȚESCU EFTIMIE**



# PhD THESIS

## *Angiogenesis in gastrointestinal stromal tumors GIST*

PhD Student: **DAN ANDREI KORODI**

Scientific supervisor:

**Prof. EFTIMIE MIUȚESCU, MD, PhD**

# CUPRINS

## **INTRODUCERE**

### **PARTEA GENERALĂ**

#### **STUDIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII**

#### **CAPITOLUL I Aspecte anatomo-patologice ale tumorilor GIST**

- 1.1. Aspectul macroscopic și microscopic al tumorilor GIST
- 1.2. Potențialul malign
- 1.3. Mecanismul molecular al genezei tumorale
- 1.4. Rolul imunohistochemiei în diagnosticul pozitiv al tumorilor GIST

#### **CAPITOLUL II Diagnosticul și tratamentul tumorilor GIST**

- 2.1. Manifestări clinice
- 2.2. Investigații paraclinice
- 2.3. Tratamentul oncologic
  - 2.3.1. Tratamentul medicamentos
  - 2.3.2. Tratamentul chirurgical

### **PARTEA SPECIALĂ**

#### **CONTRIBUȚIA PERSONALĂ**

#### **CAPITOLUL III Motivație, obiective, metodologie, studiul clinico-statistic**

- 3.1 Motivație și obiective
- 3.2 Material și metodă
- 3.3 Analiza clinică și statistică a pacienților din studiu

#### **CAPITOLUL IV Rezultate asupra diagnosticului microscopic convențional**

#### **CAPITOLUL V Stabilirea diagnosticului de GIST prin studiul imunohistochimic**

- 5.1 Rezultate asupra expresiei vimentinei și proteinei S100
- 5.2 Demonstrarea imunohistochimică a diagnosticului de GIST

#### **CAPITOLUL VI Evaluarea angiogenezei în GIST**

- 6.1 Evaluarea tipurilor de vase sanguine asociate GIST
- 6.2 Evaluarea ratei de proliferare a endoteliului vaselor de neoformație
- 6.3 Activarea celulelor endoteliale: moment esențial în dezvoltarea vascularizației asociate GIST

### **CONCLUZII GENERALE**

#### **CONTRIBUȚIA INOVATIVĂ A TEZEI ȘI ORIGINALITATEA**

#### **BIBLIOGRAFIE**

#### **LISTĂ DE PUBLICAȚII**

#### **ANEXE**

# STADIUL CUNOAȘTERII ÎN DOMENIU

## INTRODUCERE

Tumorile gastrointestinale stromale (GIST) sunt cele mai des întâlnite tumori de origine mezenchimală non-epitelială a tractului digestiv. Studiile din literatura de specialitate au descoperit că aceste tumori reprezintă sub 1% din totalul tumorilor tractului digestiv și aproximativ 10% dintre tumorile de țesuturi moi cu localizare gastrointestinală[1]. Incidența acestor tumori nu este bine determinată. S-au efectuat multiple studii pe centre oncologice atât în Europa, cât și în SUA, pentru a se stabili numărul de cazuri noi pe an. De asemenea s-au întâlnit dificultăți în stabilirea incidenței utilizând studii retrospective datorită faptului că tumorile GIST nu au fost considerate o patologie distinctă cu aspecte specifice. Aceste tumori reprezintă de fapt o patologie tânără care a devenit de sine stătătoare din anul 1980, când a fost clasificată separat de celelalte patologii maligne.

Studii efectuate în SUA au prezentat un număr de 5.000 de cazuri noi pe an, în Franța 300-800 cazuri noi pe an, iar în Suedia 2 cazuri la 100.000 de locuitori [2]. Incidența totală a tumorilor GIST se consideră a fi 15 cazuri la 1.000.000 de locuitori pe an [3]. Date extrase dintr-un studiu suedez efectuat în SUA asupra incidenței anuale a GIST a arătat o incidență între 4000 și 5000 de cazuri aparute anual [4].

Un alt studiu epidemiologic efectuat între 1992 și 2000 a estimat o incidență de 2000 de cazuri anual în SUA [5]. Același studiu a dovedit că supraviețuirea la 5 ani a bolnavilor cu GIST este de 45%. Nu se poate stabili incidența reală a GIST deoarece aceasta pare să fie mai mare decât cea descoperită de studiile efectuate din cauza tumorilor GIST mici, care apar în 20% din cazuri și care sunt descoperite accidental fără a avea o manifestare clinică. Aceste tumori mici pot regresa sau nu progresează spre tumori simptomatice, fiind fie nedescoperite sau chiar descoperite accidental la necropsii. GIST mici descoperite accidental în timpul investigațiilor efectuate pentru stabilirea altor diagnostice, trebuie urmărite pentru că reprezintă leziuni preneoplazice care pot genera prin evoluția lor tumori cu comportament malign [6,7,8].

GIST-urile apar de obicei după vârsta de 50 de ani în special la sexul masculin fiind o patologie rar întâlnită sub 40 de ani și extrem de rar întâlnită la copii [9,10].

Aceste tumori pot apărea la nivelul organelor tractului digestiv de la esofag până la orificiul anal extern, dezvoltându-se în peretele viscerelor. De asemenea pot apărea la nivelul mezenterului, mezocolonului, epiplonului și retroperitoneal, numindu-se EGIST, adică tumori stromale extra gastrointestinale [11,12].

În literatura de specialitate sunt menționate și localizări rare cum ar fi ficatul, pancreasul, vezicula biliară, septul vaginal, tractul genito-urinar și vena portă [12,13,14,15,16,17,18,19]. EGIST-urile se dezvoltă fără a avea niciun raport cu peretele organelor tubului digestiv.

Cea mai des întâlnită localizare este stomacul 50-60% din cazuri, urmat de intestinul subțire 20-25%, colon și rect 5%, esofag 2% [4,5,20,21].

Frecvența crescută a localizării acestor tumori la nivelul tractului gastrointestinal este legată direct proporțional de numărul crescut de celule interstițiale Cajal (ICC), prezente în peretele viscerelor digestive, această celulă fiind considerată celula de origine a acestor

tumori. Mult timp aceste tumori din punct de vedere istoric au fost clasificate ca și leiomioame, leiomiosarcoame și au rămas nerecunoscute ca patologie distinctă până la începutul anilor 1980. Un rol deosebit de important în descoperirea lor l-a jucat îmbunătățirea tehnicilor de imunohistochimie, studiile cu microscopul electronic care au permis descoperirea trăsăturilor caracteristice histologice ale acestor tumori. O dată cu identificarea trăsăturilor proprii tumorale aceste tumori care se credeau a fi extrem de rare s-au adeverit a avea o incidență mult mai crescută, crescând numărul de cazuri raportate.

Originea histologică tumorală a fost controversată existând mai multe teorii. Primele teorii susțineau că aceste tumori își au originea în celula musculară netedă, sau în celulele nervoase, deoarece aveau aspect asemănător cu acestea. Altă teorie susținea că originea tumorală ar fi o celulă stem pluripotentă bazându-se pe ideea că aceasta reprezintă originea comuna a celulelor Cajal și a celulelor musculare netede. Legătura dintre Celulele Interstițiale Cajal și GIST s-a realizat numai după 1994, atunci când imunohistochimia a permis elaborarea de rezultate credibile. În prezent în ciuda teoriilor mai sus menționate se consideră că aceste tumori își au originea în celula interstițială Cajal datorită faptului că atât celula tumorală a GIST-ului, cât și celula interstițială prezintă expresie similară a markerilor tumorali CD34 și CD117 [22].

Celula interstițială Cajal a fost descoperită în anul 1893 de către Santiago Ramon y Cajal, histolog spaniol, laureat al premiului Nobel în anul 1906, considerat a fi părintele neurologiei moderne [23,24,25]. Celula interstițială reprezintă un tip particular de celulă caracterizată de localizarea și de natura ei interstițială de a se interpune între alte celule. Similar celulei ICC sunt celulele Leydig, celulele din glanda pineală, ovar și celulele din interstițiul renal. ICC se găsește în peretele organelor tubului digestiv, între terminațiile nervoase și celulele musculare netede din peretele viscerelor. Aceste celule se dezvoltă din celulele mezenchimale și au rolul de a regla și propaga precum și de a media impulsul normal de la neuronii motori enterici la musculatura netedă, producând și influențând peristaltica [26,27].

Funcția lor nu este pe deplin cunoscută și reprezintă un subiect de cercetare. Se pare totuși că aceste celule produc unde cu potențial bioelectric scăzut. Histologic ele conțin câteva elemente contractile spre deosebire de celulele musculare netede și au o proporție mai mare de mitocondrii [28].

Descoperirea celulei de origine precum și a markerilor tumorali specifici pentru celula tumorală GIST, CD34 și CD117 au permis descoperirea și înțelegerea procesului de carcinogeneză în această patologie. Înțelegerea carcinogenezei la rândul ei a permis o supraviețuire substanțială, iar perioada de pauză a bolii recurențiale a crescut datorită introducerii tratamentului țintit cu agenți biologici care în același timp ajută tratamentul chirurgical. Mecanismul carcinogenezei în GIST constă într-o supraexpresie a funcției receptorului tirozinkinazic KIT de pe suprafața membranei celulare rezultând o creștere a proliferării celulare. Mutația c-Kit a fost descrisă în 1998, și consecutiv, metoda moleculară la nivel proteic de identificare a CD117 a devenit indispensabilă pentru diagnostic. Diagnosticul corect al acestor tumori din punct de vedere microscopic a devenit esențial o dată cu introducerea tratamentului țintit pe bază de inhibitori tirozinkinazici. Introducerea în tratamentul oncologic al inhibitorilor de receptori tirozinkinazici imatinib și sunitinib a permis obținerea unor rezultate terapeutice foarte bune care se reflectă atât în creșterea



supraviețuirii precum și în convertirea unor stadii avansate de boală inoperabile în stadii care se pretează pentru tratamentul chirurgical.

Potențialul malign al tumorilor gastrointestinale stromale este variabil și depinde de mărime și de indicele mitotic. În funcție de acești parametrii comportamentul poate fi unul benign sau malign, lucru de care depinde tratamentul oncologic atât cel cu agenți biologici, cât și cel chirurgical mult sau puțin agresiv. De asemenea în urma cercetărilor s-a stabilit că tumorile GIST nu metastazează pe cale limfatică și nu răspund la chimio- și radio- terapia obișnuită, mai mult decât atât s-a descoperit că diseminarea tumorală se face pe cale hematogenă, ficatul și peritoneul fiind localizările cele mai des întâlnite.

Există o entitate particulară denumită GIST familial, la care apar tumori multiple asociate cu hiperpigmentare cutanată. Mai rar GIST se poate asocia cu neurofibromatoză tip I, triada Carney și paragangliome.

Supraviețuirea și dezvoltarea celulară este strict legată de aportul de substanțe nutritive, oxigen, precum și de debarasarea de metaboliți toxici. În mod normal oxigenul poate difuza din capilare la 1,5-2 mm, celulele degenerând când această distanță este mai mare. Acest lucru demonstrează că expansiunea tumorală peste 1 mm este dependentă de neovascularizație. Când vasele sangvine se dezvoltă haotic angiogeneza este patologică și reprezintă suportul pentru dezvoltarea leziunilor canceroase. La început tumorile maligne pot evolua fără neovascularizație, până când o parte din celule capătă fenotip angiogenic, celulele endoteliale dormante intrând într-o fază de creștere rapidă. Fenotipul angiogenic reprezintă supraexprimarea factorilor angiogenici de către celula tumorală. Prin angiogeneză definim procesul de formare al noilor vase sanguine din vase preexistente. Acest proces apare atât în condiții normale, cât și patologice. Spectrul angiogenezei este în adevăr deosebit în tumorile maligne, în care se formează adevărate rețele neregulare de vase imature, cu hiperpermeabilitate, care întreține creșterea tumorală.

Interesul pentru angiogeneză se naște din necesitatea cunoașterii interrelației dintre creșterea și invazia tumorală și neovascularizație. Din această cauză este foarte relevantă posibilitatea cuantificării vaselor sangvine din tumori și din jurul acestora prin metode imunohistochimice. Pe lângă numărul de vase sanguine la un moment dat, este important dacă aceste vase au caracter proliferativ, este important care sunt factorii de creștere care stimulează celulele endoteliale și dacă aceste ținte potențiale pot fi inhibitate medicamentos. Acest deziderat este deja o realitate în unele entități tumorale umane, dar datele referitoare la GIST sunt lacunare sau chiar necunoscute. Angiogeneza este o condiție esențială în creșterea tumorilor maligne [29]. Importanța studiului angiogenezei în GIST are o motivație în plus față de restul tumorilor datorită caracteristicilor acestei patologii. Comportamentul benign sau malign al GIST-ului depinde de mărime și localizare, în strânsă relație cu dezvoltarea vasculară intratumorală [29].

Studiul angiogenezei în GIST este deosebit de important în evaluarea microdensității vasculare, în progresia tumorală, care are drept consecință reducerea supraviețuirii. Deși există publicații asupra angiogenezei asociate GIST, totuși persistă numeroase necunoscute generate în particular de faptul că aceste studii sunt raportări disparate ale unor metode morfologice și în special imunohistochimice la serii relativ mici de pacienți. Cele mai multe publicații abordează un spectru limitat de markeri și nu există în prezent concluzii definite asupra rolului medicației antiangiogenice la pacienții refractari la terapia devenită deja convențională. Este importantă înțelegerea interacțiunilor care au loc în tumoră între celulele

endoteliale, celulele inflamatorii, fibroblaste și celule stromale care se repercutează asupra neovascularizației și metastazării tumorale [30]. Din acest punct de vedere considerăm că abordarea complexă a studiului angiogenezei asociate GIST este nu numai utilă, ci și importantă din rațiuni practice pentru anumite subtipuri de tumori din acest grup.

Așa după cum se observă din datele de mai sus, GIST reprezintă un grup de tumori definit relativ recent, la care persistă încă numeroase necunoscute, pornind de la datele epidemiologice – mai clare doar după 1990, până la cele de biologie moleculară – incomplet caracterizate în prezent. Din aceste puncte de vedere considerăm că subiectul este de mare interes pe de o parte, actualitate pe de altă parte și aplicabilitate practică prin introducerea cât mai rapidă a unei medicații specifice și eficiente.

## MOTIVAȚIE SI OBIECTIVE

Tumorile stromale gastrointestinale au suscitad interes major pentru diferite domenii ale medicinei în general și oncologiei în special. Pe de o parte pentru că au fost relativ recent caracterizate, prin comparație cu alte tipuri de tumori de la nivelul tractului gastrointestinal. Pe de altă parte, pentru faptul că au fost identificate rapid o serie de ținte terapeutice eficiente, iar medicația indicată în prezent este larg acceptată de toate forurile științifice internaționale. Deși nu se află pe primele locuri ca frecvență, GIST nu sunt tumori rare, așa cum am arătat la subcapitolul de epidemiologie. Au fost descrise mai multe subtipuri, având o serie de particularități clinice, evolutive și prognostice. Deși relativ bine caracterizate din punct de vedere molecular, persistă încă unele lacune în domeniu, și în consecință, alternativele terapeutice la anumite subgrupe de bolnavi sunt neclar formulate. Pe de altă parte, majoritatea studiilor publicate până în prezent se adresează aproape exclusiv celei tumorale și prea puține date sunt disponibile despre micromediul în care se dezvoltă tumora și care ar putea avea impact major asupra ratei de proliferare locală și progresie. Aceste elemente ar putea avea rol decisiv în adaptarea strategiei terapeutice și supraviețuirea globală a bolnavilor.

Având în vedere aceste aspecte, am insistat în studiul de față asupra uneia dintre componentele esențiale ale micromediului tumoral, respectiv vascularizația, care menține și stimulează progresia tumorală. Din datele care ne-au stat la dispoziție, publicațiile referitoare la angiogeneza din GIST nu sunt numeroase, dar mai important, este faptul că datele asupra tipurilor de vase sanguine asociate GIST, capacitatea lor proliferativă sau activarea celulelor endoteliale sunt lacunare sau chiar lipsesc. În aceste condiții, caracterizarea profilului molecular al vaselor de neoformație din GIST ar putea reprezenta bazele pentru o nouă țintă terapeutică mai ales la cazurile care nu răspund la medicația deja consacrată.

În cadrul cercetării corespondente acestei teze de doctorat, mi-am propus evaluarea datelor clinico-patologice, a elementelor microscopice de prognostic, confirmarea prin imunohistochimie a diagnosticului de GIST la toate cazurile investigate și evaluarea angiogenezei prin prisma numărului, tipului și caracterului proliferativ și activat endotelial ale vaselor sanguine din aria tumorală și peritumorală a GIST. Așa cum voi arăta mai jos, metodologia a fost de tip molecular la nivel proteic, pornind de la premiza că aceste metode să poată fi aplicate în practică la toate cazurile diagnosticate, și expresia markerilor utilizați să fundamenteze eventuala terapie țintită.

## MATERIAL ȘI METODĂ

Au fost studiați 37 de pacienți cu tumori stromale gastrointestinale, suspectate endoscopic, imagistic și tratate chirurgical. Pentru studiul de față s-a obținut consimțământul scris al bolnavilor și avizul comitetului de etică al facultății și universității. Toate procedurile s-au efectuat în conformitate cu principiile Declarației de la Helsinki și au fost aprobate prin decizia Comisiei de Etică Instituționale nr.94/19.07.2018.

Materialul de studiu microscopic a fost reprezentat de specimene de tumoră prelevate prin excizie chirurgicală. Fragmentele recoltate au avut dimensiunea maximă de 1 cm<sup>3</sup>, după recoltare au fost spălate repetat cu ser fiziologic, apoi imersionate în soluția fixatoare de formalină 10% tamponată la pH 7.2 pentru 24 de ore. Fragmentele fixate au fost incluzionate în parafină după tehnica standardizată în sistem automat, iar din blocurile de parafină au fost efectuate secțiuni seriate cu grosimea de 3 micrometri pentru colorațiile morfologice și imunohistochimice. Toate speciunile incluse în studiu au fost prelucrate primar după aceeași tehnică histologică.

Pentru diagnosticul microscopic, stabilirea tipului și subtipului histopatologic și evaluarea diferențierii, secțiunile au fost colorate cu metode de rutină bazată pe hematoxină și eozină. Pe aceste secțiuni s-a reevaluat tipul celulelor proliferante, precum și particularitățile observate. Secțiunile destinate studiului histochemic au fost supuse inițial deparafinării și hidratării, după care peroxidaza endogenă a fost inhibată în soluția de peroxid de hidrogen 3% timp de 5 minute. Timpul de blocare a peroxidazei endogene a fost precedat de demascarea antigenului, care s-a efectuat cu Bond epitope retrieval solution 2, gata de utilizare (Leica Biosystems, Newcastle Ltd, Newcastle UponTyne NE 12 8EW, UK). Durata demascării antigenului a fost de 20 de minute. Anticorpii primari utilizați în studiul de față sunt redați în tabelul de mai jos. Menționăm aici doar vimentina clona V9, care s-a efectuat în primul rând pentru certificarea fixării și includerii în parafină corecte, având în vedere că este un epitop sensibil. Reacția pozitivă pentru acest anticorp a semnalat corectitudinea procedurilor primare de prelucrare. Sistemul de lucru a fost cel furnizat de Leica Bond Biosystems, Newcastle UponTyne, UK. Pentru vizualizarea produsului final de reacție s-a utilizat Bond Polymer Refine Detection System și Bond Polymer Refine Red Detection System.

Cromogenul utilizat a fost 3, 3 diamino-benzidine dyhydrochloride cu durata de 10 minute, produsul final de reacție fiind colorat în brun. Nuclei au fost colorați în albastru palid cu hematoxină Lillie modificată. Întreaga procedură imunohistochimică a fost efectuată cu Leica Bond- Max (Leica Biosystems, Newcastle uponTyne, UK) autostainer. Metodele de dublă imunocolorare au fost efectuate după aceeași procedură, dar a utilizat doi cromogeni, respectiv diaminobenzidină (brun) și Bond Polymer Refine Red Detection System (roșu). Metodele de dublă imunocolorare au fost necesare pentru a demonstra caracterul imatur al vaselor, capacitatea proliferativă și activarea celulelor endoteliale.

Anticorp	Clonă	Diluție	Semnificație
Vimentină	V9	Ready-to-use	Procesare
CD34	Qbend10	1:100	Endoteliu și celule tumorale GIST
CD117	Monoclonal	Ready-to-use	Celule tumorale GIST și mastocite
Ki67	Monoclonal	Ready-to-use	Celule proliferante
CD31	Monoclonal	1:40	Celule endoteliale
CD105	Monoclonal	Ready-to-use	Celule endoteliale activate
S100	Policlonal	Ready-to-use	Celule Schwann, fibre nervoase

*Tabel 1 . Anticorpii utilizați în studiu*

Tehnica tissue microarray.TMA Grand Master este un sistem automat care permite realizarea de microblocuri de țesut, respectiv prelevarea de mostre de țesuturi în tuburi pentru PCR. Dispune de blocuri recipiente / bloc de parafină fără țesut, și blocuri donoare – adică blocuri cu biopsii din care se va extrage țesut. Cu ajutorul unui burghiu se realizează locusuri receptoare. Preluarea țesutului de la donor și plasarea sa se realizează computerizat. Sistemul are capacitate maximă de 12 blocuri recipiente, 60 de blocuri donoare și 6 casete PCR cu 60 de tuburi și 4 mostre de țesut pentru fiecare tub.

Atât blocul donor, cât și recipientul sunt fotografiate cu o cameră digitală din sistem, pentru exactitatea localizării. În acest fel pot fi alese cu exactitate zonele din care se pot prelua fragmente optime de țesut. În cercetarea de față am preferat fragment cu diametrul de 2 mm, care asigură o suprafață mai mare și evită rezultatele fals negative sau suprainterpretările generate de heterogenitatea GIST. Datele de identificare a cazurilor au fost exportate ca atare prin softul TMA Grand Master (3D Histech, Budapesta, Ungaria).

În figura nr 3.1 este ilustrată o parte din secțiunea histologică ce include 24 cazuri și care sunt identificate prin programul asociat soft-ului TMA. Această modalitate de abordare a studiului este deosebit de utilă, pe de o parte pentru eficiență economică (se utilizează cantități foarte mici de reactivi prin comparație cu alte metode) și se poate realiza o comparație imediată între diferitele cazuri de pe secțiune. Pe preparatele realizate prin TMA am aplicat aceleași metode histochimice care sunt incluse în tabelul 1.

Examinarea și achiziția imaginii s-au efectuat cu microscopul Axiocam 506 color, Zeiss, Jena, Germany. Preparatele standard și cele efectuate pe secțiuni TMA au fost examinate în aceeași manieră, stabilindu-se o corelație între caracterul omogen sau heterogen al secțiunii standard și fragmentul ales pentru TMA.

Evaluare. Densitatea microvasculară (MVD) a fost calculată după metoda Weidner, așa cum a fost publicată în urmă cu peste două decenii. MVD standard a inclus toate vasele sanguine din aria tumorală și peritumorală, indiferent de tipul lor – matur, intermediar sau imatur. MVD specifică a inclus în numărare doar vasele imature și intermediare, singurele care pot fi țintă reală pentru terapia antivasculară. Evaluarea indexului de proliferare Ki67 s-a efectuat cu softul specializat și metoda semiautomată, pusă la punct de Suciș și colab, 2014.[31]

Analiza statistică s-a realizat cu pachetul SPSS17.0, valoarea p mai mic de 0.05 fiind considerate statistic semnificativă.

## Rezultate asupra diagnosticului microscopic convențional

Diagnosticul microscopic convențional s-a efectuat pe secțiuni colorate cu hematoxină-eozină metoda standard. Evaluarea s-a efectuat pe două tipuri de preparate. În primul rând au fost efectuate secțiuni din tot blocul de parafină pentru diagnostic și pentru identificarea zonelor de maxim interes pentru evaluarea moleculară la nivel proteic prin imunohistochimie. În timpul doi am efectuat secțiuni din blocurile TMA după metodologia descrisă mai sus, pentru a valida procedura în scopul aplicării metodelor imunohistochimice. GIST sunt tumori mezenchimale ale tractului gastrointestinal, care prezintă câteva trăsături histopatologice caracteristice, și trei subtipuri majore, respectiv cu celule fusiforme, epiteloide și mixte. GIST-urile de dimensiuni mici se depistează de obicei incidental, majoritatea fiind silențioase și pot ajunge la dimensiuni mari care induc simptome digestive nespecifice. În acest capitol am urmărit în special aspectele histopatologice, având în vedere unele dificultăți, de altfel menționate în literatură, de a încadra formele mixte, în special atunci când insulele de celule epiteloide sunt mici.

Rezultatele noastre confirmă datele din literatură care arată că tumorile fusiforme sunt cele mai frecvente. Noi am obținut rezultate ușor diferite față de cele deja publicate în ceea ce privește tumorile mixte, mai numeroase decât în alte statistici. Acest aspect ar putea fi datorat provenienței din surse diferite a cazurilor selecționate pentru aspectele propuse în lucrare.

Tipul histologic al tumorii nu pare a fi un factor semnificativ de prognostic, în particular, referitor la supraviețuirea globală nu s-au raportat diferențe majore, fiind ușor mai mici pentru forma epiteloidă. Rata mitotică pare să aibă caracter predictiv asupra supraviețuirii, dar se recomandă calcularea acesteia pe baza unui marker de proliferare cu ajutorul unui soft pentru analiza imaginii microscopice. GIST-urile sunt tumori relativ rare, care apar în general la persoane vârstnice. Până în prezent nu au fost publicate studii care să susțină valoarea predictivă a vârstei, aspect pe care îl susțin și observațiile noastre, deși pe un număr relativ redus de cazuri. În fapt, multe dintre dificultățile pe care le întâlnim la pacienții cu GIST sunt legate de statistici mici, sau pe studii multicentrice, dar bazate pe aplicarea subiectivă a unor protocoale comune de evaluare.

## Concluzie

Dintre cele 37 de cazuri selecționate pentru studiul imunohistochimic final și demonstrate a fi GIST, majoritatea sunt cu celule fusiforme și cele mai rare sunt epiteloide pure. Descriem câteva aspecte morfologice particulare, a căror semnificație urmează a fi elucidată în continuare.



*Fig.1 Aspect de ansamblu al proliferării tumorale pe secțiune de tip TMA. Remarcăm caracterul omogen, difuz al tumorii cu rare dilatații vasculare cu stază. Colorație HE*

## Stabilirea diagnosticului de GIST prin studiul imunohistochimic Rezultate asupra expresiei vimentinei și proteinei S100

Vimentina este markerul generic al celulelor de origine mezenchimală și este pozitivă într-o mare varietate de țesuturi conjunctive, musculare și epiteliale de origine mezodermică. Anticorpul anti-vimentină pune în evidență o proteină filamentoasă de citoschelet, care face parte din grupa filamentelor intermediare. Reacția imunohistochimică pentru vimentină are mare sensibilitate, dar specificitate redusă, deoarece este pozitivă într-un spectru larg de celule, așa cum am amintit anterior.

În esență, deși imunoreacția pentru vimentina V9 nu ne-a fost utilă pentru diagnosticul pozitiv și diferențial al cazurilor incluse în studiu, am reușit să selectăm cele 37 de GIST-uri care permit investigații moleculare sensibile la procesare. Testarea reactivității pentru vimentină s-a efectuat pe preparate prelucrate prin tehnica tissue microarray, fragmentele prelevate de la fiecare caz fiind alese pe baza observațiilor morfologice convenționale.



*Fig.2. Preparat efectuat prin tehnica TMA Grand Master. Imunoreacție pentru vimentină, în care se observă aspectul omogen al secțiunilor provenite de la șase cazuri diferite și o secțiune tip control extern al reacției (mărire x4).*

Reacția pentru vimentină cu produs final de reacție omogen sau moderat heterogen a fost pozitivă la 37 dintre cele 42 de cazuri inițiale. Cazurile negative au fost excluse din studiu.

### **Expresia proteinei S100**

Proteina S100 este un marker de mare sensibilitate deosebit de util pentru diagnosticul primar și diferențial al leziunilor derivate din structuri corespondente creștelor neurale. Din acest motiv, este cel mai adesea utilizat pentru diagnosticul tumorilor derivate din nervii periferici, fiind pozitiv pentru celulele Schwann. Astfel, fibrele nervoase incluse sau localizate în vecinătatea leziunilor pot fi considerate cel mai util control intern al reacției. De asemenea, proteina S100 este deosebit de sensibilă pentru tumorile melanocitare, benigne și maligne. În acest caz, sensibilitatea imunoreacției este mare, dar specificitatea este redusă.

De ce am utilizat acest marker în cercetarea de față? Primul și cel mai important scop a fost acela de a exclude leziuni proliferative ale nervilor periferici, care adesea au structură fasciculată, prezintă palisadare, în unele cazuri au variantă epiteloidă. Pentru validarea rezultatelor imunohistochimice, am inclus această metodă chiar de la început, pentru a evita raportare falsă a rezultatelor aferente lotului de pacienți cu GIST. Cele 37 de cazuri selecționate ca lot final au negativ la nivelul celulelor tumorale pentru proteina S100.

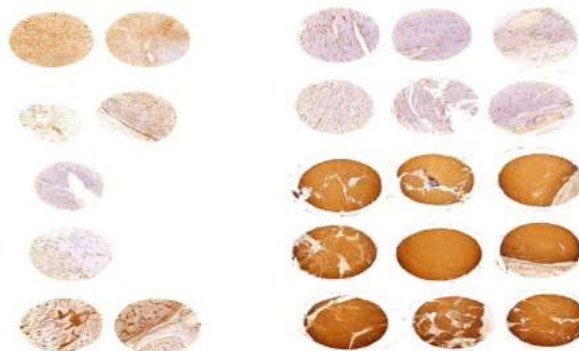


*Fig.3. Imunoreacție negativă pentru proteina S100 în GIST.  
Demonstrarea imunohistochimică a diagnosticului de GIST*

Deși aspectul microscopic pe secțiunile colorate cu hematoxină-eozină este relativ caracteristic la majoritatea cazurilor, se impune confirmarea imunohistochimică din mai multe considerente. Pe de o parte pentru diagnosticul diferențial, având în vedere că multe dintre GIST sunt cu celule fusiforme și în această categorie intră multe alte entități proliferative ale țesuturilor moi. Pe de altă parte din rațiuni terapeutice, terapia țintită având drept condiție obligatorie profilul molecular caracteristic. În acest scop, pe cele 37 de cazuri incluse în final în studiul nostru după procedurile de selecție, am aplicat imunoreacțiile pentru CD34 și CD117, care sunt bine standardizate și deși nu au mare specificitate, combinația de markeri este suficientă pentru certificarea diagnosticului.

**Expresia CD34.** Imunoreacția pentru CD34 a fost pozitivă la toate cazurile incluse în studiu, dar distribuția produsului final de reacție a fost diferită. Intensitatea colorației este diferită deoarece la unele cazuri anti-CD34 a legat doar endoteliul vaselor sanguine și unele celule stromale, iar la alte cazuri (majoritare) imunoreacția a fost pozitivă și în celulele tumorale.

2000  $\mu$ m



*Fig.4. Preparat TMA în care se remarcă diferența de intensitate a colorației la imunoreacție pentru CD34.*



În studiul nostru 29 dintre cele 37 de cazuri au fost pozitive pentru CD34, ceea ce semnaleză sensibilitate destul de mare, deși specificitatea este redusă, deoarece CD34 este exprimat de un spectru larg de celule tumorale diferite histogenetic. La cazurile pozitive am observat o reacție intensă și relativ omogenă în toate celulele tumorale ale aceluiași caz (fig.5.11). Reacția a avut caracter omogen, în particular la cazurile cu celule fusiforme și semnificativ heterogen la cele mixte, în care zonele epiteloidale au fost mai palid colorate.

**Expresia CD117.** CD117 este un marker bine cunoscut ca valoare diagnostică pentru proliferările de tip GIST. Deși nu are specificitate absolută, pozitivarea imunoreacției în contextul unei tumori gastrointestinale are mare valoare confirmativă. De asemenea, corelarea rezultatului imunohistochimic cu aspectul morfologic și expresia CD34 sunt de cele mai multe ori suficiente pentru diagnosticul pozitiv. Reacția imunohistochimică cu anticorpii anti-c-kit este pozitivă la majoritatea cazurilor, procentajele de pozitivare fiind variabile, în funcție de autori și de seriile de bolnavi investigate, respectiv între 80 și 100%. Aceste date conferă reacției mare specificitate și credibilitate. Date relativ recente precizează că CD117 are sensibilitate crescută prin comparație cu toți ceilalți markeri, inclusiv DOG-1. Din aceste motive am introdus ca obligatorie pentru confirmarea diagnostică a imunoreacției pentru CD117 la toate cazurile incluse în studiul de față.

Reacția pozitivă pentru CD117 a fost în toate cazurile intensă în celulele țintă și nu se impune scorificarea din punct de vedere al intensității reacției. Astfel încât rezultatele noastre au fost raportate ca pozitiv și negativ. La nivelul tubului digestiv spectrul structurilor normale pozitive este limitat la celulele interstițiale Cajal din plexurile nervoase submucos și muscular, și la mastocitele din țesutul conjunctiv normal sau asociat proliferării neoplazice. Toate cazurile selecționate pe baza morfologiei și imunoreacției pentru CD34 au fost pozitive pentru CD117 la nivelul celulelor tumorale. Produsul final de reacție a fost localizat citoplasmatic difuz, fără intensificare membranară. Reacția a fost omogenă în majoritatea cazurilor și nu am constatat celule tumorale sau grupuri de celule tumorale negative.



*Fig.5. Reacția imunohistochimică pentru CD117, preparat de TMA. Se remarcă dispoziția omogenă a produsului final de reacție în celulele tumorale, ariile de stromă tumorală fiind negative.*

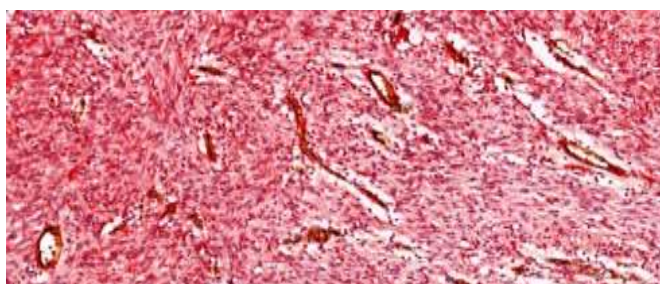
În concluzia acestui subcapitol, reacția imunohistochimică pentru CD117 este esențială pentru precizarea diagnosticului de GIST, corelată cu aspectele clinice și morfologice convenționale. Considerăm că este chiar obligatorie, mai ales prin prisma strategiei terapeutice.

## Evaluarea angiogenezei in GIST

### Evaluarea tipurilor de vase sanguine asociate GIST

Vasele sanguine sunt esențiale pentru dezvoltarea, progresia și metastazarea tumorilor maligne, aspect demonstrat atât prin studii clinico-patologice, cât și experimentale. Pentru o lungă perioadă de timp s-a considerat că vasele intratumorale reprezintă elemente preexistente care au fost incluse în proliferarea tumorală. La finele secolului trecut s-a demonstrat că celulele tumorale emit semnale care stimulează formarea de noi vase sanguine din cele preexistente, proces care poartă numele de angiogeneză.

Angiogeneza asociată tumorilor maligne are importanță majoră, deși procesul se regăsește și în alte leziuni umane. Majoră, pentru că în absența vascularizației nici o tumoră nu crește peste 3 mm în diametru. Un alt aspect important este faptul că inhibiția sau distrucția vaselor nou-formate are drept consecință stoparea proliferării tumorale, sau cel puțin, în cea mai mare parte. Astfel s-a născut conceptul de angiogeneză tumorală și anti-angiogeneză, care pe de o parte se referă la capacitatea celulelor tumorale de a secreta factori de creștere care stimulează proliferarea celulelor endoteliale, urmată de asamblarea vaselor de neoformație. Pe de altă parte, medicația antiangiogenică este deja acceptată pentru aplicarea clinică într-o varietate destul de largă de tumori, deși rezultatele de laborator nu au fost întotdeauna pe măsura așteptărilor o dată aplicate în practica medicală. Dacă factorii de creștere și receptorii specifici au fost intens studiați în angiogeneză și exploatați în strategia terapiei antiangiogenice, mult mai puține sunt datele disponibile asupra profilului vaselor asociate tumorilor și a terapiei antivascularare. Primele date în acest sens ne parvin tot de la Judah Folkman, care a descoperit angiostatinul și endostatinul. Având în vedere aceste aspecte, ne-am propus evaluarea vascularizației asociate GIST prin prisma morfologiei, densității vasculare și structurii peretelui vaselor de neoformație. În acest scop am aplicat imunoreacțiile pentru CD34, amintit în capitolul anterior ca marker diagnostic confirmativ, CD31 și actina de tip mușchi neted. Am abordat studiul în această manieră din mai multe motive. Pe de o parte reacția anti-CD34 poate fi utilă pentru studiul morfologic al vaselor asociate sau nu tumorii doar la cazurile la care celulele tumorale sunt negative pentru acest marker. La cazurile CD34-pozitive vasele sanguine sunt mascate în majoritate de către reacția intensă de la nivelul celulelor tumorale. Imunocolorarea dublă CD31-actină mușchi neted (Act) este mult mai utilă și fiabilă, deoarece combină un marker al celulei endoteliale cu un marker al celulelor perivascularare. CD31 are specificitate mult mai mare pentru celulele endoteliale decât CD34 și nu colorează celulele tumorale ale GIST.



*Fig.6.Dublă imunoreacție pentru CD34 (brun) și Actină mușchi neted (roșu), x200/ Vas mature și imature*

Pe secțiunile colorate prin dublă reacție anti-CD34-anti-Act am putut face diferența dintre tipurile de vase asociate tumorii. Pe preparatele noastre CD34 a fost vizualizat în brun, iar produsul final de reacție pentru Act a fost colorat în roșu. Astfel, am observat mai rar vase mature, care prezintă lumen permeabil cu sau fără conținut, celule perivasculare prezente, deci coexpresie de CD34 și Act.

Vasele de tip intermediar cu traiect neregulat, peretele foarte subțire, lumenul este evident pe secțiunile microscopice. Aceste vase sunt instabile morfologic, deoarece nu prezintă celule perivasculare, iar imunohistochimic sunt pozitive pentru CD34 și negative pentru Act. Vasele imature, cunoscute și sub numele de muguri vasculari datorită incidenței în care au fost surprinse au fost cele mai numeroase la cazurile investigate de noi. Aceste vase sunt de fapt cordoane de celule endoteliale, fără lumen, fără celule perivasculare, cu mare capacitate de proliferare.

Pe baza acestor rezultate, susținem că vasele sanguine imature și intermediare din aria tumorală reprezintă o țintă atractivă pentru medicația antivasculară, iar evaluarea în special a vaselor imature ar putea fi un indicator important pentru aprecierea eficienței terapiei antiangiogenice și antivasculare.

### **Evaluarea ratei de proliferare a endoteliului vaselor de neoformație**

Așa cum am arătat în capitolul precedent, vasele sanguine asociate GIST au morfologie particulară, sunt diferite de vasele normale și majoritare sunt cele intermediare și imature. La ambele, celulele endoteliale au capacitate proliferativă crescută. În condiții normale, celulele endoteliale au ciclul de viață de lungă durată, de ordinul anilor, și din acest motiv, diviziunile se observă doar excepțional și nu sunt surprinse pe secțiunile histologice. În cazul în care endoteliul este activat, așa cum se întâmplă la vasele care apar prin angiogeneză, proliferarea endotelială devine evidentă, în particular la vasele de tip imatur, și mai ales la celulele "lider" (tip cells) care determină direcționarea și poziționarea viitoarelor vase și a colateralelor lor.

În acest capitol al tezei mi-am propus să evaluez rata de proliferare a celulelor endoteliale la tumorile incluse în studiu, pe de o parte pentru a caracteriza profilul lor angiogenic, și pe de altă parte de a încerca să stabilim dacă au sau nu valoare prognostică.

### **Precizări metodologice.**

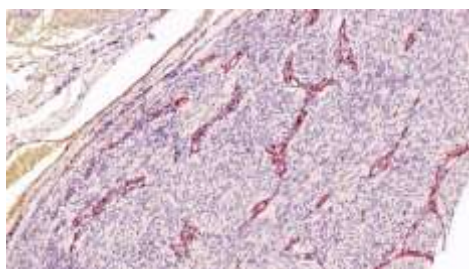
Proliferarea endotelială poate fi studiată cu mai multe metode in vitro, dar noi am fost interesați de evoluția neovaselor pe speciemenle umane de GIST. De aceea am ales un marker vascular de mare specificitate pentru celulele endoteliale, respectiv CD31. Nu am utilizat CD34, deoarece acest marker colorează multe cazuri de GIST și maschează în majoritatea cazurilor vasele sanguine. Pentru proliferarea celulelor endoteliale am utilizat markerul Ki67, cel mai des utilizat în acest scop de majoritatea autorilor. Am luat în considerare în interpretare doar coexprimarea CD31 și Ki67, adică doar celulele endoteliale cu nuclei aflați în mitoză sau faza postmitotică. Limitele studiului sunt legate în special de GIST cu rată mare de proliferare, la care teoretic, celulele endoteliale proliferante ar putea fi confundate cu cele tumorale.

## Rezultate

Dubla imunocolorare cu anti CD31/anti-Ki67 semnaleză prezența vaselor sanguine în roșu și a nucleilor de celule proliferante în brun. CD31 a colorat numai citoplasma celulelor endoteliale, și nu a fost pozitivă pentru celulele stromale sau alte elemente ale stromei tumorale. În țesutul muscular neted care formează musculatura proprie, aflat la distanță de proliferarea tumorală, vasele sanguine au fost colorate în roșu la nivel endotelial, iar celulele endoteliale nu s-au colorat pentru Ki67, ceea ce denotă durată lungă de viață a acestor celule.

Toate vasele sanguine au fost pozitive pentru CD31, dar numai cele intratumorale au prezentat celule endoteliale pozitive pentru Ki67. Vasele peritumorale nu au prezentat celule endoteliale proliferative la niciunul dintre cazurile studiate.

Vasele sanguine din aria tumorală au traiect neregulat, cu ramificații multiple, dar dispuse la intervale relativ regulate evidențiate la obiectiv mic cu CD31 în roșu. Majoritatea sunt vase imature la care lumenul se distinge cu dificultate sau deloc, fiind dispuse sub formă de cordoane de celule endoteliale. Vasele de tip intermediar au lumen vizibil cu sau fără elemente figurate sanguine, celulele endoteliale nefiind dublate de un strat continuu de celule perivasculare. La obiectiv mare se constată că vasele de dimensiuni mici prezintă celule endoteliale cu nuclei colorați în brun pentru Ki67, ceea ce marchează caracterul lor proliferativ.



*Fig.7. Dublă imunocolorare CD31/Ki67. Vase cu traiect neregulat și multiple ramificații*

Am remarcat faptul că la tumorile cu rată mare de proliferare celulele endoteliale proliferază puțin sau deloc. La aceste cazuri relația de inversă proporționalitate dintre proliferarea celulelor tumorale și endoteliale este evidentă. Presupunem că acest aspect este consecința caracterului asincron dintre proliferarea tumorală și secreția de factori angiogenici. La cazurile studiate de noi, aspectele imunohistochimice obținute pledează pentru dezvoltarea de noi vase după câștigarea fenotipului malign. Invers, GIST cu rată redusă de proliferare au prezentat constant celule endoteliale pozitive pentru Ki67 la toate cazurile. În unele zone indexul mitotic al celulelor endoteliale a fost mai mare decât al celulelor tumorale. Considerăm că aceste aspecte, pe care nu le-am găsit semnalate în literatura de specialitate, reprezintă o contribuție originală la cunoașterea interrelației dintre celulele tumorale și angiogeneza tumorală din GIST. Vasele imature, fără lumen, au celule lider neproliferante, asociate cu celulele imediat următoare pozitive pentru Ki67, aspect care confirmă una dintre observațiile din literatură. În literatura românească este prima demonstrare a distribuției celulelor endoteliale de-a lungul vasului de neoformație pe baza capacității lor proliferative.

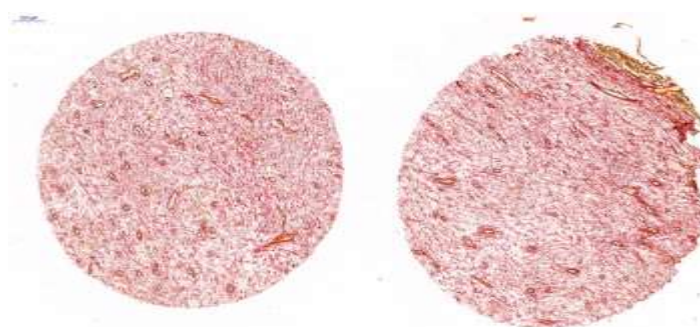
## **Activarea celulelor endoteliale: moment esențial în dezvoltarea vascularizației asociate GIST**

Nu sunt cunoscuți markeri care să indice trecerea de la stadiu neproliferativ la cel proliferativ al celulelor endoteliale, aspectul prezentând nu numai interes din punct de vedere al biologiei endoteliului, ci și practic, pentru că ipotetic, se corelează cu achiziția unui fenotip tumoral cu agresivitate crescută. Din aceste motive ne-am propus să evaluăm unul dintre puținii indicatori cunoscuți ai activării celulelor endoteliale, respectiv endoglinea (CD105), dar în corelație cu tipul matur intermediar sau imatur de vas sanguin. În acest scop am aplicat dubla imunocolorație pentru CD105 și actina de tip mușchi neted, așa cum am descris metoda la capitolul de material și metode. Expresia endoglinei are intensitate semnificativ mai mare în celulele endoteliale cu potențial proliferativ, motiv pentru care este considerată marker util pentru studiul angiogenezei. Celulele endoteliale din vasele sanguine asociate tumorilor au caracter proliferativ semnificativ mai mare decât cele din țesuturile normale, dar datele referitoare la expresia acestui marker în relație cu tipul histopatologic al GIST și tipul de vas intratumoral nu au fost investigate și raportate până în prezent. Considerăm că o astfel de evaluare este necesară, pentru că CD105 poate reprezenta o țintă terapeutică atractivă, mai ales că până în prezent nu există trialuri clinice în acest sens.

Am aplicat metode de dublă colorare imunohistochimică, bazată pe markerul endotelial CD107, al cărui produs final de reacție a fost vizualizat în brun, și actina de tip mușchi neted, al cărei produs final de reacție a fost vizualizat în roșu. În acest fel am putut cuantifica expresia endoglinei în funcție de tipul de vas din aria tumorală.

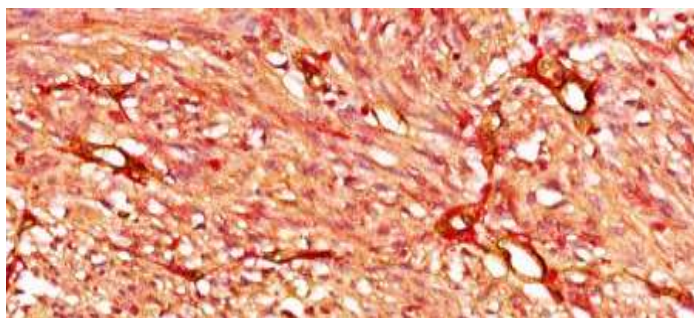
### **Rezultate**

Imunoreacția a fost pozitivă la toate cazurile, dar intensitatea a fost diferită, în particular din cauza componentei colorate pentru actina de tip mușchi neted.



*Fig.8. Preparate de tissue microarray, colorate cu dublă imunoreacție pentru endoglină și actină. Endoteliul este colorat în brun și componenta actin-positivă în roșu. Ob x4.*

La majoritatea cazurilor de GIST cu celule fusiforme am remarcat o reacție intensă a actinei de tip mușchi neted. La aceste cazuri a fost uneori dificil să observăm vasele sanguine în ciuda contrastului puternic între cei doi agenți de vizualizare. La aceste cazuri MVD a avut valori mai mici, dar majoritatea vaselor au fost de tip imatur și intermediar, așa cum se observă. La majoritatea cazurilor, vasele sanguine au fost reprezentate de o mixtură de vase mature, imature și intermediare. Un aspect particular l-am observat la un singur caz de GIST cu celule epiteloid, la care toate vasele din aria tumorală au fost imature, iar elementele actin-pozitive au fost rare, intens colorate, incluse în stroma tumorală.



*Figura 9. GIST cu mixtură de vase sanguine mature, intermediare și imature. X400*

Endoglin/CD105 este un marker fidel al activării celulelor endoteliale. Cu cea mai mare probabilitate, activarea pe calea de semnalizare a TGF beta precede proliferarea demonstrată prin reacția pozitivă cu Ki67. Observațiile noastre pledează pentru utilizarea acestui marker în evaluarea prognosticului pe termen mediu și lung, și pentru utilizarea sa ca țintă terapeutică.

## CONCLUZII GENERALE

Tumorile GIST reprezintă o patologie rară și relativ tânără, cu un spectru al comportamentului oscilant de la benign la malign, cu strategii de tratament în continuă dezvoltare în funcție de caracteristicile ultrastructurale și imunofenotipice .

Cel mai important rol în stabilirea diagnosticului pozitiv de GIST și a diagnosticului diferențial, aparține testelor de imunohistochimie cu markeri tumorali specifici , având un rol determinant în elaborarea ulterioară a managementului oncologic , ce conține tratamentul medicamentos cu agenți biologici țintiți și pe cel chirurgical, precum și stabilirea succesiunii lor.

Angiogeneza este o condiție esențială în creșterea tumorilor maligne , comportamentul benign sau malign al GIST-ului depinzând de mărime și localizare, în strânsă relație cu dezvoltarea vasculară intratumorală.

Vasele sanguine imature și intermediare din aria tumorală reprezintă o țintă atractivă pentru medicația antivasculară în GIST -uri, iar evaluarea în special a vaselor imature ar putea fi un indicator important pentru aprecierea eficienței terapiei antiangiogenice și antivascularare.

Evaluarea ratei de proliferare a celulelor endoteliale din aria tumorală a GIST-ului are nu numai valoare prognostică, dar poate reprezenta un indicator util pentru terapia antivasculară la pacienții care nu răspund la terapia deja consacrată. Relația de inversă proporționalitate dintre proliferarea celulelor tumorale și celulele endoteliale este consecința caracterului asincron dintre proliferarea tumorală și secreția de factori angiogenici. Vasele imature au celule lider neproliferante ,urmate de celule imediat următoare pozitive pentru Ki67, confirmând distribuția pe baza capacității proliferative.

Endoglină/CD105 este un marker fidel al activării celulelor endoteliale. Observațiile noastre pledează pentru utilizarea acestui marker pentru evaluarea prognosticului și pentru utilizarea sa ca țintă terapeutică.

## CONTRIBUȚIA INOVATIVĂ A TEZEI ȘI ORIGINALITATEA

Originalitatea acestei teze constă în demonstrarea importanței studiului angiogenezei în GIST, pentru a înțelege și a cunoaște interrelația dintre creșterea și invazia tumorală și neovascularizație.

Importanța studiului angiogenezei în această patologie are o motivație în plus datorită comportamentului aparte al acestui tip de tumoră, benign sau malign, în funcție de mărime și localizare, în strânsă corelație cu dezvoltarea vasculară intratumorală.

Fiind o patologie relativ tânără este foarte important să descoperim procesele, interacțiunile care au loc în tumoră și care se repercută apoi asupra vascularizației și metastazării.

Abordarea complexă a studiului angiogenezei asociat GIST este o contribuție utilă și importantă din rațiuni practice pentru anumite subtipuri de tumori din acest grup, subiectul fiind de mare interes, pentru că permite introducerea rapidă a unor linii de medicație specifică, cu îmbunătățirea prognosticului acestor pacienți.

Aspectele imunohistochimice obținute, la cazurile studiate în teză, pledează pentru dezvoltarea de noi vase după câștigarea fenotipului malign, fapt ce reprezintă o contribuție originală la cunoașterea interrelației dintre celulele tumorale și angiogeneza în GIST.

Descrierea distribuției celulelor endoteliale în funcție de capacitatea lor proliferativă în vasele de neoformație, imature din tumorile GIST studiate reprezintă o premieră în literatura de specialitate românească.

În România nu s-au efectuat studii despre angiogeneza în GIST. Cercetarea de față deschide perspective și în alte abordări canceroase. Rezultatele noastre vor fi îmbogățite prin creșterea numărului de piese de rezecție, obținute de la un număr mai mare de pacienți care vor fi diagnosticați corect cu GIST.



## BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Tumors stromales gastro-intestinales Novartis, Oncologie, 2003.
2. Trupiano K. Jaqueline, Stewart R. , Misick Caroline et al. , Gastric stromal tumours. A clinicopathologic study on 77 cases with correlation of features with nonaggressive and aggressive clinical behaviours. *The American Journal of Surgical Pathology*, 2002, 2616, p. 705-714.
3. Liegl-Atzwanger B., Fletcher CDM (2010) Gastrointestinal stromal tumours, *Virchows Arch* 456:111-127
4. Corless CL, Fletcher JA, Heinrich MC: Biology of gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* 22:3813, 2004
5. Tran T, Davila JA, El-Serag HB: The epidemiology of malignant gastrointestinal stromal tumors: An analysis of 1,458 cases from 1992 to 2000. *Am J Gastroenterol* 100:162, 2005
6. Agaimy A., Wunsch PH, Hofstaedter F et al (2007) Minute gastric sclerosing stromal tumors (GIST tumorlets) are common in adults and frequently show c-KIT mutations. *Am J Surg Pathol* 31:113-120
7. Agaimy A., Wunsch PH, Dirnhofer S et al (2008) Microscopic gastrointestinal stromal tumors in esophageal and intestinal surgical resection specimens: a clinicopathologic, immunohistochemical and molecular study of 19 lesions. *Am J Surg Pathol* 32:1553-1559
8. Corless CL, McGreevey L, Haley A et al, KIT mutations are common in incidental gastrointestinal stromal tumors one centimetre or less in size. *Am J Surg Pathol* 160:1567-1572
9. Miettinen M, Sarmola PM, Sorin H et al, Gastrointestinal stromal tumours and leiomyosarcomes in the colon. *Am J Surg Pathol*, 2000, 24, 10, p 1339-1352
10. Miettinen M, Lasota J, Gastrointestinal stromal tumors- definition, clinical, histological, immunohistochemical and molecular genetic features and differential diagnosis. *Virchows Archiv*, 2001, 438, 1, p 1-12
11. Miettinen M, Monihan JM, Sarlomo-Rikala M et al (1999) Gastrointestinal stromal tumors/smooth muscle tumors (GISTs) primary in the omentum and mesentery clinicopathologic and immunohistochemical study of 26 cases. *Am J Surg Pathol* 23: 1109-1118
12. Miettinen M, Sobin LH, Lasota J (2009) Gastrointestinal stromal tumors presenting as omental masses-a clinicopathologic analysis of 95 cases. *Am J Surg Pathol* 2009:1267-1275
13. Mendoza-Marin M, Hoang MP, Albores-Saavadra J (2002) Malignant stromal tumor of gallbladder with interstitial cells of Cajal phenotype. *Arch Pathol Lab Med* 126:481-483
14. Al-Daraji WI, Makhlof HR, Miettinen M et al (2009) Primary gallbladder sarcoma: a clinicopathologic study of 15 cases, heterogeneous sarcomas with poor outcome, except pediatric botryoid rhabdomyosarcoma. *Am J Surg Pathol* 32:826-834
15. Hu X, Forster J, Damjanov I (2003) Primary malignant gastrointestinal stromal tumor of the liver. *Arch Pathol Lab Med* 127:1606-1608
16. Yamamoto H, Miyamoto Y, Nishihara Y et al (2010) Primary gastrointestinal stromal tumor of the liver with PDGFRA gene mutation. *Hum Pathol* 41:605-609

17. Padhi S, Kongara R, Uppin SG et al (2010) Extragastrointestinal stromal tumor arising in the pancreas: a case report with a review of the literature. *JOP* 11:244-248
18. Molina I, Seamon LG, Copeland LJ et al (2009) Reclassification of leiomyosarcoma as an extra-gastrointestinal stromal tumor of the gynecologic tract. *Int J Gynecol Pathol* 28:458-463
19. Long KB, Butrynski JE, Blank SD et al (2010) Primary extragastrointestinal stromal tumor of the pleura: report of a unique case with genetic confirmation. *Am J Surg Pathol* 34: 907-912
20. Judson I: Gastrointestinal stromal tumours (GIST): Biology and treatment. *Ann Oncol* 13:287, 2002
21. Joensuu H: Gastrointestinal stromal tumor (GIST). *Ann Oncol* 17:280, 2006
22. Mostafa RM, Moustafa YM, Hamdy H: Interstitial cells of Cajal, the Maestro in health and disease. *Worlds J Gastroenterol* 16:3239, 2010
23. Sherrington, C. S. (1935). "Santiago Ramon y Cajal. 1852-1934". *Obituary Notices of Fellows of the Royal Society*. 1 (4): 424–441. doi:10.1098/rsbm.1935.0007.
24. Santiago Ramón y Cajal, *Recuerdos de mi Vida*, Madrid Imprenta y Librería de N. Moya, Madrid 1917, Volume I, Chapter X
25. Nobel lectures, Physiology or Medicine 1901-1921. Amsterdam: Elsevier Publishing Company. 1967. Retrieved 2013-01-29.
26. "FANZCA part I notes on the Autonomic Nervous System". *Anaesthetist.com*. Retrieved 2015-03-15.
27. "History of Neuroscience". *Society for Neuroscience*. Retrieved 2008-10-09.
28. Hennig GW, Spencer NJ, Jokela-Willis S, Bayguinov PO, Lee HT, Ritchie LA, Ward SM, Smith TK, Sanders KM (May 2010). "ICC-MY coordinate smooth muscle electrical and mechanical activity in the murine small intestine". *Neurogastroenterol. Motil.* 22 (5): e138–51. PMC 2856807 PMID 20059699. doi:10.1111/j.1365-2982.2009.01448.x
29. Folkman, J. tumor angiogenesis: therapeutic implications, *New Engl. J. Med.* 1971, 285, 1182-1186.
30. Ferrara, N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J. Mol. Med.* 1999, 77, 527-543.
31. Suciú C, Muresan A, Cornea R, Suciú O, Dema A, Raica M. Semi-automated evaluation of Ki-67 index in invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncol Lett.* 2014;7(1):107-11



