



***Università degli Studi di Palermo***

Facoltà di Medicina e Chirurgia

---

**Dottorato di Ricerca in Oncopatologia Cellulare e Molecolare Clinica**

**(SSD Med 06)**

**XXIV Ciclo**

**Coordinatore: *Prof. E. Fiorentino***

---

## **I Tumori Stromali Gastrointestinali: dalla biologia alla clinica**

*Tesi di:*

***Dr.ssa Lorena Incorvaia***

*Tutor*

***Prof. A. Russo***

*Coordinatore del Dottorato:*

***Prof. E. Fiorentino***

# INTRODUZIONE

I GIST (gastro-intestinal stromal tumours) sono i tumori del tratto gastrointestinale di derivazione mesenchimale più frequenti (80%) e rappresentano il 5% di tutti i sarcomi [1-2].

Essi sono più spesso localizzati nello stomaco (50%) e nel piccolo intestino (25%), ma possono insorgere in qualsiasi sede del tratto gastroenterico ed occasionalmente nel peritoneo o nell'omento [3].

Grazie al progresso della ricerca scientifica degli ultimi trenta anni e alle nuove acquisizioni ottenute in campo istopatologico e biomolecolare i GIST costituiscono adesso un'entità nosografica indipendente [4].

Nel 1998 Hirota e colleghi dimostrarono che la maggior parte dei GIST mostrano una mutazione attivante il proto-oncogene KIT in oncogene, con conseguente innesco della cascata di eventi che portano alla trasformazione neoplastica del tessuto di partenza.

Inoltre gli stessi autori evidenziarono che le cellule interstiziali di Cajal risultavano positive all'immunoistochimica sia per CD34 che per KIT, ipotizzando la possibile origine dei GIST dalla trasformazione neoplastica delle cellule interstiziali di Cajal (ICC) [5].

Tuttavia alcuni GIST insorgono nel mesentere e nell'omento, strutture prive di ICC. Questo dato ha fatto quindi supporre che il processo di trasformazione neoplastica derivi probabilmente dal blocco della differenziazione di cellule staminali multipotenti progenitrici della linea cellulare delle ICC [6].

In più del 90% dei casi di GIST è presente una mutazione "gain of function" del protooncogene KIT, che produce un'attivazione costitutiva ligando-indipendente del recettore e della sua downstream, con conseguente perdita del controllo del ciclo cellulare e resistenza all'apoptosi [5].

Circa il 10% dei GIST non esprimono il recettore, tanto da essere definiti WT (wild type).

Nel 2003 Heinrich et al dimostrarono che parte di questi casi WT presentavano una mutazione a carico della catena  $\alpha$  del platelet derived growth factor receptor  $\alpha$  (PDGFR $\alpha$ ), in grado di indurre un'attivazione ligando-indipendente dei pathways STAT3 e PI3K [7]. Circa il 5–10% dei GIST presenta infatti una mutazione a carico del PDGFR $\alpha$ , mentre il 9-15% sono realmente KIT- e PDGFR $\alpha$ - e per questo motivo sono denominati WT [8].

I GIST sono neoplasie scarsamente responsive alla chemioterapia convenzionale. Nel 2001 l'introduzione in commercio di Imatinib mesilato ha completamente cambiato la storia naturale dei GIST ed ancora oggi costituisce il gold standard per la malattia avanzata [9].

Sunitinib e più recentemente altri inibitori tirosin-kinasici, come Regorafenib, sono stati testati in pazienti con GIST resistenti ad Imatinib e sunitinib con risultati molto importanti [10].

## **EPIDEMIOLOGIA**

I GIST sono neoplasie rare e costituiscono solo l'1% dei tumori primitivi del GI [11]. Tuttavia la reale incidenza dei GIST rimane ancora sconosciuta. Dati recenti infatti suggeriscono che l'incidenza possa essere maggiore rispetto a quella stimata.

In una casistica Giapponese infatti su 100 resecati gastrici per neoplasia gastrica, 35 presentavano un micro GIST [12]. L'incidenza dei GIST potrebbe quindi essere sottostimata, perché diversi pazienti possono presentano dei micro GIST clinicamente silenti.

I GIST colpiscono indifferentemente entrambi i sessi, con una lieve prevalenza nel sesso maschile. Comunemente insorgono in età adulta, con età media di 60 anni, raramente colpiscono individui di età inferiore ai 40 o di età pediatrica.

In due studi europei di popolazione l'età media di insorgenza è 66-69 anni [13-14]. Circa la metà dei pazienti con GIST si presenta alla diagnosi con metastasi, che nei 2/3 dei casi interessano il fegato. L'interessamento linfonodale è estremamente raro, tanto che può essere evitata la linfadenectomia di principio, limitandosi all'exeresi dei linfonodi sospetti all'esplorazione chirurgica.

La localizzazione più frequente dei GIST è lo stomaco (40-70%) seguita dal piccolo intestino (20-40%); solo il 5-15% si localizza nel colon/retto ed il 5% nell'esofago, nell'omento e raramente nel mesentere e nel retroperitoneo.

Sebbene la maggior parte di GIST siano sporadici, sono state identificate alcune famiglie con mutazioni ereditarie per il gene KIT [15]. Queste famiglie hanno una predisposizione per GIST gastrici multipli, e in alcuni casi iperpigmentazione cutanea, disfagia, GI autonomic nerve tumours e paragangliomi. Pazienti con neurofibromatosi di tipo 1 (NF1) hanno un rischio più elevato rispetto alla popolazione generale di essere affetti da GIST multipli e localizzati nel

piccolo intestino (>70%). I GIST insorti in pazienti con NF1 sono fenotipicamente WT per KIT e PDGFR  $\alpha$  e non presentano mutazioni a carico del gene che codifica per la succinato deidrogenasi (SDH) [16]. I GIST in età pediatrica sono rari, e si presentano nel contesto di sindromi. La sindrome di Carney–Stratakis è caratterizzata da GIST WT e paragangliomi in bambini, che hanno mutazioni del gene che codifica per una sub-unità dell'enzima SDH. La triade di Carney è una sindrome pediatrica caratterizzata dalla presenza di GIST WT, paragangliomi e condromi polmonari in assenza di mutazioni a carico del gene che codifica per la SDH [17-18].

## **ANATOMIA E BIOLOGIA**

I GIST nel 90% dei casi esprimono il recettore KIT (CD 117). Approssimativamente il 70–80% dei GIST sono anche positivi per CD34, antigene presente anche nelle cellule endoteliali, nei fibroblasti e nelle rispettive neoplasie. Circa il 30% dei GIST, specialmente quelli localizzati nello stomaco e nel tenue, sono anche positivi per “smooth muscle actin” (SMA).

L'espressione della proteina S100 è rara nei GIST ed è presente esclusivamente nel 10% delle forme localizzate nel piccolo intestino. In rari casi (2-10%) i GIST marcano positivamente per desmina, vimentina e cheratina 18 [18]. Un altro marker, di recente riscontro, espresso in modo selettivo nei GIST è DOG1 (Detected On Gist) [19]. L'espressione di DOG1 è di ausilio per la diagnosi differenziale tra i GIST ed altre neoplasie mesenchimali, nelle quali è invece riportata una bassa o assente espressione di questa proteina [20].

KIT, codificato dal proto-oncogene c-KIT, appartiene alla famiglia dei recettori tirosin chinasi di tipo III e presenta strutturalmente delle omologie con il PDGFR, colony stimulating factor-1 receptor (CSF1R), kinase insert domain receptor (KDR o VEGFR-2), e Fms-like tyrosine kinase receptor (FLT3). KIT e PDGFR $\alpha$ , entrambi localizzati sul cromosoma 4q12, hanno un ruolo ben definito nella cancerogenesi dei GIST. KIT è un recettore trans-membrana di 165 KDa (Fig. 1) composto da un dominio extracellulare (EC) con 5 loop Ig-like, una regione trans-membrana, un dominio citoplasmatico con una regione Juxtamembrana (JM), e due domini tirosin-chinasi (TK). Il dominio chinasi prossimale (TK1) funge da ATP

binding region, il dominio distale invece (TK2) contiene un "activation loop" (AL) che stabilizza il recettore dopo la sua attivazione [21-22].

Il ligando naturale di KIT è lo "stem cell factor" (SCF); si tratta di una proteina solubile transmembrana composta da due omodimeri legati tra loro attraverso un ponte di-zolfo [23].

SCF legandosi al dominio EC di KIT induce una omodimerizzazione del recettore, attivazione chinasi e fosforilazione dei residui tirosinici situati nel dominio TK intracitoplasmatico, che condividono un "Src homology motif". Questi eventi determinano una serie di fosforilazioni a cascata che si traducono nell'attivazione di diversi pathways trasduzionali:

1) Phosphatidylinositol-3-kinase (Pi3K) pathway - PI3K è un etero dimerico composto da una sub-unità regolatoria (85 KDa) e una sub-unità catalitica (110 KDa). La sub-unità regolatoria contiene due domini SH2, un dominio SH3 e un dominio ricco in prolina. La sub-unità da 85KDa della PI3K interagisce con il residuo tirosinico Y-721 del recettore KIT, con conseguente attivazione di Akt che fosforila Bad (fattore pro-apoptotico) inattivandolo e promuovendo così la sopravvivenza cellulare [24]. PI3K inoltre porta all'attivazione dei pathways Rac1 e Jun che inducono la proliferazione dei mastociti derivati dal midollo osseo.

2) Src pathway - diverse chinasi appartenenti alla famiglia Src, attivate dai residui tirosinici fosforilati Y568/Y570, portano al reclutamento delle proteine Cbl, che mediano la ubiquitinazione di KIT e la sua degradazione attraverso il proteasoma e/o pathway lisosomiali [25].

3) Ras-Raf- Map kinase pathway - la fosforilazione dei residui tirosinici di KIT porta al reclutamento di numerose proteine adattatrici contenenti domini Sh2 (es: Grb-2, Shc, SHP2) che si complessano da un lato al TKr e dall'altro a Ras. Queste proteine adattatrici consentono la fosforilazione di Ras da parte del TKR e la successiva attivazione di Raf e Map. Questo pathway, attraverso la fosforilazione di altri substrati, promuove l'attivazione del ciclo cellulare.

4) JAK/STAT pathway - l'attivazione di KIT porta alla fosforilazione di JAK2 (membro della famiglia janus kinases) e di STAT1 con conseguente induzione dei meccanismi di proliferazione e differenziazione cellulare.

In circa il 90% dei GIST si osservano mutazioni attivanti gli oncogeni KIT (85%) e PDGFR $\alpha$  (5%), che si traducono nell'attivazione costitutiva dei recettori e delle loro vie del segnale, con conseguente perdita del controllo del ciclo cellulare, proliferazione e resistenza all'apoptosi. La restante parte dei GIST (10%) è wild-type (WT), cioè non esprime alcuna mutazione a carico di KIT o PDGFR $\alpha$ . La maggior parte delle mutazioni a carico di KIT interessano l'esone 11 (66-71%), che codifica per il dominio JM, l'esone 9 (13%) codificante per il dominio EC, l'esone 13 (1-2%) codificante per il KD prossimale, e l'esone 17 (1-3%) codificante per il KD distale e l'AL.

Le mutazioni a carico di PDGFR $\alpha$  possono interessare l'esone 18 (5-6%), l'esone 12 (1-1,5%) e l'esone 14 (0,3%) [25]. Alcuni casi di GIST WT hanno mutazioni a carico del gene che codifica per le sub-unità della SDH. Circa l'85% dei GIST pediatrici sono WT, presentano una mutazione germinale a carico di una sub-unità della SDH e si associano a tumori sindromici.

La prima evidenza definitiva della correlazione tra stato mutazionale di KIT e PDGFR $\alpha$  e risposta a Imatinib, è stata dimostrata nello studio di fase II US-Finnish. Questo studio ha evidenziato una correlazione statisticamente significativa tra risposta terapeutica e stato mutazionale: KIT esone 11 risponde nell'83% dei casi ad imatinib, KIT esone 9 nel 48%, PDGFR $\alpha$ -sensitive nel 67%, PDGFR $\alpha$ -D842V non risponde mai ad imatinib, così come i WT (0%), mentre le mutazioni può rare come quella a carico degli esoni 13 e 17 generalmente rispondono ad Imatinib.

L'analisi per sottogruppi ha mostrato peraltro una event-free-survival e overall survival (OS) più lungo nei pazienti con esone 11 mutato (57.2 mesi), rispetto a quelli con esone 9 (16.6 mesi) e WT (6.8 mesi) [26].

Lo studio EORTC di fase 1 e 2 allo stesso modo ha analizzato la correlazione tra tipo di mutazione e risposta clinica, giungendo alle stesse conclusioni dello studio US-Finnish, eccetto che per un outcome migliore per i pazienti con esone 9 mutato e WT. Lo studio EORTC di fase III ha invece randomizzato 946 pazienti con GIST metastatico, divisi in 2 bracci e sottoposti a dosi differenti di Imatinib, rispettivamente 400 mg e 800 mg/die. Ai pazienti con progressione di malattia durante lo studio è stato concesso di effettuare il crossover per poter ricevere dosi più elevate di Imatinib. Non è emersa alcuna differenza tra i due bracci in termini di response rate (RR) e di OS, nonostante una PFS leggermente migliore a favore del braccio trattato con Imatinib 800 mg. L'analisi per sottogruppi ha mostrato invece che pazienti con esone 9 mutato hanno una peggiore PFS e OS rispetto agli esoni 11, e nessuna differenza significativa se

confrontati con i WT [26]. Infine la metanalisi dei 2 studi precedenti ha dimostrato un lieve incremento, ma statisticamente significativo (4 mesi) della PFS mediana del braccio trattato con Imatinib 800, anche se tende a diminuire dopo 2 anni dall'inizio del trattamento.

I dati più importanti emersi dalla meta-analisi sono:

- 1) Pazienti con esone 11 mutato hanno una RR, PFS, OS (80%, 26, 60 mesi) migliore rispetto ai pazienti con esone 9 mutato (40%, 13, 31 mesi) e ai WT (16, 43 mesi).
- 2) I pazienti con esone 11 mutato e WT non traggono alcun vantaggio se trattati con Imatinib 800 mg rispetto al dosaggio più basso di 400 mg.
- 3) La dose standard di Imatinib giornaliera raccomandata per i pazienti con GIST è 400 mg.
- 4) Pazienti con esone 9 mutato beneficiano di terapia con Imatinib 800 mg in termini di miglioramento del RR, allungamento della PFS, ma non della OS [28].

Nel corso dei follow-up che più del 40% dei pazienti con GIST metastatico vanno comunque in progressione di malattia in corso di trattamento con Imatinib a causa della comparsa di resistenza.

In relazione al tempo comparsa della resistenza, è possibile distinguere una resistenza primaria ed una secondaria. La **resistenza primaria** è quella che si verifica entro 6 mesi dall'inizio del trattamento con Imatinib. Lo studio US-Finnish di fase II riporta che il 14% dei pazienti ha una progressione di malattia entro 3 mesi, mentre il 5% entro 2 mesi; lo studio di fase I-II riporta il 9-13% di resistenza primaria. [29-30]. Esistono diversi meccanismi di resistenza primaria, ma il più importante è rappresentato dallo stato mutazionale di KIT e PDGFR $\alpha$ . Sebbene siano state attestate resistenze primarie per tutti i tipi mutazionali, esse sono più frequenti in pazienti con mutazione a carico di KIT esone 9, PDGFR $\alpha$  e WT [31].

Pazienti con esone 9 mutato presentano comunemente un'alterazione del dominio EC, perdendo così la capacità di inibire la dimerizzazione del recettore. Altre mutazioni a carico dello stesso genotipo alterano la struttura tridimensionale del recettore provocando un impedimento allosterico al legame del farmaco con il dominio catalitico. Alcune mutazioni a carico del PDGFR $\alpha$ , come esone 12 e 14, aumentano la sensibilità a Imatinib, altre invece, come la D842V, conferiscono resistenza, in quanto determina l'attivazione costitutiva della cascata trasduzionale.

Si definisce **resistenza secondaria** quella invece che si verifica dopo una iniziale risposta a Imatinib 400 mg. Questo tipo di resistenza viene distinta in "late resistance" se è acquisita tra i 6 e i 24 mesi, oppure "very late" oltre i 24 mesi.

I meccanismi più frequenti di resistenza tardiva a Imatinib sono rappresentati da:

- 1) Mutazioni secondarie a carico di KI e PDGFR $\alpha$  in aggiunta alle mutazioni iniziali;
- 2) Overespressione di KIT;
- 3) Attivazione di pathways trasduzionali alternative e perdita della espressione di KIT;
- 4) Iperespressione della proteina ABC che interviene nell'espulsione del farmaco dall'interno delle cellule.
- 5) resistenza farmacocinetica: modificazioni del metabolismo di Imatinib influenzano i livelli plasmatici del farmaco e contribuiscono all'insorgenza di early resistance.

Pazienti con concentrazioni di farmaco più elevate hanno infatti un TTP di 30 mesi, nettamente superiore rispetto agli 11 mesi di TTP dei pazienti che presentano concentrazioni plasmatiche di farmaco più basse [32].

## **FATTORI PROGNOSTICI**

Oggi è comunemente accettato che il termine "GIST benigno" non dovrebbe essere mai adoperato per questo tipo di neoplasia, in quanto studi retrospettivi hanno dimostrato che tutti i GIST, anche quelli di piccole dimensioni, sono potenzialmente maligni.

Nel 2002 la consensus conference dell'Institute of Health (NIH) ha proposto di stratificare i pazienti con GIST localizzato in 4 classi di rischio (Tab. 1), utilizzando come determinanti prognostici 2 parametri, cioè le dimensioni del tumore primitivo e la conta mitotica [4].

Nel 2006 Miettinen e Lasota hanno pubblicato la più grande serie di GIST in letteratura (1765 casi di GIST gastrico e 906 intestinale). Essi inoltre hanno validato ed espanso i criteri di stratificazione del rischio delineati dalla consensus del 2002, proponendo come nuovo fattore di rischio la sede del tumore primitivo. Hanno dimostrato infatti che i GIST gastrici hanno una prognosi migliore rispetto ai tumori che insorgono in altre sedi in termini di rischio di ricaduta



di malattia [33]. Il sistema di stratificazione del rischio secondo Miettinen è illustrato nella tabella 2.

La più recente revisione della classificazione proposta da Joensuu nel 2008 ha aggiunto come fattori prognostici addizionali il pattern immunofenotipico, l'emoperitoneo, l'invasione mucosale, necrosi intratumorale e rottura del tumore [34].

## **TRATTAMENTO CHIRURGICO**

La chirurgia con intento radicale (R0) rappresenta l'unica metodica in grado di raggiungere la guarigione quando la malattia è localizzata.

Per tutti i GIST bisogna rispettare alcuni principi chirurgici generali:

- Tutti i GIST > 2cm devono essere resecati.
- La biopsia preoperatoria non è necessaria quando alla TC la lesione è fortemente sospetta per GIST e appare resecabile radicalmente.
- La biopsia è fortemente consigliata per confermare una malattia metastatica di origine dubbia, e in tutti i casi in cui è previsto un trattamento con Imatinib neoadiuvante.
- La linfadenectomia di principio non è necessaria poiché il coinvolgimento linfonodale è estremamente raro.
- La chirurgia laparoscopica dei GIST gastrici è sicura ed efficace, ma dovrebbe essere eseguita esclusivamente da chirurghi con expertise nel management laparoscopico dei tumori [35].

## **TERAPIA ADIUVANTE E NEODIUVANTE**

Una chirurgia R0 è eseguibile nella maggior parte dei GIST, ma solo la metà dei pazienti a cinque anni rimane libera da malattia. I principali fattori prognostici che vengono considerati nella stratificazione del rischio per un eventuale trattamento adiuvante sono: 1) dimensioni del tumore, 2) conta mitotica e 3) sede.

Non esiste tuttavia un chiaro consenso da parte degli esperti per stabilire quale cut-off in termini di percentuale di “risk of recurrence” giustificerebbe un trattamento adiuvante.

Il trial ACOSOG Z9002, studio multicentrico in doppio cieco, ha comparato un trattamento con Imatinib adiuvante per un anno versus la sola chirurgia [36]. 713 pazienti operati radicalmente per GIST localizzato, KIT + e di diametro massimo superiore ai 3 cm, sono stati randomizzati in 2 bracci, di cui uno trattato con Imatinib 400 mg giornaliero e l'altro con placebo. Ad un follow-up mediano di 20 mesi il RFS ad un anno è 98% vs 83% a favore del braccio trattato con Imatinib [36].

L'analisi per sottogruppi ha dimostrato che la RFS è significativamente più lunga nei pazienti affetti da GIST high risk (“relapse rate” 47% vs 19% per placebo e Imatinib rispettivamente) e rischio intermedio (“relapse rate” 14 vs 5% per placebo e Imatinib rispettivamente). Invece non è emersa alcuna differenza per quanto riguarda la overall survival [37]. Alla luce di questi dati, nel 2008 negli USA è stato possibile somministrare Imatinib adiuvante, in pazienti completamente resecati per GIST >3cm, ad elevato rischio di malattia, nonostante rimanessero ancora dei quesiti non risolti, quali durata del trattamento e la tipologia di pazienti che realmente possono trarre un beneficio dal trattamento adiuvante. I pazienti wild type e quelli con mutazione D842V a carico dell'esone 18 di PDGFR $\alpha$  non traggono infatti alcun giovamento da un trattamento adiuvante.

Lo studio scandinavo, più recente e condotto dallo Scandinavian Sarcoma group, ha comparato un trattamento con Imatinib 400 mg giornaliero per 36 mesi vs 2 mesi in pazienti affetti da GIST “high risk” .

Ad un follow-up mediano di 54 mesi, i pazienti arruolati nel braccio di trattamento con Imatinib della durata di durata 3 anni hanno beneficiato di un incremento statisticamente significativo della RFS (66VS 48%,HR 0.48, 95% CI) e dell' overall survival, confermando così l'efficacia del trattamento adiuvante per almeno 3 anni.

La dose standard somministrata in adiuvante in tutti gli studi citati è di 400mg. Anche se non validato da nessun trial clinico, c'è consenso tra gli esperti nell'utilizzo di Imatinib 800 mg per pazienti high risk con GIST esone 9 mutato, alla luce dei dati evidenziati nella malattia metastatica.

Esistono diversi scenari clinici in cui dovrebbe essere considerato un trattamento neoadiuvante con Imatinib. In particolare, nel caso di GIST primitivo non resecabile o di resecabilità borderline e nel caso di un tumore potenzialmente resecabile a fronte di un intervento

demolitivo un trattamento preoperatorio è mandatorio. L'obiettivo del trattamento neoadiuvante è di ridurre le dimensioni del tumore, in modo tale da favorire l'asportazione chirurgica completa e di evitare interventi chirurgici maggiori, che richiederebbero il sacrificio di organi adiacenti alla sede del tumore primitivo. Un singolo studio di fase II condotto da US intergroup è stato completato e sono disponibili i dati preliminari [38].

Il trial multicentrico RTOG 6665 (radiation therapy oncology group), studio prospettico di fase II, ha esaminato 63 pazienti con GIST KIT + >5 cm o recidiva locale, che sono stati trattati con Imatinib neoadiuvante per 8-12 settimane prima della chirurgia. Dopo il trattamento chirurgico, i pazienti hanno continuato la terapia con Imatinib per altri due anni. 30 pazienti sui 52 analizzati hanno un tumore primitivo localmente avanzato e 22 hanno una ripresa di malattia o malattia metastatica. Tra i pazienti con GIST primitivo localmente avanzato solo 2 (7%) mostra una risposta obbiettiva alla terapia neoadiuvante, 25 invece (83%) ha continuato ad avere una malattia stabile. I dati presentati all'ASCO 2011, ottenuti dopo un follow-up mediano di 5,1 anni, riportano una PFS e DSS (disease-specific-survival) rispettivamente del 57% e 77% per i pazienti con tumore primitivo localizzato; una PFS e DSS rispettivamente del 30% e 77% per i pazienti con ripresa di malattia o malattia metastatica [39].

## **TERAPIA MEDICA DEI GIST METASTATICI**

L'Imatinib è il farmaco cardine nel trattamento dei GIST metastatici. In seguito ad un primo report in cui un paziente con GIST rapidamente progressivo aveva risposto in maniera efficace al trattamento di prima linea con Imatinib [40], diversi studi hanno confermato il beneficio clinico ottenuto dalla terapia con Imatinib nei GIST metastatici [41].

Nello studio di fase I, su 35 pazienti con GIST metastatico in trattamento con Imatinib 400 mg, 18 hanno mostrato una risposta parziale, e 11 un lungo periodo di stabilizzazione di malattia [9]. Nello studio di fase II successivo, su 147 pazienti, il 54% ha avuto una risposta radiografica documentata entro 6 mesi dall'inizio della terapia. In questo trial, un subset di pazienti sono lungo sopravvissuti dopo terapia con Imatinib in prima linea.

In una coorte di 56 pazienti che hanno continuato la terapia con Imatinib 400 mg oltre tre anni, 26 (18%) hanno presentato una malattia stabile fino a un follow-up mediano di 9.4 anni [42].

In seguito all'introduzione dell'Imatinib, la sopravvivenza mediana dei pazienti con GIST metastatico è di 18-57 mesi nel trial con il più lungo follow-up [43].

La maggior parte di pazienti che hanno inizialmente beneficiato della terapia con Imatinib, vanno incontro a progressione di malattia, per l'acquisizione di una resistenza secondaria. Il tempo mediano alla progressione è approssimativamente di 2 anni, sebbene in alcune serie è anche più lungo [43-44].

Due studi clinici randomizzati hanno confrontato l'efficacia dell'Imatinib in pazienti con GIST metastatico a due differenti dosaggi, 400 mg vs 800 mg [44-45]. Il trial europeo ha dimostrato un modesto, ma significativo incremento della PFS nel braccio trattato con Imatinib 800 mg, ma questo dato non è accompagnato da un aumento dell'OS [44]. Il trial americano invece non ha dimostrato alcun vantaggio per i pazienti trattati con alte dosi di Imatinib, rispetto alla dose standard, né in termini di PFS né di OS [45]. Entrambi gli studi hanno evidenziato però un incremento di degli effetti collaterali nei pazienti trattati con alte dosi di Imatinib.

La metanalisi, mettendo a confronto i due studi precedenti, è giunta alle seguenti conclusioni [46]:

- in un follow-up mediano di 45mesi, c'è un piccolo vantaggio, ma statisticamente significativo in termini di PFS tra i pazienti trattati con imatinib 800 mg, senza alcuna differenza per quanto concerne l'OS e le response rate

- la presenza di mutazioni a carico di KIT esone 9 è l'unico fattore predittivo significativo di risposta a Imatinib 800 mg.

Il tipo di mutazione in KIT o PDGFR $\alpha$  correla con la risposta clinica a Imatinib [47]. Tutte le isoforme mutanti di KIT sono associate ad una risposta ad Imatinib, mentre solo un subset di PDGFR  $\alpha$  è Imatinib-sensibile. Tra i pazienti con mutazioni a carico di KIT, gli esoni 11 mutati hanno una elevata probabilità di risposta parziale se confrontati con gli esoni 9 o wild-type (84% vs 48% vs 0% rispettivamente). Inoltre i pazienti con esone 11 mutato hanno anche un significativo incremento della PFS (25, 13, 17 mesi rispettivamente) e OS mediana (6, 38, 49 mesi rispettivamente) [48].

In 58 pazienti arruolati dall'EORTC trial che esprimono un esone 9 mutato, e trattati con Imatinib 800 mg, si osserva una miglior PFS (HR 0.39) se comparati con Imatinib 400mg/die, ma nessuna differenza in termini di OS.

Le stesse conclusioni sono state raggiunte in una meta-analisi, dove si evince che i pazienti con esone 9 mutato traggono un maggior beneficio dalla terapia con Imatinib 800mg/die in termini di PFS (a tre anni 25 VS 0% per Imatinib 800 vs 400 mg/die, HR 0.43), ma non di OS [49].

Le linee guida NCCN raccomandano di iniziare Imatinib 400mg/die per i GIST non resecabili o metastatici fino ad evidenza di progressione di malattia [50]. E' fortemente consigliato comunque effettuare l'analisi mutazionale e trattare quindi gli esoni 9 mutati con Imatinib 800 mg/die.

Al contrario delle linee guida NCCN, l'ESMO suggerisce di effettuare l'analisi mutazionale a tutti i GISTs in modo tale da iniziare sin dall'inizio Imatinib 800 mg/die per i GISTs esone 9 mutati.

I GIST con mutazione D842V a carico del gene PDGFR alfa non rispondono invece ad Imatinib e dovrebbero essere inseriti in trials clinici.

Lo studio francese ha dimostrato che Imatinib va continuato senza interruzioni fino a progressione nei pazienti in risposta al trattamento. L'interruzione del trattamento con Imatinib nei GIST metastatici si traduce infatti nella maggior parte dei pazienti in una rapida progressione di malattia. Pertanto oggi tutte le linee guida raccomandano che la terapia di prima linea in un GIST metastatico deve essere assunta giornalmente fino a progressione di malattia; la sospensione temporanea della terapia è giustificata esclusivamente nei casi in cui si riscontrano tossicità gravi da farmaco [51].

Nel caso di progressione in corso di Imatinib 400 mg la prima opzione terapeutica è rappresentata dall'incremento del dosaggio ad 800 mg e questo in genere determina un nuovo controllo di malattia nel 30% dei casi circa. Nel dettaglio nello studio europeo 247 pazienti dei 473 randomizzati sono andati incontro a progressione dopo il trattamento di prima linea Imatinib 400 mg, e 133 pazienti hanno fatto il crossover all'Imatinib 800 mg [42]. I dati ottenuti dopo successivi controlli, dimostrano 3 risposte parziali, 36 pazienti con lungo periodo libero da malattia. Risultati simili sono stati riportati dal trial americano. Su 164 pazienti andati incontro a progressione dopo il trattamento di prima linea, 133 hanno eseguito il crossover con Imatinib 800 mg/die. Tra questi pazienti, circa il 33% presenta risposta obiettiva o malattia stabile. La PFS e l'OS mediana dopo il crossover è di 5 mesi e 19 mesi rispettivamente. La strategia della "dose escalation" non è indicata nei pazienti con resistenza primaria alla terapia che sono andati in progressione entro 2 mesi dall'inizio del trattamento.

Nei pazienti affetti da GIST imatinib-resistenti è indicato l'impiego del Sunitinib. Lo studio registrativo di fase III ha confrontato sunitinib 50 mg/die per 4 settimane seguite da 2 settimane di STOP VS placebo ha mostrato un miglior TTP (27 vs 6 settimane) e un trend a favore di una miglior OS, anche se statisticamente non significativa [52].

Il clinical benefit (risposta parziale o malattia stabile) e la PFS è migliore nel caso di GIST esone 9 mutati (58%) e wild type (56%), rispetto agli esoni 11 mutati (34%). Il TTP mediano per gli esoni 9 mutati e PDGFR $\alpha$  è di 19 mesi, mentre per gli esoni 11 solo 5 mesi. La dose di Sunitinib approvata è di 50 mg/die per 4 settimane e 2 di STOP. Tuttavia la dose giornaliera di 37.5mg sembra allo stesso modo sicura ed efficace [53].

Di recente il **Regorafenib**, un altro inibitore tirosinchinasico, è stato approvato per il trattamento di 3° linea di pazienti affetti da GIST metastatico resistenti ad imatinib e sunitinib [54].

Regorafenib è un nuovo farmaco appartenente alla famiglia dei TKI, in grado di inibire diversi targets quali: KIT, PDGFR, RET, BRAF, CRAF, VEGFR1-3, TIE2 e FGFR.

In studi preclinci, Regorafenib ha mostrato una potente attività antitumorale sia nei confronti dei GIST, che su altri tipi di neoplasie, tipo il carcinoma del colon [55].

Successivamente uno studio di fase I di "dose escalation", ha definitivamente stabilito la sicurezza e la tollerabilità del farmaco. Regorafenib viene somministrato alla dose di 160 mg/die per via orale per tre settimane e il ciclo viene ripetuto ogni 4 settimane. Lo studio di fase II ha invece esaminato l'attività del Regorafenib in pazienti metastatici resistenti ai TKI convenzionali (Imatinib e Sunitinib). Questo studio ha dimostrato che il farmaco poteva avere un impiego promettente nel trattamento di terza linea dei pazienti con GIST metastatici, come si evince dai seguenti dati: controllo di malattia nel 79% dei pazienti, e PFS mediana di 10 mesi.

Nello studio doppio cieco randomizzato di fase III registrativo, Regorafenib è stato confrontato al placebo con un rapporto 2:1 in pazienti affetti da GIST già trattato con Imatinib e Sunitinib. Il farmaco è stato somministrato al dosaggio di 160 mg al giorno per tre settimane seguite da una settimana di STOP. L'endpoint primario dello studio era la PFS, mentre endpoints secondari erano OS, TTP, overall response rate, disease control rate, duration of response.

Lo studio è stato interrotto prima del termine previsto in modo tale da dare la possibilità ai pazienti randomizzati nel braccio placebo di effettuare il cross-over alla luce dell'evidente vantaggio del braccio sperimentale.

Lo studio ha dimostrato che Regorafenib prolunga significativamente la PFS ( HR 0.27, 95% CI 0.18-0.39; p=0,0001) rispetto al placebo. LA PFS mediana è stata di 4.8 mesi, per il braccio

sperimentale vs. 0.9 mesi per il braccio placebo, con il 60% e 38% di pazienti liberi da progressione rispettivamente a 3 e 6 mesi per Regorafenib vs. 11% e 0% per il braccio placebo. Il DCR è stato 53% vs. 9% in favore di Regorafenib. Circa l'85% dei pazienti randomizzati nel braccio placebo andati incontro a progressione hanno fatto il cross-over a Regorafenib. I pazienti randomizzati nel braccio placebo e successivamente trattati con Regorafenib hanno ottenuto la stessa PFS dei pazienti inizialmente randomizzati nel braccio sperimentale.

Il farmaco è stato ben tollerato da tutti i pazienti. Le reazioni avverse più frequenti di grado 3 e 4, registrate nel braccio sperimentale sono state: ipertensione (23.5%), sindrome mano-piede (19.7%), e diarrea (5.3%).

Altri farmaci biologici sono in atto sottoposti a sperimentazione clinica per pazienti in progressione a trattamento standard. Nel dettaglio si tratta di:

- **Dasatinib**: è un TKI che blocca l'attivazione dei recettori KIT, PDGFR  $\alpha$ , EPHA2, BCR-ABL, e blocca il pathway Src, essenziale per la crescita, la motilità, la sopravvivenza cellulare. Dasatinib 70 mg due volte al giorno, è stato approvato dalla FDA per il trattamento di seconda linea della LMC e PH + LLA. Uno studio di fase 1, open label, "dose escalation", ha valutato 67 pazienti con GIST avanzato e refrattario alla terapia standard. Non si è osservata alcuna risposta obiettiva, tuttavia il 16% presentano malattia stabile [56].

- **Sorafenib**, è un efficace inibitore KIT, PDGFR $\alpha$ , VEGFR1, 2, 3 e in aggiunta inibisce le chinasi serina/treonina lungo la via del segnale RAS/RAF e MEK/ERK [57]. Un trial di fase II, valutando l'efficacia di Sorafenib 400 mg su 26 pazienti con GIST metastatico e resistenti alle terapie convenzionali, ha riportato il 13% di risposte parziali, 58% di malattia stabile, PFS mediana 5.3 mesi e OS 13 mesi [58]. Uno studio retrospettivo europeo ha mostrato un'attività simile del Sorafenib nella terapia di quarta linea in pazienti con GIST refrattario alle terapie convenzionali. 24 pazienti con GIST metastatico, andati in progressione con Imatinib, Sunitinib, Nilotinib, sono stati trattati con Sorafenib 400 mg due volte al giorno. In un follow-up mediano di 93 giorni, il 20% dei pazienti ha avuto una risposta parziale e il 50% malattia stabile.

-**Masatinib**, è un nuovo TKI di KIT, PDGFR $\alpha$  e  $\beta$ , FGFR3,FAK. Uno studio di fase 1 "dose escalation" ha stabilito 12mg/kg/die come dose massima tollerata [59].

Uno studio di fase II sul Masatinib condotto su 30 pazienti con GIST avanzato e resistenti alla terapia convenzionale, ha dimostrato un 3% di risposta completa, 50% progressione parziale, 43% malattia stabile, TTP mediano di 5.6 mesi, PFS mediana di 41.3mesi [60].

- **Hsp90 inhibitors:** in condizioni fisiologiche le hsp90 intervengono in condizioni di stress cellulare, in particolare durante episodi di acidosi, ipossia, temperatura elevata. Le hsp90 intervengono nel “folding”, ubiquitinazione, e degradazione proteica. Le cellule tumorali esprimono in maniera esaltata le hsp, che proteggono le oncoproteine dalla degradazione, alimentando in tal modo il processo oncogenetico. Da qui prende origine il razionale impiego degli inibitori delle hsp nei tumori solidi. Uno studio di fase I ha studiato l’efficacia di un inibitore delle hsp, la retaspimycina, su 54 pazienti con GIST TKI-resistente. I dati ottenuti dimostrano un 22% di risposte parziali e 78% di malattia stabile [61]. Tuttavia uno studio di fase III con retaspimycina è stato interrotto a causa di tossicità epatica.

- **Bortezomib:** si tratta di un inibitore del proteosoma e indirettamente causa una upregulation della H2AX e innesca l’apoptosi [62]. Quando le linee cellulari di GISTs vengono trattate con bortezomib, vanno incontro a una rapida apoptosi, upregulation di H2AX, e downregulation di KIT. Attualmente sono in corso diversi trials clinici che valutano l’attività del bortezomib in combinazione con altri farmaci.

- **Everolimus:** è un inibitore di mTOR. Studi in vitro dimostrano l’attività antitumorale sui GIST di Everolimus nella terapia combinata con Imatinib. Uno studio di fase I/II ha valutato l’efficacia del trattamento combinato di Everolimus e Imatinib in pazienti con GIST che sono andati incontro a progressione di malattia dopo 4 mesi di trattamento con Imatinib 400 mg/die. Uno studio di fase II ha valutato la terapia combinata Sirolimus ed Everolimus in 2 coorti. Un braccio di pazienti era andato incontro a progressione dopo 4 mesi di Imatinib, l’altro braccio invece era costituito da pazienti in progressione nonostante terapia con Imatinib e successivamente Sunitinib. La PFS a 4 mesi è di 17.4 e 37.1% rispettivamente nei due bracci.

Altri farmaci chiamati in causa per un possibile ruolo nel trattamento di 3 linea dei GIST metastatici sono: **PKC412, insuline-like growth factor axis (IGF).**



# **OBIETTIVI DELLO STUDIO**

Obiettivo di questa tesi è l'analisi retrospettiva dei casi seguiti presso il nostro centro dal 2000 al 2013. In particolare è stato valutato come la caratterizzazione genica e biomolecolare della malattia al momento della diagnosi influenzi la pianificazione terapeutica e incida sulla prognosi dei pazienti affetti da GIST nelle varie fasi della malattia.

I risultati sono stati confrontati con i dati pubblicati in letteratura.

# **PAZIENTI E METODI**

Nel periodo compreso tra il 2000 e il 2013, 150 pazienti affetti da GIST localizzato o metastatico sono stati presi in carico presso l'U.O.C. di Oncologia del Centro di Riferimento Regionale per la Diagnosi e la Cura dei Tumori Rari ed Eredo-familiari dell'adulto della Regione Sicilia. Di questi, 114 sono valutabili.

La diagnosi anatomopatologica di GIST è stata posta sulla base della natura mesenchimale della neoplasia e sull'espressione immunohistochemica di c-KIT (distinguendo in tal modo casi CD117+ e CD117-). Gran parte preparati istologici sono stati valutati per lo stato mutazionale di c-KIT e PDGFR $\alpha$ .

Il referto anatomopatologico di tutti i casi forniva la sede della neoplasia, la dimensione del tumore, la valutazione dei margini di resezione, il sottotipo istologico ed il numero di mitosi. Sulla base di queste informazioni era possibile assegnare una specifica classe di rischio secondo la classificazione di NIH/Fletcher (Fletcher, Berman, & Corless 2002) e di Miettinen (Miettinen & Lasota, 2006). L'analisi per lo stato mutazionale dei geni c-KIT e PDGFR  $\alpha$  è stata effettuata ed è disponibile al momento per per 93 pazienti.

La chirurgia veniva considerata radicale se la malattia veniva resecata in blocco, riportando margini chirurgici negativi all'esame istologico microscopico (chirurgia R0). La presenza di emoperitoneo e/o di rottura del tumore intraoperatoria veniva considerata come chirurgia non radicale R1.

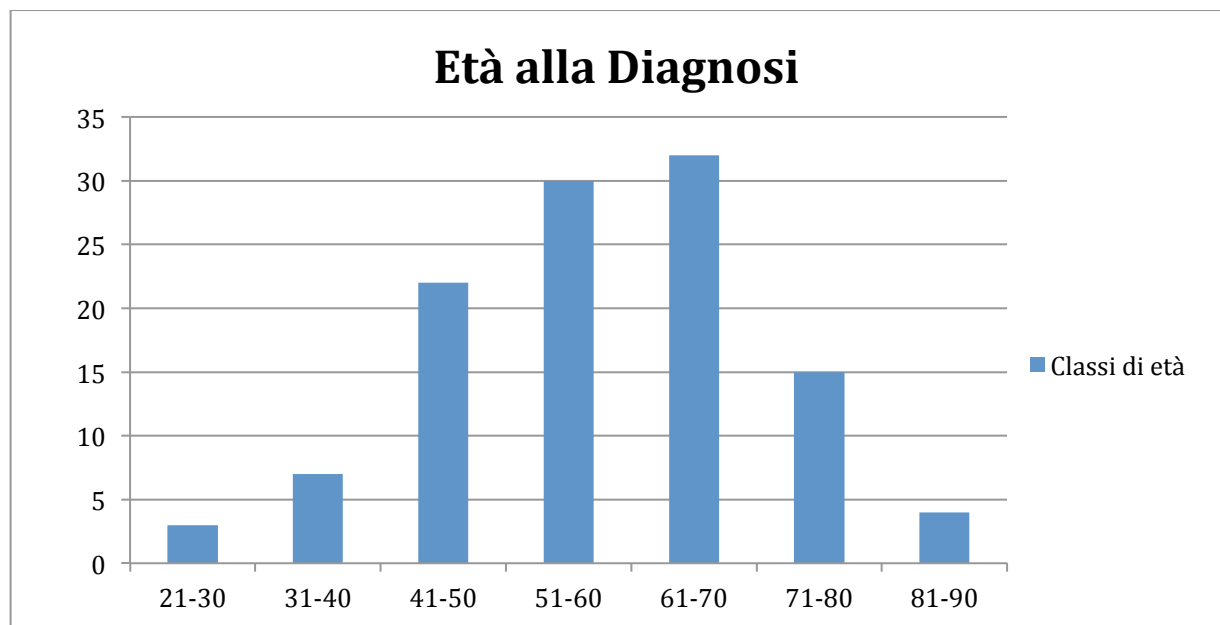
Le indagini strumentali utilizzate per la stadiazione della malattia, nella valutazione della risposta terapeutica al trattamento e nel follow-up sono state la TC, la PET/TC e la RM.

L'ecografia con mezzo di contrasto (CEUS) è stata impiegata per la valutazione morfo-funzionale delle localizzazioni epatiche e peritoneali nella valutazione della risposta al trattamento con inibitori tirosinchinasici. Nei casi di GIST gastrico e rettale è stata utilizzata l'endoscopia e talvolta l'eco-endoscopia ai fini diagnostici e di stadiazione.

Nei pazienti con GIST avanzato in terapia con inibitori tirosinchinasici la risposta al trattamento veniva valutata mediante i classici dimensionali e cioè i "Criteri Radiologici di Risposta per i Tumori Solidi" (RECIST), unitamente ai criteri più recenti di tipo densidometrico-tissutale, in particolare i "CHOI Criteria", che considerano le modificazioni tissutali documentate alle metodiche di imaging in termini di variazione di intensità del segnale alla RM, di densità alla TC e di captazione del 18FDG (SUV) nel caso della PET.

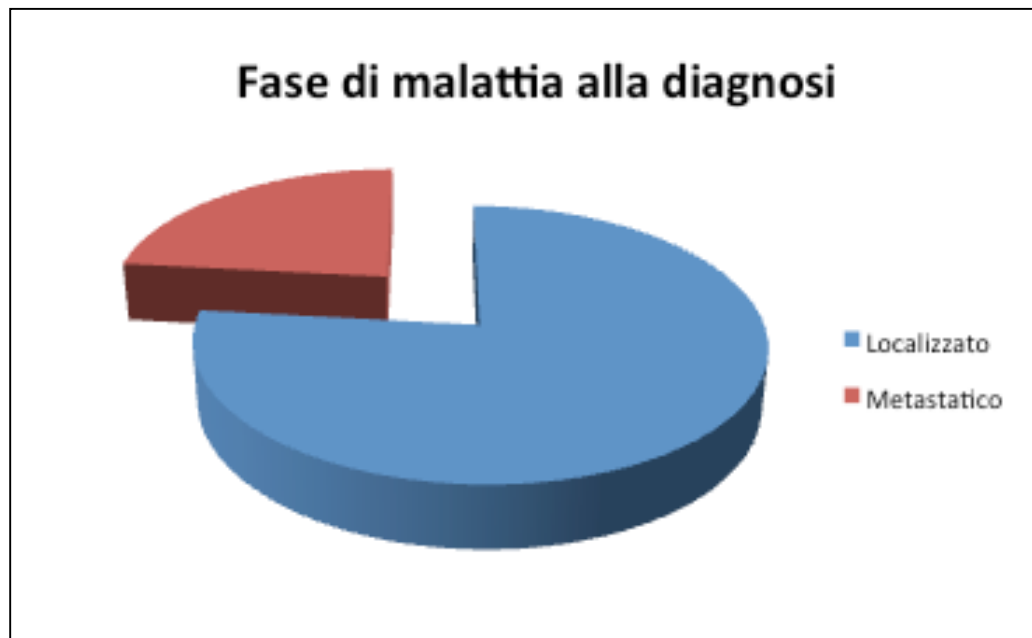
## RISULTATI

Il nostro centro tra il 2000 e il 2013 ha seguito 150 pazienti con diagnosi istologica di GIST, di cui 114 risultano valutabili per lo studio. L'età media di esordio della malattia è stata di 58 anni (Figura 1), con un rapporto maschio/femmina leggermente a favore del sesso maschile.



**Figura 1**

Gli esami di stadiazione al momento della diagnosi hanno individuato 88 pazienti (77%) con malattia localizzata e 26 pazienti (33%) con malattia metastatica (Fig.2 e Tab.1).

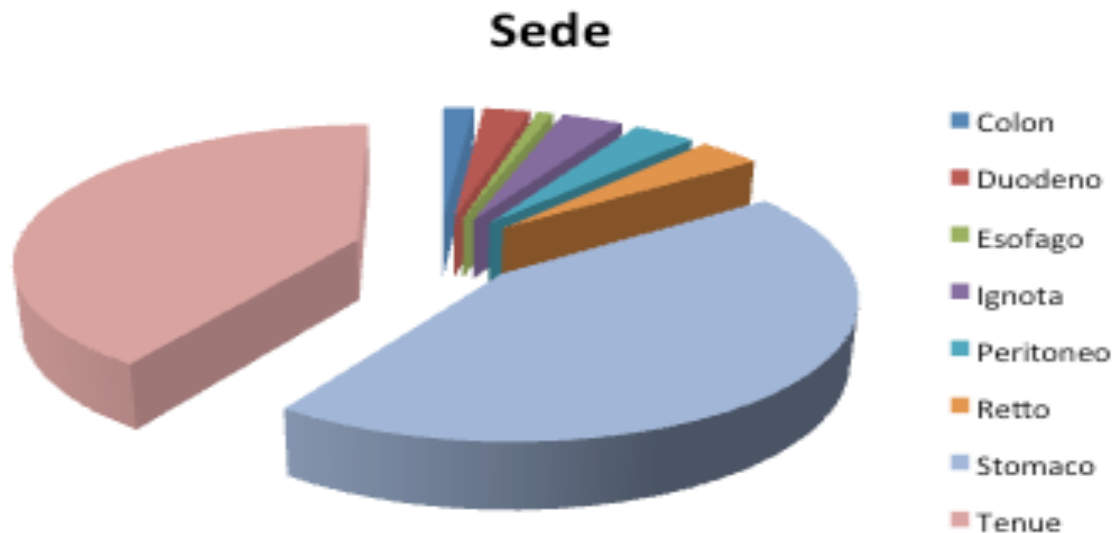


**Figura 2**

Sede	Conteggio di Esordio
Localizzato	88
Metastatico	26
<b>Totale complessivo</b>	<b>114</b>

**Tabella 1**

Nella nostra casistica il 44% dei pazienti presentava una localizzazione iniziale del tumore allo stomaco, il 41% al tenue, il 4% al retto, il 3% al duodeno, il 3% al peritoneo, mentre solo nell'1% dei casi la sede di malattia risultava il colon o l'esofago (Fig.3).

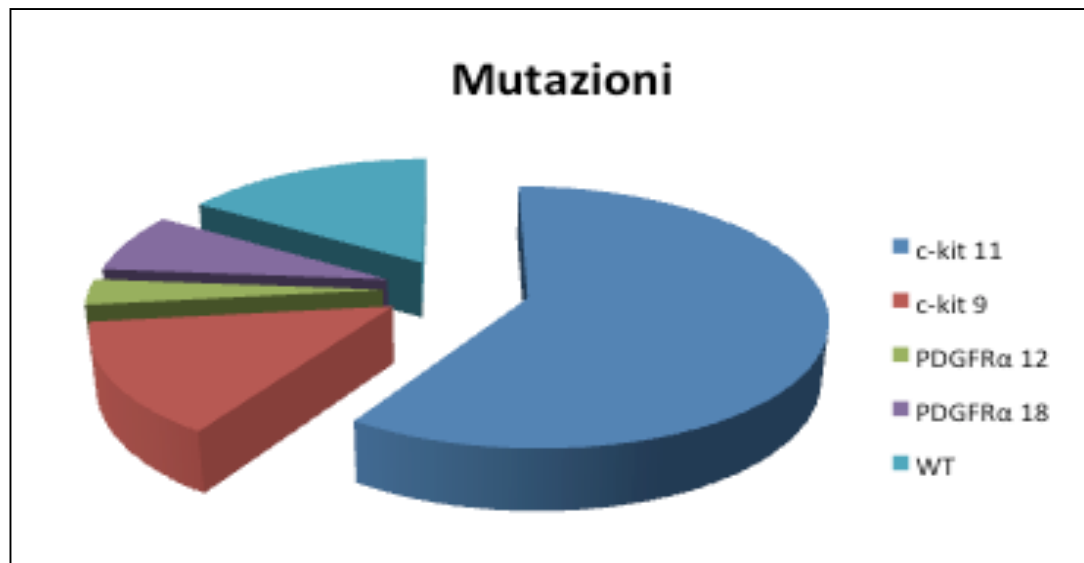


**Figura 3**

Alla revisione dei preparati istologici, 7 casi avevano avuto una diagnosi iniziale errata: 3 GIST sono stati riclassificati come leiomioma, 1 come fibrosarcoma, 1 come liposarcoma, 1 come sarcoma low-grade ed 1 infine come adenocarcinoma gastrico. Questi dati confermano come la revisione istologica e quindi la second opinion sia mandatoria nel caso di neoplasie rare come sono i GIST.

L'analisi mutazionale ha dimostrato mutazione dell'esone 11 e dell'esone 9 di c-KIT rispettivamente nel 59% e nel 16% dei casi, il 14% dei pazienti è risultato wilde-type. Questi dati sono in linea con quelli riportati dalla letteratura.

Per quanto concerne il PDGFR $\alpha$  l'8% dei casi ha presentato la mutazione PDGFR $\alpha$ 18 e l'8% la mutazione PDGFR $\alpha$ 12 (**Figura 4 e Tabella 2**)



**Figura 4**

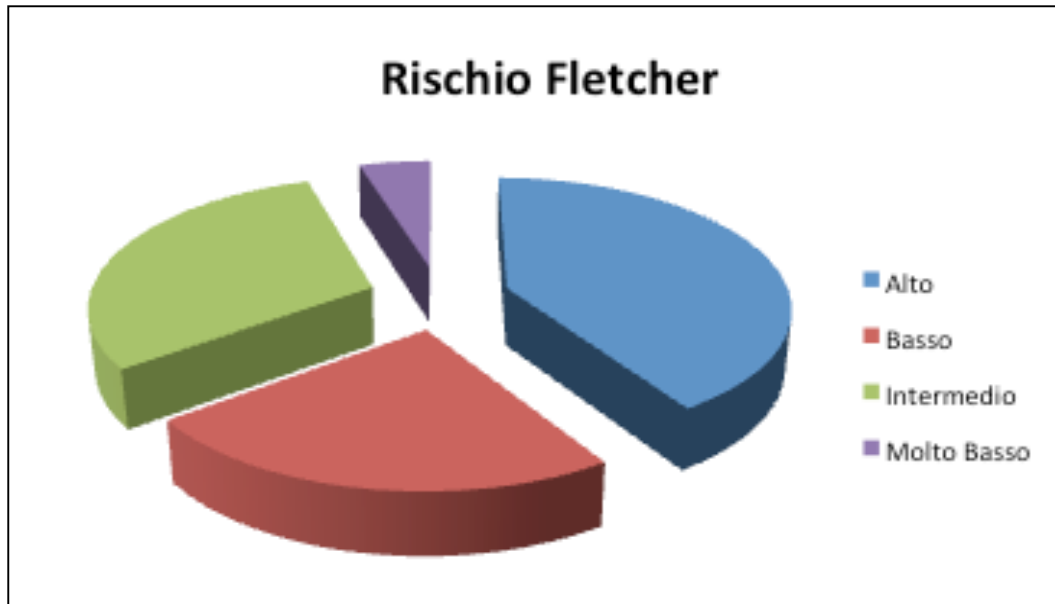
Analisi mutazionale	Conteggio di Mutazione
c-kit 11	53
c-kit 9	14
PDGFRα 12	3
PDGFRα 18	7
WT	13
<b>Totale complessivo</b>	<b>90</b>

**Tabella 2**

Tra gli 88 pazienti con malattia localizzata alla diagnosi, 87 sono stati sottoposti ad intervento di resezione del tumore primitivo, un paziente ha rifiutato l'intervento ed è stato avviato a trattamento con Imatinib 400mg/die.

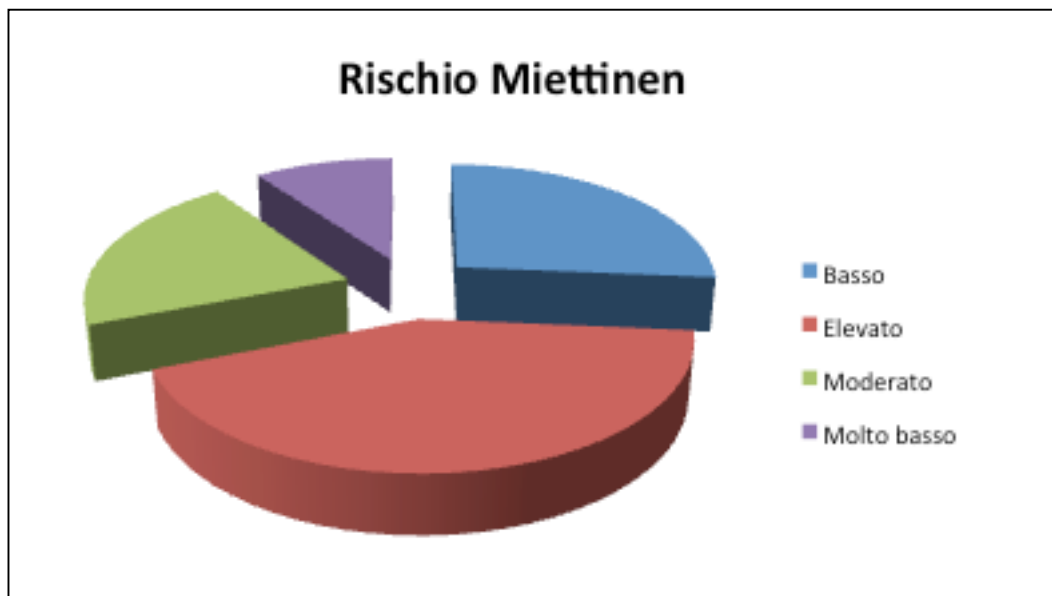
In 79 casi è stato possibile ottenere una chirurgia radicale mentre in 8 pazienti è stato riscontrato un margine di resezione positivo (chirurgia R1) per presenza di neoplasia microscopica all'esame istologico definitivo.

La stratificazione del rischio secondo Fletcher negli 87 pazienti sottoposti a resezione chirurgica ha individuato un rischio alto nel 40% dei casi, rischio intermedio nel 30%, rischio basso nel 30%, rischio molto basso nel 6% (**Figura 5**).



**Figura 5**

La stratificazione del rischio secondo Miettinen negli 87 pazienti sottoposti a resezione chirurgica ha individuato un rischio elevato nel 41% dei casi, rischio moderato nel 21%, rischio basso nel 27%, rischio molto basso nell'11% (**Figura 6 e Tabella 3**)



**Figura 6**

<b>Conteggio di Classe di Rischio Miettinen</b>	
Basso	28
Elevato	48
Moderato	27
Molto basso	11
<b>Totale complessivo</b>	<b>114</b>

**Tabella 3**

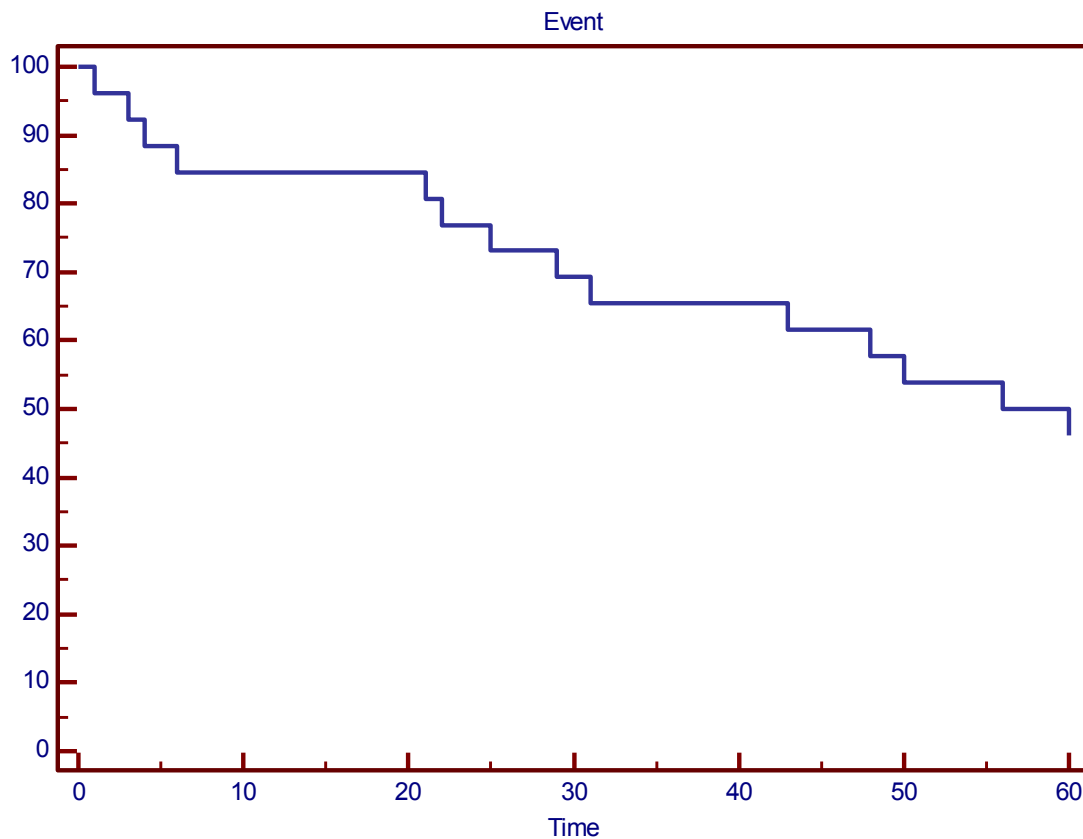
Tra gli 87 pazienti sottoposti a chirurgia per GIST localizzato, 21 (23%) hanno intrapreso un trattamento adiuvante con Imatinib 400mg/die (di questi, 8 pazienti con rischio Intermedio e 13 con rischio alto secondo la classificazione di Fletcher). Tra i pazienti che assumono Imatinib adiuvante, 16 (76%) risultano liberi da recidiva ai controlli di follow-up, 5 (25%) invece hanno avuto ripresa di malattia e sono stati trattati con Inibitori delle tirosin-chinasi secondo il protocollo terapeutico standard per GIST avanzato. Complessivamente 26 degli 87 pazienti inizialmente operati per malattia localizzata ha presentato recidiva di malattia. Solo 5 di questi erano in trattamento adiuvante con Imatinib 400 mg/die, mentre 21 eseguivano regolare follow-up clinico-strumentale. La distribuzione delle recidive in base alle classi di rischio definite secondo la classificazione de Fletcher ha dimostrato 8 casi nel gruppo a rischio basso, 6 in quello intermedio e 12 nel gruppo ad alto rischio (**Tabella 4**).

Rischio NIH/Fletcher	Pazienti
Molto Basso	0
Basso	8
Intermedio	6
Alto	12
<b>Totale complessivo</b>	<b>26</b>

**Tabella 4**

Nel dettaglio, 19 dei 26 (73%) pazienti con recidiva presentavano mutazione di c-KIT in esone 11, 2 pazienti (8%) presentavano mutazione di c-KIT in esone 9, 2 pazienti (8%) mutazione di PDGFR $\alpha$ , solo 1 paziente risultava Wild-Type per entrambi i geni. Questi dati confermano l'importanza dell'analisi mutazionale anche ai fini prognostici.

Considerando T0 l'epoca di prima diagnosi dei pazienti con GIST localizzato, ad un follow up di 5 anni la Relapse Free Survival (RFS) mediana è stata di 60 mesi (**Figura 7**)

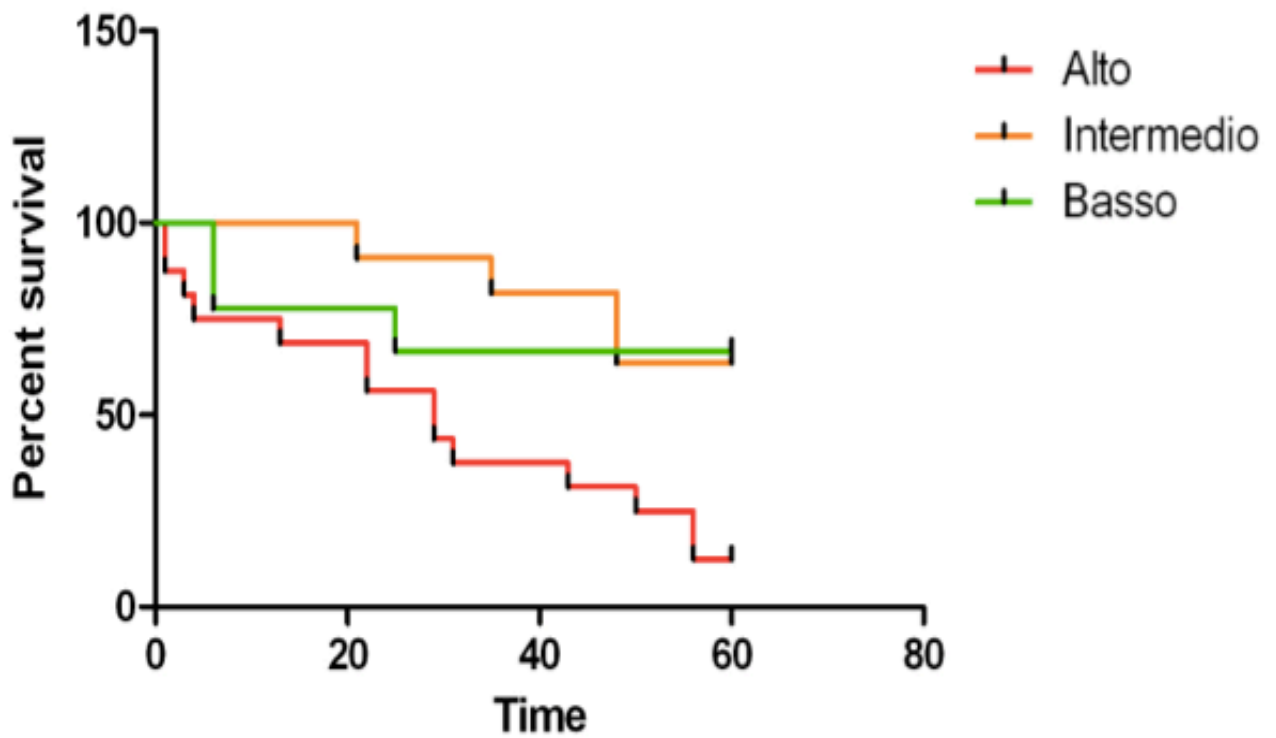


**Figura 7**

E' stata altresì calcolata la Relapse Free Survival in funzione della classe di rischio secondo Fletcher. La mediana di RFS nei pazienti ad alto rischio è di 31 mesi, mentre la mediana nei pazienti a rischio basso e intermedio non è stata raggiunta a 5 anni di follow-up (**Figura 8**).



## RFS and Risk - Fletcher



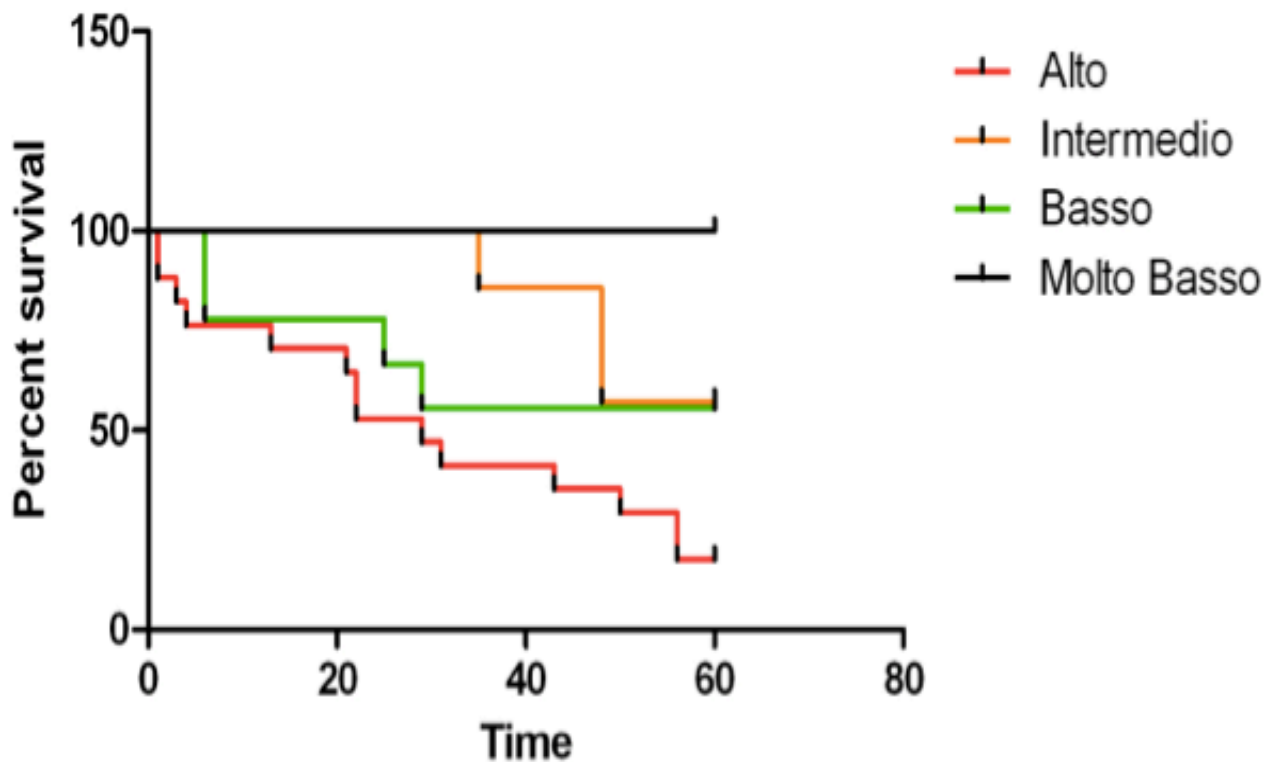
**Figura 8**

Pur considerato l'esiguo numero del campione ed il breve periodo di follow-up la differenza fra le curve non è risultata statisticamente significativa ( $p=0,1019$ ).

E' stata allora calcolata la Relapse Free Survival in funzione della classe di rischio secondo Miettinen, che considera la sede della neoplasia per la stratificazione del rischio, oltre alle dimensione e all'indice mitotico della neoplasia.

La mediana di RFS nei pazienti ad alto rischio è di 29 mesi, mentre la mediana nei pazienti a rischio basso e intermedio non è stata raggiunta a 5 anni di follow-up ( **Figura 9**).

## RFS and Risk - Miettinen

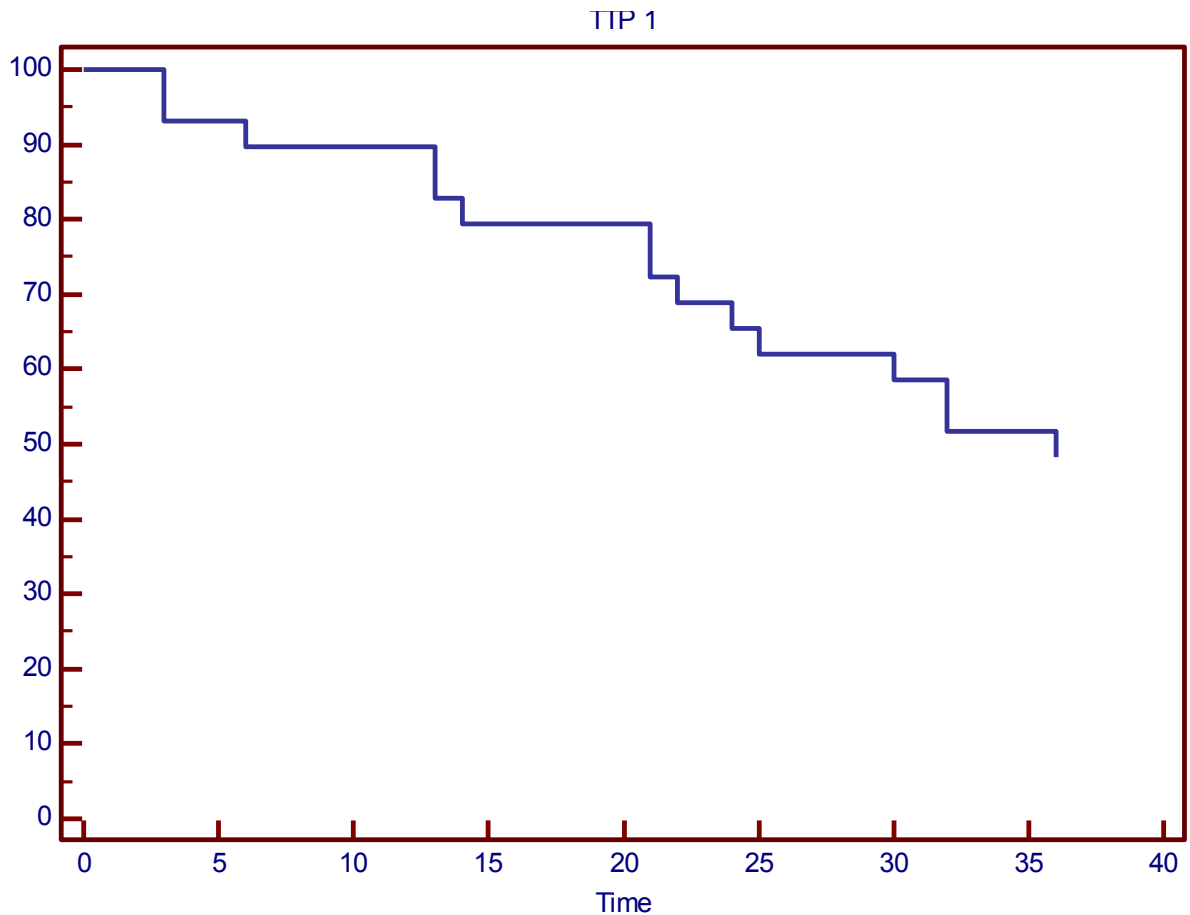


**Figura 9**

I pazienti ad alto rischio hanno riportato un intervallo libero da recidiva significativamente ridotto rispetto alle altre classi di rischio ( $p=0,0046$ ). La stratificazione del rischio Miettinen ha quindi un valore predittivo maggiore rispetto alla NIH/Fletcher.

Il 62% dei pazienti recidivati avevano una malattia primaria localizzata al piccolo intestino, sede che si conferma a più elevato rischio di recidiva rispetto alle altre (Miettinen & Lasota, 2006).

Per quanto concerne i pazienti con malattia metastatica, inoperabile o recidivata abbiamo trattato ad oggi 47 pazienti con Imatinib 400mg/die; tra questi 17 pazienti stanno attualmente proseguendo il trattamento allo stesso dosaggio. Sui 29 pazienti che avevano completato un follow-up di 3 anni la Relapse Free Survival mediana è stata di 36 mesi (**Figura 10**).



**Figura 10**

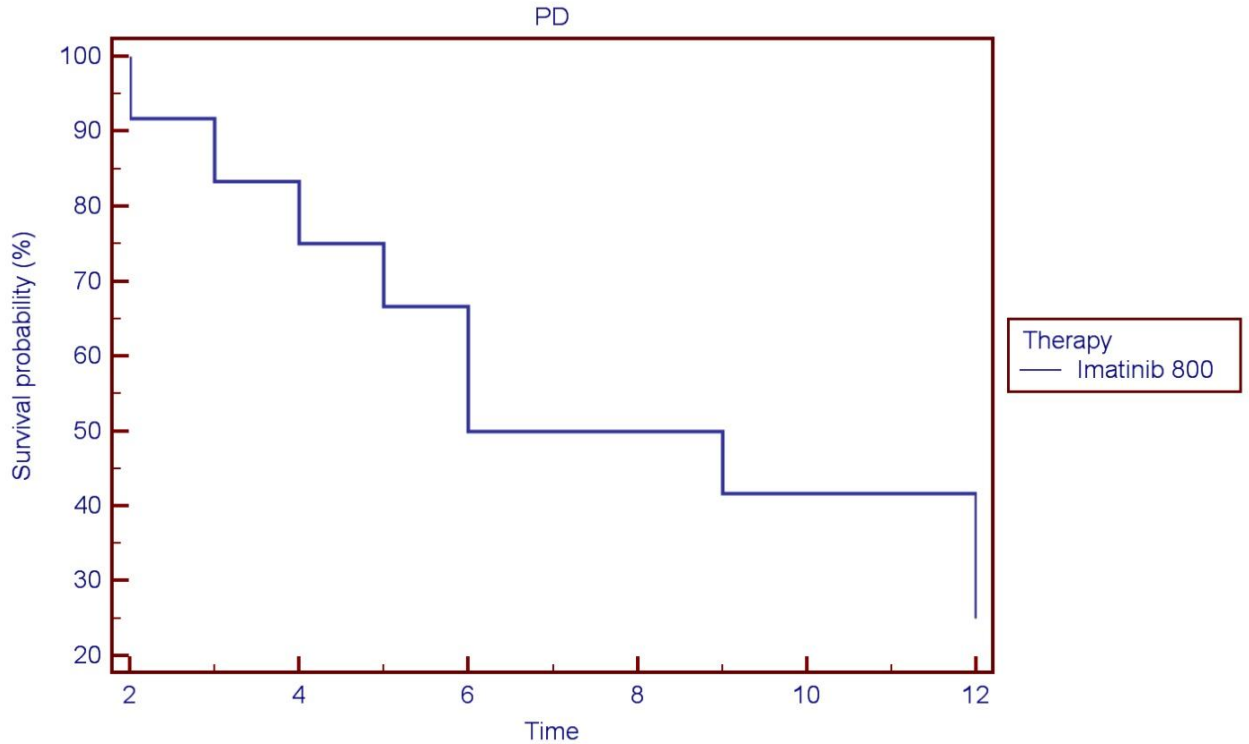
Nessuna tossicità degna di rilievo si è verificata durante il trattamento con Imatinib al dosaggio standard.

L'effetto collaterale più comune è stato l'edema periorbitario. In nessun caso è stato comunque necessario ridurre la dose o interrompere la somministrazione del farmaco.

I pazienti in progressione a Imatinib 400mg/die hanno quindi ricevuto Imatinib 800 mg/die, eccetto un paziente con mutazione D842V del PDGFRa, che ha ricevuto un inibitore della proteinchinasi C.

L'incremento di dosaggio di Imatinib si è rivelato utile per ritardare la progressione di malattia anche in pazienti portatori di mutazioni diverse da quelle in esone 11.

La PFS secondo Kaplan-Meier calcolata per i pazienti di questo gruppo che avevano un follow-up di almeno 1 anno ha mostrato una mediana di controllo di malattia pari a 6 mesi (**Figura 11**).



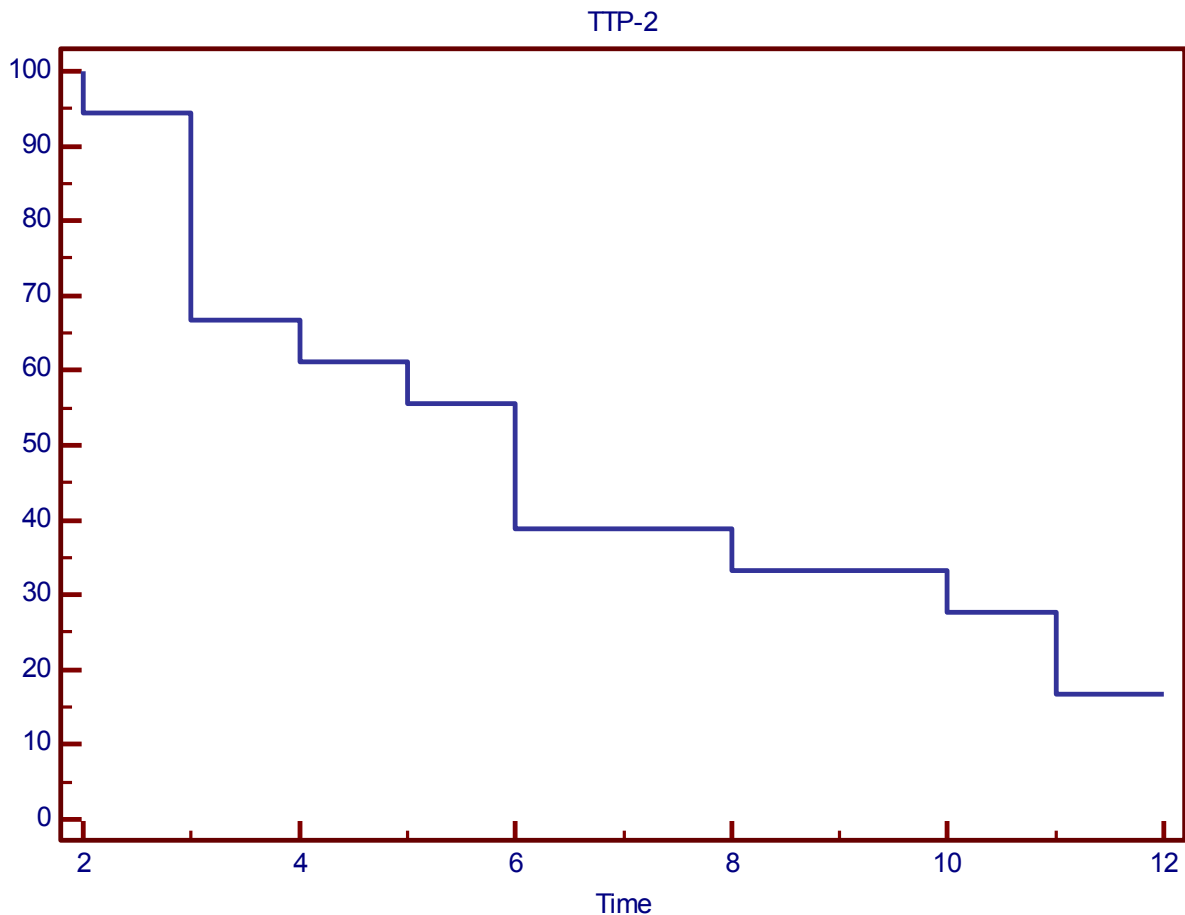
**Figura 11**

La tollerabilità al trattamento è risultata più bassa rispetto alla dose standard e gli effetti collaterali più comuni sono stati l'edema periorbitario e la mielotossicità.

I 18 pazienti in progressione a Imatinib 800 mg/die hanno iniziato il trattamento di seconda linea con Sunitinib 37,5 mg/die assunto per via orale in maniera continuativa.

Sunitinib ha sensibilmente dimostrato, sebbene la sua più bassa tollerabilità rispetto ad Imatinib, di prolungare la PFS. Gli ultimi studi sembrano suggerire che sia più efficace nei pazienti portatori di mutazione in esone 9 di c-KIT. I dati da noi acquisiti su pazienti portatori di mutazione in esone 9 mostrano in effetti che la risposta in termini di PFS è stata superiore a Sunitinib in seconda linea, piuttosto che a Imatinib 400mg/die in prima linea.

La PFS mediana nei pazienti in trattamento con Sunitinib in seconda linea con un follow-up di 1 anno è di 6 mesi (**Figura 12**).

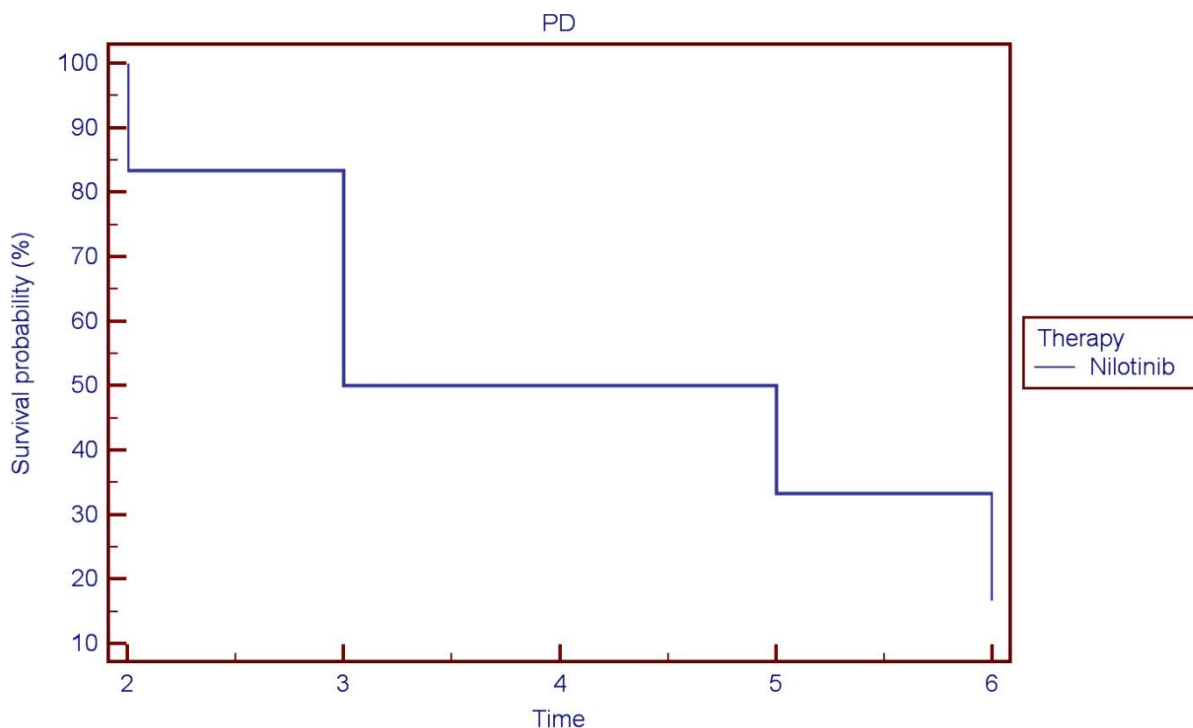


**Figura 12**

Gli effetti collaterali più comuni sono stati piastrinopenia, alterazioni ematologiche, mucosite, sindrome mano-piede. La sospensione temporanea del trattamento si è resa necessaria in 1 paziente per tossicità. La riduzione di dose non si accompagnava a sostanziali miglioramenti clinici.

Sei pazienti in progressione ad imatinib e sunitinib sono stati trattati con Nilotinib 800mg/die ad uso compassionevole. Nella nostra esperienza, grazie al programma di utilizzo compassionevole, abbiamo ottenuto risposte parziali di breve durata, accompagnate da riduzione del SUV all'indagine PET.

Nei pazienti trattati con Nilotinib in terza linea la Relapse Free Survival mediana ad un follow-up di 6 mesi è risultata 4 mesi (**Figura 13**).

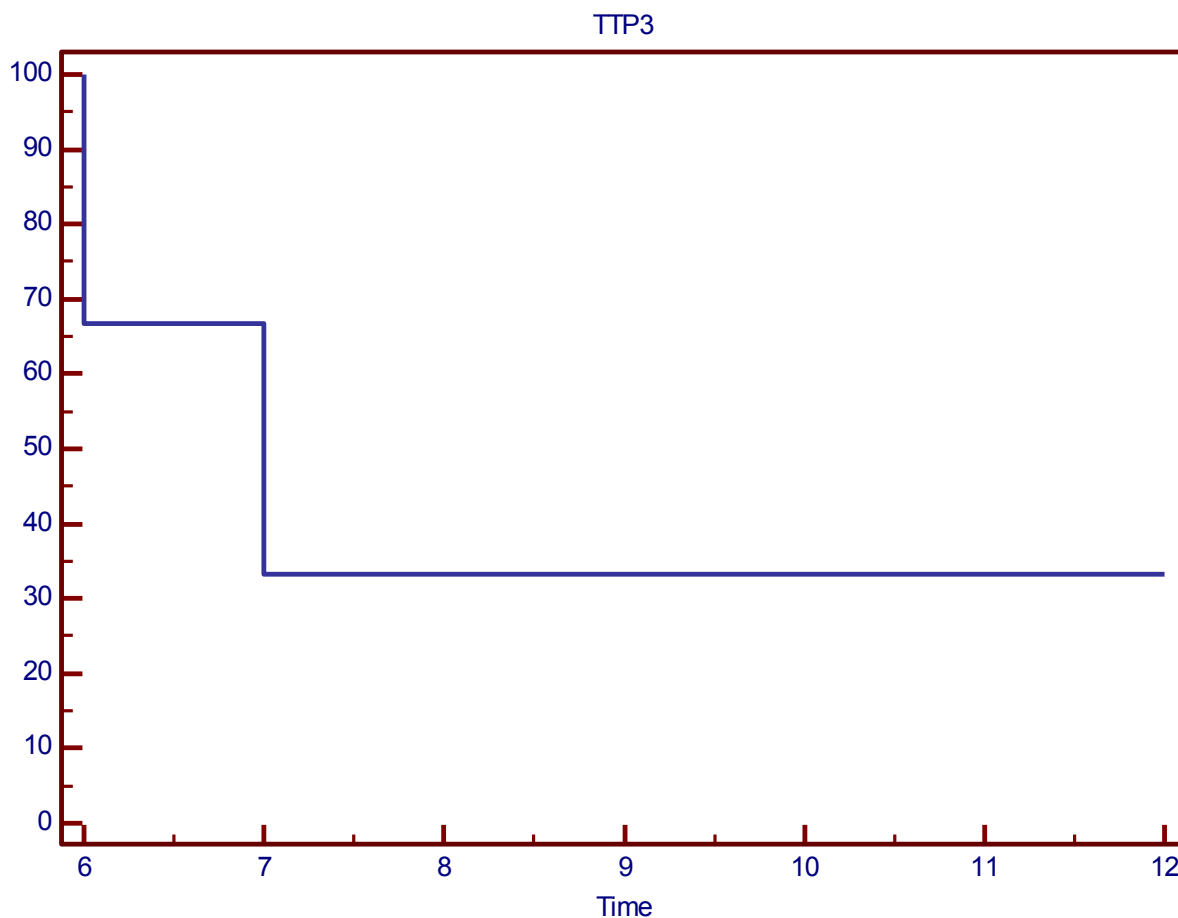


**Figura 13**

Il re-challenging con Imatinib, secondo la nostra esperienza, sembra avere esclusivamente un ruolo palliativo, capace soltanto di rallentare la progressione della malattia.

Il nostro centro ha partecipato attivamente allo studio multicentrico di fase III in doppio cieco randomizzato controllato definito GRID, finalizzato a dimostrare l'efficacia di Regorafenib nel prolungare la PFS rispetto al placebo in pazienti affetti da GIST metastatico e con progressione di malattia a precedenti trattamenti con Imatinib e Sunitinib.

Il nostro centro ha arruolato nello studio 6 pazienti, collocandosi al 4° posto nella classifica dei centri col maggior numero di pazienti arruolati; 4 sono stati randomizzati nel braccio sperimentale e 2 nel placebo. Questi ultimi dopo la progressione hanno effettuato il cross-over a Regorafenib come previsto dal protocollo. Ad un follow-up di 12 mesi la PFS mediana è di 7 mesi (Fig.14), superiore a quella riportata nello studio GRID, ma concorde con lo studio di fase II (PFS di 10 mesi).



**Figura 14**

## CONCLUSIONI

I dati ottenuti ed elaborati in questa tesi sono in linea con quelli della letteratura riguardo l'età media di esordio, la sede, la frequenza e la distribuzione delle mutazioni.

I dati di RFS mostrano come la stratificazione del rischio secondo Miettinen abbia una maggiore capacità discriminativa ( $p < 0,05$ ) tra i pazienti a maggiore e minore rischio di recidiva rispetto alla stratificazione secondo Fletcher.

Inoltre i dati relativi alla comparsa di recidiva dimostrano come nel 62% dei casi la stessa sia insorta per tumori primitivi localizzati all'intestino tenue, confermando che il parametro sede è un importante fattore prognostico da associare in maniera irrinunciabile alla dimensione e alla conta mitotica del tumore primitivo.

Il trattamento neoadiuvante con Imatinib 400 mg/die può aumentare la possibilità di un trattamento chirurgico R0 e andrebbe sempre valutato come opzione alternativa all'intervento chirurgico in prima battuta per tumori di grandi dimensioni.

I dati attualmente in nostro possesso riguardo l'efficacia della terapia adiuvante ne confermano la sua importanza nell'aumentare la sopravvivenza libera da recidiva e sono in linea con quanto pubblicato in letteratura.

I pazienti con recidiva in singola sede non metastatica possono beneficiare quasi sempre di un nuovo trattamento chirurgico e di successiva terapia con Imatinib 400mg/die. Il trattamento con inibitori tirosinchinasici è la terapia di scelta nei pazienti metastatici o recidivati, eccetto alcuni casi strettamente selezionati in cui l'intervento chirurgico può essere attentamente valutato.

I dati preliminari dell'analisi mutazionale effettuata sui pazienti recidivati mostrano una netta prevalenza delle mutazioni a carico dell'esone 11. Questo dato dimostra come la presenza di mutazione, soprattutto del tipo delezione, a carico dell'esone 11 identifica un sottogruppo di pazienti a maggior rischio di recidiva a parità di sede, dimensioni ed indice mitotico, sebbene si associno ad una maggiore responsività alla terapia con Imatinib nella malattia metastatica.

Nella nostra casistica tutti i pazienti a rischio basso/intermedio secondo la classificazione di Fletcher andati incontro a recidiva erano portatori di mutazione per delezione nell'esone 11 di c-KIT.

Questo dato, pur considerata l'esiguità del campione, conferma i dati della letteratura, che riportano come la mutazione per delezione dell'esone 11 di c-KIT sia un parametro prognostico sfavorevole, associato ad un comportamento biologico più aggressivo del tumore primitivo[63].

Per tale motivo l'analisi genetica dovrebbe rappresentare uno standard nell'iter diagnostico-terapeutico del paziente affetto da GIST, in quanto in grado di fornire un ulteriore parametro prognostico in termini di rischio di recidiva, nonché predittivo di risposta al trattamento con TKI. I nostri pazienti con GIST metastatico e mutazione a carico esone 9 del recettore c-KIT beneficiano di dosi più elevate di Imatinib (800 mg/die) rispetto ai pazienti con mutazioni dell'esone 11. Basandoci su questi dati la nostra prassi è quella di somministriamo Imatinib 800 mg/die in adiuvante ai pazienti con GIST operato e con esone 9 mutato, nonostante questo dato ancora non sia codificato in letteratura.

In seconda linea Sunitinib ha sensibilmente dimostrato di prolungare la PFS dei pazienti con GIST metastatico ed in progressione al trattamento di prima linea con Imatinib. I dati da noi acquisiti su pazienti portatori di mutazione in esone 9 mostrano in effetti che la risposta in



termini di PFS è stata superiore a Sunitinib in seconda linea, piuttosto che ad Imatinib 400mg/die in prima linea. Questo dato è particolarmente importante da valutare, soprattutto in assenza di uno studi di confronto diretto tra imatinib e sunitinib.

Un'alternativa valida per il trattamento dei GIST metastatici in resistenza acquisita ad Imatinib 400 mg/die è raddoppiare la dose dello stesso farmaco, cioè da 400 mg a 800 mg/die con un controllo di malattia in circa il 30% dei casi.

Nel trattamento di terza linea, Regorafenib ha determinato un incremento di PFS di 4,8 mesi.

Regorafenib è un farmaco complessivamente ben tollerato, le uniche reazioni avverse di grado uguale o superiore al 3° legate al trattamento sono stati ipertensione, diarrea e sindrome mano-piede. Ad oggi Regorafenib è l'unico farmaco raccomandato per il trattamento di terza linea dei pazienti con GIST metastatico o inoperabile in progressione a due precedenti linee di terapia con Imatinib e Sunitinib.

## **BIBLIOGRAFIA**

- 1 **Joensuu H**, Fletcher C, Dimitrijevic S, Roberts P, Demetri G. Management of malignant gastro intestinal stromal tumours, *Lancet Oncol* 2002; 3: 655-664.
- 2 **DeMatteo RP**, Lewis jj, Leung D, Mudan SS, Woodruff JM, Brennan MF. Two hundred gastrointestinal stromal tumours: recurrence pattern and prognostic factors for survival. *Ann surg* 2000; 231: 51 - 58.
- 3 **Rubin BP**, Fletcher JA, Molecular insights into the Histogenesis and Pathogenesis of GISTs. *Int j Surg Pathol* 2000; 8.5.
- 4 **Fletcher CD**, Berman jj, Corless CC, et al. Diagnosis of gastro intestinal stromal tumours: a consensus approach. *Int J Surg Pathol* 2002, (33), 459-465.
- 5 **Hirota S**, Isozaki k, Kitamura y et al. Gain of function mutation of c-KIT In human GISTs. *Science* 1998, (279), 577-580.
- 6 **Miettinen M**, Moniham Jm, et al. GISTs/ smooth muscle tumours primary in omentum and mesentery; *Am J Surg Pathol* 1999; 23: 1109-1118.
- 7 **Heinrich MC**, Corless CL, Chen CJ et al. PDGFR  $\alpha$  mutations in GISTs. *Science* (299), 708-710.
- 8 **Corless CL**, Shoeder A, Griffith D et al. PDGFR  $\alpha$  mutations in GISTs: frequency, spectrum, and in vitro sensitivity to imatinib. *Eur J Cancer* (23), 5357-5364.
- 9 **Demetri GD**, Von Meheren M, Blanke CD, et al. Efficacy and safety of imatinib in advanced GISTs: a randomized controlled trial. *Lancet* (4), 1329-1338(2006).
- 10 **Badalamenti G**, V. Rodolico, F. Fulfarò et al. GISTs: focus on histopathological diagnosis and biomolecular features. *Ann of oncology* 2007 (18), v136-v140.
- 11 **Miettinen**, Lasota J, GIST definition, clinical, histological, immunohistochemical and differential diagnosis. *Virchows Arch* 2001; 438:1.
- 12 **Kawanowa K**, Sakuma Y, Sakurai S, et al. Hight incidence of microGIST in the stomach. *Human Pathol* 2006, (12), 1527-1535.
- 13 **Nilsson B**, Bümbling P, Meis-Kindblom JM, et al.: the incidence, prevalence, clinical course, and prognostication in the pre – imatinib era. *Cancer* 2005, (103), 821-829.
- 14 **Tryggvason G**, Gislason HG, Magnússon MK, et al. GIST in Iceland, 1990 -2003: the Icelandic GIST study, a population-based incidence and pathologic risk stratification study. *Int J Cancer* 2005; 117; 289.
- 15 **Rubin BP**, Singer S, Tsao et al. KIT activation is an ubiquitous feature of GISTs . *Cancer Res* 2001; 61: 8118-8121.

- 16 **Mussi C**, Schildhaus HU, Gronchi A, et al. Therapeutic consequences from molecular biology for GISTs patients affected by NF 1. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 4550.
- 17 **Janeway KA**, Kim SY, Lodish M et al. Defects in SDH in GISTs WT. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108:314.
- 18 **Stratakis CA**, Carney JA, et al. Carney dyad and triad: molecular genetics and clinical implications. *J Intern Med* 2009, 23:15.
- 18 **Heinrich M**, Rubin B, Longley B, et al. Biology and genetic aspects of GISTs: KIT activation and cytogenetic alterations. *Hum Pathol* 2002; 33: 484-495.35
- 19 **West**, Corless (2004). The novel marker, DOG1, is expressed ubiquitously in gastrointestinal stromal tumors irrespective of KIT or PDGFRA mutation status. *Am J Pathol* (165), 107-113.
- 20 **Espinosa**, Lee (2008). A novel monoclonal antibody against DOG1 is a sensitive and specific marker for gastrointestinal stromal tumors. *Am J Surg Pathol* (32), 210-218.
- 21 **Mol CD**, Dougan DR, Schneider TR, et al. Structural basis for the autoinhibition and STI-571 inhibition of c-kit tyrosine Kinase. *J Biol Chem* 279: 31655-31663, (2004).
- 22 **Mol CD**, Lim KB, Sridhar V, Zou H, et al. Structure of c-KIT product complex reveals the basis for kinase transactivation. *J Biol Chem* 278 (34): 31461-31464.
- 23 **Safdar Ali**, Sher Ali, et al. Role of c-KIT in cause and treatment of gastrointestinal stromal tumors. *Gene* 401 (2007) 38-45.
- 24 **Blume- Jensen**, Janknecht, R Hunter et al. The KIT R promoters cell survival via activation of PI3K/AKT. *Curr Biol.* 8, 779-782. 41 **Zeng S**, Xu S, et al. Regulation of SCF signaling by Cbl family proteins. *Blood* 105, 226- 232 (2005).
- 25 **Blume- Jensen**, Janknecht, R Hunter et al. The KIT R promoters cell survival via activation of PI3K/AKT. *Curr Biol.* 8, 779-782. 41 **Zeng S**, Xu S, et al. Regulation of SCF signaling by Cbl family proteins. *Blood* 105, 226- 232 (2005).
- 26 **Heinrich MC** , Corless CL, Demetri GD et al. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic GISTs (2003) *J Clin Onc* 21 (23): 4342-4349.
- 27 **Zalcberg JR**, Casali P, et al. Outcome of patients with advanced GIST crossing over to a daily imatinib dose of 800 mg after progression on 400 mg. *Eur J Cancer* 41 (12): 1751-1757.
- 28 **GIST Meta-analysis Group (2010)** Comparison between two dose of imatinib for the treatment of unresectable or metastatic GIST. *J Clin Oncol* 28 (7): 1247-1253.

- 29 **Gramza**, Corless CL, Heinrich. Resistance to TKi in GISTs. Clin Cancer Reserch 15 (24):7510-7518, 2009.
- 30 **Van Oosterom AT**, Judson IR et al. Safety and efficacy of imatinib in metastatic GISTs: a phase 1 study. Lancet 358 (9291): 1421-1423 (2001).
- 31 **Mrinal**, M. Gounder, Maki. Molecular basis for primary and secondary tyrosine Kinase inhibitor resistance in GISTs. Cancer Chemother Pharmacol 2010, 67 (suppl1): s25-s43.
- 32 **Demetri GD**, Wang Y, Wherle E et al. Imatinib plasma levels are correlated with clinical benefit in pazient with metastatic GIST. J Clin Onc 27 (19): 3141-3147 (2009).
- 33 **Miettinen M**, Makhlof H, Sobin LH, Lasota. GISTs of the jejunum and ileum: a clinicopathologic, immunohistochemical ,and molecular genetic studt of 906 cases before imatinib with long term follow up. AM J surgpathol 2006, 30:477.
- 34 **Joensuu H**. Risk stratification of patients diagnosed with GIST. Hum Pathol 2008; 39: 1411.
- 35 **Karakousis GC**, Singer S, Zheng J et al. Laparoscopic versus open gastric resections for primary GIST. Ann Surg Oncol 2011, 18: 1599.
- 36 **DeMatteo RP**, Ballman KV, Antonescu CR, et al. Adjuvant imatinib mesylate fter resection df localized, primary GIST: a randomized, double-blind, placebo-controlled. Lancet 2009, (373), 1097-1104.
- 37 **Blackstein ME**. Risk assessment for tumor recurrence after surgical resection of localized primary GIST. ASCO2010.
- 38 **Eisenberg BL**, Blanke CD, et al. Phase 2 trial of neoadjuvant/adjuvant imatinib for advanced primary GIST. J Surg Oncol 2009; 99: 42.
- 39 **Wang D**, Zhang Q, Blanke CD, et al. Phase 2 trial of neoadjuvant/adjuvant imatinib for advanced primary and metastatic/recurrent operable GIST. Long term follow up results of RTOG 0132. J Clin Oncol 2011, 29: 619S.
- 40 **Joensuu H**, Roberts PJ, Sarlomo-Rikala M, et al. Effect of TKi STI571 in a patient with a metastatic GIST. N Engl J of Med 2001; 344: 1052-1056.
- 41 **Blanke CD**, Rankin C, Demetri GD et al, Phase 3 trial randomized, intergroup trial assessing imatinib at two dose levels in patients with unresectable or metastatic GISTs expressing the KIT receptor TK. J Clin Oncol 2008; 26; 626
- 42 **Von Mehere M**, Heinrich MC, Joensuu H, et al. Follow-up results after 9 years of the ongoing, phase 2 B2222 trial of imatinib in patients with metatatic disease or unresectable GIST. J Clin Oncol 2011; 20: 690s.

- 43 **Blanke CD**, Demetri GD, von Meheren et al. Long term results from randomized phase 2 trial of standard-versus higher-dose imatinib for patients, with metastatic disease. *J Clin Oncol* 2008; 26: 620.
- 44 **Armbrust T**, Sobotta M, Gunawan B, et al. Does imatinib turn recurrent and / or metastasized GIST into a chronic disease? Single center experience. *Eur J Gastroenterol Hepathol* 2009; 21: 819.
- 45 **Verweij**, Casali PG, Zalberg J, et al. Progression Free survival in GIST with high dose of imatinib: randomised trial *Lancet* 2004; 364; 1127.
- 46 GIST Meta-analysis group. Comparison of two doses of imatinib for the treatment of unresectable or metastatic GISTS: a meta-anaysis of 1640 patients. *J ClinONCOL* 2010; 28; 1247
- 47 **Heinrich MC**, Corless CL, Demetri GD, et al. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic GIST. *J clin Oncol* 2003: 21; 4342.
- 48 **Heinrich MC**, Owzar K, Corless CL, et al. Correlation of kinase genotype and clinical outcome in the north American group phase 3 trial of imatinib for Treatment of advanced GIST. *J Clin Oncol* 2008; 26; 5360.
- 49 **Van Glabbeke M**, Owzar k, Rankin C, et al. Comparison of two doses of imatinib in the treatment of unresectable or metastatic GIST: a meta-analysis based on 1640 patients. *J Clin Oncol* 2007: 25: 546s.
- 50 NCCN guidelines: available at: [www.nccn.org](http://www.nccn.org) (accessed on october 13, 2011). 83 **Heinrich MC**, Corless CL, Demetri GD, et al. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic GIST. *J Clin Oncol* 2003; 21: 4342.
- 51 **Le Cesne A** et al. Discontinuation of imatinib in patients with advanced GIST after 3 years of treatment: an open – label multicentre andomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2010; 11: 942.
- 52 **De Metri GD**, van Oosterom AT, Garrett CR, et al. Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced GIST after failure of imatinib: a randomized controlled trial. *Lancet* 2006; 368: 1329.
- 53 **George s**, Blay Jy, Casali PG, et al. Clinical evaluation of continuous daily dosing of sunitinib in patients with advanced GIST after imatinib failure. *Eur J Cancer* 2009; 45; 1959.
- 54 **Demetri GD**, Reichardt P, Kang YK, Blay JY, Rutkowski P, Gelderblom H, Hohenberger P, Leahy M, von Mehren M, Joensuu H, Badalamenti G, Blackstein M, Le Cesne A, Schöffski P, Maki RG, Bauer S, Nguyen BB, Xu J, Nishida T, Chung J, Kappeler C, Kuss I, Laurent D,

Casali PGEfficacy and safety of regorafenib for advanced gastrointestinal stromal tumours after failure of imatinib and sunitinib (GRID): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2013 Jan 26;381(9863):295-302

55 **Wilhelm SM**, Dumas J, Adnane L, et al. Regorafenib (BAY 73-4506): a new oral multikinase inhibitor of angiogenic, stromal and oncogenic receptor tyrosine kinases with potent preclinical antitumor activity. *Int J Cancer* 2011;129:245-55.

56 **Demetri GD**, Lo Russo P, Wang D, et al. Phase 1 dose-escalation and pharmacokinetic study of dasatinib in patients with advanced solid tumours. *Clin Cancer research* 15 (19):6232-6240 (2009).

57 **Lyons JF**, Wilhelm S, Hibner B, et al. Discovery of a novel RAF kinase inhibitor. 2001 *Endocr Relat Cancer* 8 (3): 219-225.

58 **Wiebe L**, Kasza K, Maki RG. Sorafenib is active in patients with imatinib and sunitinib-resistant GIST: a phase 2 trial of university of Chicago. *J Clin Oncol* 26, 553 s abstract 10502 (2008).

59 **Soria JC**, Massard C, Magne N, Bader T et al. Phase 2 trial of oral masatinib in patient with locally advanced or metastatic GIST. *Eur J Cancer* 45(13): 2333-2341 (2009).

60 **Le Cesne A**, Blay JY, Bui BN et al. A phase 2 study of oral masatinib in imatinib naive patients with locally advanced or metastatic GIST. *Eur J Cancer* 46 (8): 1344-1351 (2010).

61 **Muhlenberg T**, Zhang Y, Wagner AJ, et al. Inhibitors of deacetylases suppress oncogenic KIT signaling, HSP90 proteins, and induce apoptosis in GIST. *Cancer Reserch* 69 (17): 6941-6950 (2009).

62 **Bauer S**, Parry JA, et al. Proapoptotic activity of bortezomib in GIST. 2010 *Cancer research* 70 (1): 150-159. 109 **Dumez H**, Reichard P., et al. A phase 1/2 trial of everolimus in combination with imatinib in patients with imatinib-resistant GIST. *J Clin Oncol* 26, 557 s abstract 10519 (2008).

63 **Andersson**, Beamer et al (2006). GISTs with exon 11 deletions are associated with poor prognosis. *Gastroenterology* (130), 1573-1581.