

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIRURGIA

EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE CD117 NO
CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE ESÔFAGO

A apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós-Graduação em Medicina-Cirurgia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre

MARCELO MARAFON MAINO
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre

2008

M225e **Maino, Marcelo Marafon**

Expressão imunoistoquímica de CD117 no carcinoma epidermóide de esôfago / Marcelo Marafon Maino ; orient. Luis Fernando Moreira ; co-orient. Jane Ulbricht Kulczynski. – 2008. 67 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Cirurgia. Porto Alegre, BR-RS, 2008.

1. Neoplasias esofágicas 2. Carcinoma de células escamosas 3. Proteínas proto-oncogênicas c-kit 4. Marcadores biológicos de tumor 5. Oncogenes 6. Imunoistoquímica I. Moreira, Luis Fernando II. Kulczynski, Jane Ulbricht III. Título.

NLM: WI 250

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Luis Fernando Moreira**, do Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) por sua dedicada orientação na realização deste trabalho, pela confiança e estímulo, pelas inúmeras horas de trabalho dispendidas e, acima de tudo, por sua imensa amizade.

À **Prof. Jane Ulbricht Kulczynski**, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da UFRGS e do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), por sua co-orientação nesta dissertação, por suas valiosas sugestões e pelo seu incondicional auxílio na análise imunohistoquímica das lâminas, que possibilitaram a realização deste trabalho.

Aos colegas **Simone Santana Contu e William Lorenzi**, pela ajuda na coleta de dados dos prontuários

Ao **Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia e aos seus coordenadores**, por possibilitarem a realização deste projeto.

Ao **Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do HCPA**, pelas orientações e sugestões.

Ao programa **FIPE do Hospital de Clínicas de Porto Alegre** e **PRODOC da CAPES (2003)** pelo custeio desta pesquisa.

À **Sra. Estela Maris Araripe**, secretária do Programa de Pós-Graduação, sempre atenciosa e solícita.

Aos **funcionários do Serviço de Patologia do HCPA**, pela preparação das lâminas.

A todas aquelas pessoas e instituições que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho fosse concluído.

À minha mãe (*in memoriam*), **Célia Maria**, e ao meu pai, **Ubirajara**, pelo exemplo e pelo apoio em todas horas da minha vida.

A minha querida esposa **Christianne**, pelo seu amor, carinho, compreensão e estímulo em todos os momentos.

Às minhas filhas, **Maria Eduarda e Gabriela**, que me motivam diariamente a ter sonhos, esperança e fé.

*“A mente que se abre a uma idéia
jamais voltará ao seu tamanho original”*

Albert Einstein

Lista de abreviaturas

AE: adenocarcinoma de esôfago

ABC: *avidin-biotin-peroxidase complex*

ATP: adenosina trifosfato

BCR-ABL: tirosina-quinase envolvida na leucemia mielóide crônica

CE: câncer de esôfago

CEE: carcinoma epidermóide de esôfago

CD117: receptor c-kit

DNA: ácido desoxirribonucléico

EGFR: *epidermal growth factor receptor*

FCT: fator células-tronco

GISTs: *gastrointestinal stromal tumors*

LMC: leucemia mielóide crônica

PDGF-R: *platelet-derived growth factor receptor*

RS: Rio Grande do Sul

SCCE: *squamous cell carcinoma of the esophagus*

TEG: tumores do estroma gastrointestinal

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma epidermóide do esôfago está entre as neoplasias malignas mais agressivas, apresentando uma incidência mundial relativamente elevada¹⁻³. O diagnóstico da doença na maioria dos pacientes é estabelecido no estágio avançado, sendo um dos cânceres mais letais em nosso meio. A cirurgia permanece como o tratamento de escolha para as lesões ressecáveis, ainda que nos pacientes operados com intenção curativa a sobrevida estimada não ultrapassa os 10% dos casos. Por este motivo, buscam-se novas alternativas de tratamento, que incluem quimioterapia neoadjuvante ou adjuvante combinada com radioterapia e cirurgia⁴⁻⁶. Entretanto, até o presente momento, não há um benefício claro em termos de sobrevida na associação de tratamentos pré ou pós-operatórios à cirurgia^{7,8}.

O câncer de esôfago tem uma incidência muito alta no Rio Grande do Sul, quando comparado a outras regiões do Brasil, sendo identificadas áreas dentro do estado que apresentam uma incidência desproporcionalmente alta. O coeficiente de mortalidade no Rio Grande do Sul em 1970 foi de 8,5/100.000 para o sexo masculino e de 2,3/100.000 para o sexo feminino. Em 1999, estes coeficientes passaram para 12,4 e 3,9 para o sexo masculino e feminino, respectivamente⁹.

Existe, atualmente, um grande esforço na procura de marcadores que permitam melhorar a triagem e o diagnóstico precoce dos tumores esofágicos. A análise molecular de marcadores preditores de câncer pode ter um papel importante na identificação de células alteradas, uma vez que pode identificar

anormalidades antes de outros métodos. Mesmo naqueles casos diagnosticados tardiamente, a identificação destes marcadores pode ter valor prognóstico, podendo determinar potencial de metastatização ou recorrência e também sensibilidade a agentes terapêuticos.

Estudos em biologia molecular de tumores esofágicos têm revelado alterações na regulação do ciclo celular, tanto no carcinoma epidérmico quanto no adenocarcinoma. As mutações ocorrem nos oncogenes EGFR, *erbB-2*, ciclina D1, em genes supressores tumorais como 3p(FHIT), Rb, p53, p16, p14ARF, e na telomerase ¹⁰⁻¹³.

Atualmente, sabe-se que as tirosino-quinases estão implicadas em várias fases da oncogênese e em diversas neoplasias. Estas enzimas atuam regulando a atividade de proteínas, como fator regulador do crescimento celular ou fator formador de colônia, essencial no desenvolvimento de melanócitos, eritrócitos, mastócitos, células germinativas e da célula intersticial de Cajal ¹⁴. Entre os receptores de tirosino-quinases, o CD117 está especificamente relacionado com os tumores do estroma gastrointestinal, o BCR-ABL com a leucemia mielóide crônica, e o PDGF-R com algumas doenças mieloproliferativas crônicas que se caracterizam por eosinofilia ^{15,16}.

Fato importante é que a expressão desses receptores nestas neoplasias está associada a uma excelente resposta a moduladores do ciclo celular ^{17,18}. O mesilato de imatinibe, um inibidor do receptor de tirosino-quinase, tem sido utilizado para o tratamento dos tumores de estroma gastrointestinal mesmo em pacientes que apresentam péssima performance com doença disseminada ¹⁹⁻²¹.

Este estudo tem como objetivo geral a investigação da expressão imunohistoquímica de CD117 no carcinoma epidermóide de esôfago, vislumbrando uma futura possibilidade terapêutica específica para este tipo de câncer.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. CÂNCER DE ESÔFAGO

O câncer de esôfago é o oitavo tumor mais comum no mundo e o quarto tumor mais comum nos países em desenvolvimento da Ásia, África e América Latina¹. Apresenta, como características, uma grande diversidade na distribuição geográfica e incidência. As razões para tais variações não são absolutamente conhecidas, embora estudos epidemiológicos sugiram influência de fatores ambientais e nutricionais.

Os dois tipos histológicos mais importantes de câncer do esôfago, o carcinoma epidermóide (CEE) e o adenocarcinoma (AE), apresentam diferenças epidemiológicas extremamente acentuadas^{1,22}. Há um verdadeiro cinturão de câncer esofágico, integrado pelo litoral do Mar Cáspio, nordeste do Irã, planícies do Turkistão e norte do Afeganistão e China. Na África do Sul, Bombaim (Índia), Norte da França e bolsões na porção setentrional da América do Sul, encontram-se áreas de alta e média incidência. O carcinoma epidermoide é mais comum nas regiões endêmicas do mundo e o adenocarcinoma nas áreas não-endêmicas, como os Estados Unidos e a maioria dos países ocidentais da Europa²³⁻²⁶. As razões para essas diferenças regionais são pouco compreendidas, contudo parece claro que nenhum fator etiológico isoladamente possa ser responsável por tal variação em áreas geográficas distintas.

No Brasil, segundo as estatísticas do Ministério da Saúde, estima-se que em 2008 o câncer de esôfago será a sexta neoplasia mais freqüente no sexo

masculino. No Rio Grande do Sul (RS), as neoplasias ocupam o segundo lugar na distribuição das causas de mortalidade logo após as doenças cardiovasculares e, dentre elas, o CE será neste ano a terceira causa em homens e a sexta em mulheres⁹. Esses coeficientes são os mais altos, quando comparados com outros estados brasileiros e com países do cone sul da América Latina.

Outra característica do câncer do esôfago é apresentar zonas de alto índice de mortalidade próximas geograficamente de outras de baixo índice, fato que também foi observado no RS, notando-se coeficientes de mortalidade quatro vezes superior de uma microrregião para outra ²⁷⁻²⁹.

Nas últimas décadas, tem ocorrido uma mudança notável na incidência e no tipo histológico do câncer do esôfago entre os indivíduos brancos. O adenocarcinoma de esôfago e cárdia, incluindo a junção esofagogástrica, tem aumentado rapidamente, especialmente em homens brancos ³⁰. Atualmente, o adenocarcinoma do esôfago representa quase 50% de todos os casos de câncer esofágico nos Estados Unidos. A causa para esse aumento é desconhecida, mas tendência similar tem sido observada na Europa ³¹. Todavia, em um estudo realizado durante dez anos em um centro de referência para câncer de esôfago no sul do Brasil mostrou uma prevalência de 15% para o adenocarcinoma e de 81% para o carcinoma epidermóide ³².

O carcinoma de esôfago é pelo menos três vezes mais comum em homens do que mulheres e apresenta pico de prevalência entre a quinta e sétima décadas. A causa do maior risco em homens é incerta, mas

provavelmente reflete diferenças dietéticas, consumo de álcool e tabaco. Embora ambos possam envolver qualquer segmento do esôfago, o carcinoma epidermóide é mais comumente encontrado no esôfago médio e o adenocarcinoma no esôfago distal ^{33,34}.

O câncer de esôfago é geralmente diagnosticado em estágios tardios, quando o prognóstico é ruim e a sobrevida raramente excede 5% a 10% ². A história natural desta doença é caracterizada pelo extenso crescimento local com invasão direta das estruturas mediastinais, metástases linfáticas e disseminação à distância. A cirurgia é a principal opção terapêutica, mas com limitações inerentes impostas pelas características anatômicas e biológicas, estágio e localização do tumor. Outras modalidades terapêuticas, como a quimioterapia e a radioterapia, têm sido associadas à cirurgia objetivando a mudança deste cenário, mas nenhuma melhora significativa foi relatada até o momento ³⁵⁻³⁸. Por outro lado, a constatação de que pacientes com tumores menores do que 1 cm apresentaram sobrevida em cinco anos de 83%, demonstrou que o diagnóstico precoce é um importante fator prognóstico ³. Assim sendo, justifica-se o esforço na realização do rastreamento do câncer de esôfago e no aprimoramento dos métodos para detecção precoce de células tumorais, além da pesquisa de parâmetros prognósticos mais objetivos e que possam ser obtidos ainda nas fases iniciais da doença ³⁹.

A carcinogênese esofágica consiste em um processo complexo de múltiplas etapas e, certamente, de etiologia multifatorial. Alguns elementos são necessários na iniciação do processo neoplásico, enquanto outros parecem

atuar na progressão do tumor. Alguns autores sugerem que o câncer de esôfago provém da associação de três fatores carcinogênicos: fatores predisponentes, como deficiências vitamínicas e esofagites, fatores mutagênicos, como os compostos nitrosos, tabaco e bebidas alcoólicas, e fatores promotores, como os ésteres presentes em algumas bebidas alcoólicas ⁴⁰.

2.2. MARCADORES ONCOGÊNICOS

A análise molecular do tecido esofágico tem um papel fundamental na identificação de células displásicas, uma vez que pode detectar malignidade antes das mudanças fenotípicas observadas por métodos convencionais. Demonstra, basicamente, mutações nos genes envolvidos no controle do ciclo celular. Estes marcadores oncogênicos são, principalmente, os oncogenes e genes supressores tumorais ⁴¹⁻⁴².

Os oncogenes são seqüências de DNA que expressam proteínas controladoras da proliferação, diferenciação e morte celular. Eles são versões somaticamente mutadas de genes celulares normais ou proto-oncogenes, e codificam proteínas que governam passos cruciais no crescimento, diferenciação e morte programada da célula. Tais alterações levam a uma perda ou ganho de função da proteína codificada pela seqüência alterada e à conseqüente transformação maligna. Nas últimas décadas, centenas de proteínas já foram identificadas como causadoras de tumores. Entretanto, nenhum oncogene é capaz de induzir isoladamente uma célula normal para o fenótipo maligno. A

combinação de pelo menos dois oncogenes tem de estar presente para que ocorra a transformação maligna.

Ao contrário dos proto-oncogenes, as formas normais dos genes supressores de tumor condicionam a síntese de proteínas que são inibidoras de fatores de proliferação e, desse modo, regulam negativamente a proliferação celular. Mutações nesses genes têm caráter recessivo, sendo necessária a perda de duas cópias do gene normal para manifestação do fenótipo maligno, que nesses casos, resulta na ausência da proteína. As alterações mais encontradas nos tumores associados a esses genes são, portanto, deleções que propiciam a inativação gênica, por perda total ou parcial da seqüência correspondente, ou mutações de ponto que resultam em proteína inativa.

De um ponto de vista rudimentar, o câncer pode ser visto como uma doença genética na qual a célula progenitora que gera o tumor, parece ter adquirido um número crítico de mutações nos genes, que irão afetar o crescimento ou a diferenciação celular. Essas mutações podem ocorrer nos oncogenes ou genes supressores tumorais até atingirem um limiar após o qual a célula maligna irá proliferar de forma incontrolável. Cada uma destas mutações é transmitida para a progenia desta célula. A progenia constitui um clone com todos os membros geneticamente similares ou idênticos à célula progenitora. Em princípio, qualquer mutação ou produto de gene que contribua para o fenótipo maligno é um alvo para o diagnóstico do câncer⁴³.

Entre as técnicas utilizadas para o diagnóstico molecular do câncer, a imunistoquímica se baseia no uso de anticorpos direcionados contra

marcadores antigênicos. Os anticorpos podem ser policlonais, derivados do soro de animais imunizados, ou monoclonais, derivados de hibridomas de ratos. Esta técnica é usada principalmente para detectar genes específicos ou proteínas mutantes, produtos de oncogenes ou genes supressores tumorais. As vantagens da imunistoquímica incluem a rapidez, a possibilidade de medir os resultados com a citometria de fluxo e a habilidade de relacionar a localização antigênica com a seção de tecido corado ao microscópio. Entre as desvantagens estão a destruição de muitos epitopes antigênicos pela fixação dos tecidos e a variação de sensibilidade e especificidade das diferentes preparações de anticorpos.

Estudos em biologia molecular de tumores esofágicos têm revelado alterações na regulação do ciclo celular, tanto no carcinoma epidérmico quanto no adenocarcinoma. As mutações ocorrem nos oncogenes EGFR, *erbB-2*, ciclina D1, e em genes supressores tumorais como 3p (FHIT), Rb, p53, p16, p14ARF, e na telomerase. Aproximadamente 40 a 60% dos carcinomas de esôfago e 30% das lesões precursoras hiperexpressam ciclina D1. O produto do gene p53 regula a progressão do ciclo celular, o reparo do DNA, a neovascularização e a apoptose; 50 a 80% dos carcinomas esofágicos apresentam mutações do p53. O processo de malignização também requer a ativação da telomerase, uma rionucleoproteína que adiciona hexâmeros de DNA às extremidades dos cromossomos para prevenir a perda do comprimento do telômero na replicação do DNA. Uma expressão elevada de telomerase é encontrada em displasias de alto grau, assim como em todos os carcinomas esofágicos ²³.

A complexidade que envolve as rotas de sinalização celular no câncer dificulta o isolamento de alvos específicos passíveis de manipulação por agentes anticancer. Contudo, o crescente esforço científico tem identificado alguns alvos moleculares potenciais. Almeja-se o desenvolvimento de terapias que possam minimizar a toxicidade sem prejuízo da ação antitumoral da medicação. Atualmente, estão sendo pesquisados os seguintes potenciais agentes anticâncer: (1) moduladores da angiogênese – agentes capazes de estabilizar ou prolongar a progressão tumoral; (2) inibidores de quinases – que diminuem a proliferação celular; (3) inibidores de metaloproteinases – que inibem ou retardam o processo de invasão tumoral; (4) agentes modificadores do *status* oxidativo celular – que podem agir como supressores tumorais; (5) inibidores de topoisomerasas; (6) inibidores de proteasoma; (7) inibidores de chaperones; (8) inibidores de receptores; (9) inibidores de mediadores inflamatórios; (10) inibidores de fatores de crescimento ⁴⁴⁻⁴⁹.

2.3. CD117

As tirosino-quinases são enzimas que catalizam a fosforilação de resíduos de tirosina em proteínas, com ATP ou outros nucleotídeos como doadores de fosfato. O receptor é dividido em um domínio extracelular no qual se localiza o sítio de ação do ligante, um domínio hidrofóbico de fixação transmembrana e um domínio intracelular. Após ativação induzida pelo ligante, os receptores sofrem um processo de dimerização, resultando na ativação da molécula de tirosino-quinase.

A tirosino-quinase KIT, um tipo de ciclina, vem sendo amplamente investigada em relação a sua função no ciclo celular. Sabe-se que a ativação de seu receptor, conhecido como c-kit, que é expresso na imunoistoquímica pela proteína CD117 através do seu ligante habitual - fator de células-tronco (FCT) é essencial para o desenvolvimento das células tronco ^{50,51}. Estas enzimas atuam regulando a atividade de proteínas, como fator regulador do crescimento celular de melanócitos, eritrócitos, mastócitos, células germinativas e da célula intersticial de Cajal ^{52,53}.

As tirosino-quinases apresentam uma particular relevância nas doenças humanas como o câncer, tendo sido implicadas no desenvolvimento e no crescimento maligno de melanomas, leucemias, neoplasias mielóides, neoplasias germinativas, de mama, e de pulmão ⁵⁴⁻⁵⁷. Os receptores de tirosino-quinase CD117 e BCR/ABL estão especificamente relacionados com os tumores do estroma gastrointestinal e com a leucemia mielóide crônica, respectivamente.

Um dos acontecimentos mais significativos no desenvolvimento de terapias com alvos moleculares foi o desenvolvimento do mesilato de imatinibe, um derivado da 2-fenilaminopirimidina, que atua como inibidor de tirosino-quinase com alta especificidade para CD117, BCR/ABL e PDGF-R. Este inibidor liga-se competitivamente ao sítio de ligação do ATP do receptor de tirosino-quinase, impedindo a fosforilação do receptor e a transmissão intracelular do sinal ⁵⁸.

O imatinibe tem revolucionado o tratamento da leucemia mielóide crônica (LMC), com acentuada melhora no prognóstico em todas três fases – crônica,

acelerada e blástica. Muitos pacientes com LMC apresentam resposta citogenética em mais de 80% dos casos. O composto inibe a proliferação e induz apoptose em linhagens BCR-ABL-positivas, bem como em células leucêmicas de LMC, positivas para o cromossomo Philadelphia ⁵⁹⁻⁶².

Os tumores de estroma gastrointestinal (TEG), em particular, parecem depender basicamente de uma alteração de CD117 para o seu desenvolvimento. A quimioterapia para estes tumores apresentava resultados desanimadores, e não havia opção terapêutica para pacientes com doença metastática. Os estudos com imatinibe mostraram índices de resposta entre 60 e 80%, mesmo em pacientes que apresentavam péssima performance com doença disseminada ⁶³⁻⁶⁴.

A revolução ocorrida na pesquisa oncológica mostrou que câncer é, essencialmente, uma doença genética. Mutações em oncogenes, supressores tumorais e de estabilidade cromossômica representam, em última análise, o mecanismo responsável pela carcinogênese. Ao longo dos últimos anos diversos genes envolvidos no surgimento do câncer foram identificados e finalmente caracterizados ⁶⁵. A expectativa é que o desenvolvimento de fármacos que apresentem elevada especificidade para alvos moleculares, aumentará a eficácia do tratamento com a concomitante redução dos efeitos adversos ⁶⁶.

Neste cenário, seria ideal evoluir para uma análise farmacogenética/genômica na terapia do câncer, utilizando estes dados como base para projeções prognósticas mais precisas e adoção de medidas mais eficazes e menos tóxicas. O agente terapêutico ideal seria aquele que atuasse

como monoterapia atuando sobre um alvo comum a diversos tumores. Admitindo esta evolução, é possível imaginar que num futuro próximo, a evolução genômica leve ao desenvolvimento de kits que permitam a análise de todos genes relevantes para resposta a um fármaco.

3. REFERÊNCIAS

1. Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of Cancer Incidence, Mortality, and Prevalence across Five Continents: Defining Priorities to Reduce Cancer Disparities in Different Geographic Regions of the World. *J Clin Oncol* 2006; 24(14):2137-2150.
2. Day NE, Varghese C. Oesophageal Cancer. *Cancer Surv* 1994; 19-20:43-54.
3. Ribeiro U Jr, Posner MC, Safatle-Ribeiro AV, Reynolds JC. Risk factor for squamous cell carcinoma of the esophagus. *Br J Surg* 1996; 83:1174-1185.
4. Iyer R, Wilkison N, Demmy T, Javle M. Controversies in the multimodality management of locally advanced esophageal cancer: evidence-based review of surgery alone and combined-modality therapy. *Ann Surg Oncol* 2004; 11:335-673.
5. Fiorica F, Di Bona D, Schepis F, Licata A, Shahied L, Venturi A, Falchi AM, Craxi A, Cammà C. Preoperative chemoradiotherapy for oesophageal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Gut* 2004; 53: 925-930.
6. Urschel JD, Vasan H. A meta-analysis of randomized controlled trials that compared neoadjuvant chemoradiation and surgery to surgery alone for resectable esophageal cancer. *Am J Surg* 2003; 185:538-543.
7. Stahl M, Stuschke M, Lehmann N, Meyer HJ, Walz MK, Seeber S, Klump B, Budach W, Teichmann R, Schmitt M, Schmitt G, Franke C, Wilke H. Chemoradiation with and without surgery in patients with locally advanced squamous cell carcinoma of the esophagus. *J Clin Oncol* 2005; 24:2310-2317.

8. Urba SG, Orringer MB, Turrisi A, Iannettoni M, Forastiere A, Strawderman M. Randomized trial of preoperative chemoradiation versus surgery alone in patients with locoregional esophageal carcinoma. *J Clin Oncol* 2001; 19: 305-313.
9. INCA – Ministério da Saúde do Brasil. www.inca.gov.br.
10. Faccini FP, Toneto JE, Moreira LF. Molecular screening in esophageal cancer. *South-American J Cancer* 1997; 1:272-280.
11. Fagundes RB, Melo CR, Putten AC, Moreira LF, de Barros SG. P53 immunexpression: an aid to conventional methods in the screening of precursor lesions of squamous esophageal cancer in patients at high-risk? *Cancer Detect Prev* 2005; 29: 227-232.
12. Montesano R, Hollstein M, Hainaut P. Genetic alterations in esophageal cancer and their relevance to etiology and pathogenesis: a review. *Int J Cancer* 1996; 69: 225-235.
13. Jankowski J, Jankowski R, Wormsley KG. Oesophageal carcinoma: the need for screening. *Eur J Cancer Prev* 1993; 2: 5-12.
14. Poole DP, Van Nguyen T, Kawai M, Furness JB. Protein Kinases expressed by interstitial cell of Cajal. *Histochem Cell Biol* 2004;121:21-30.
15. de Silva CM, Reid R. Gastrointestinal stromal tumors (GIST): c-kit mutations, CD117 expression, differential diagnosis and target cancer therapy with Imatinib. *Pathol Oncol Res* 2003; 9:13-19.
16. Kurzrock R, Kantarjian HM, Druker BJ, Talpaz M. Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics. *Ann Intern Med* 2003; 138:819-830.

17. Demetri GD. Targeting the molecular pathophysiology of gastrointestinal stromal tumors with imatinib. Mechanisms, successes, and challenges to rational drug development. *Hematol Oncol Clin North Am* 2002; 16: 1115-1124.
18. Heinrich MC, Blanke CD, Druker BJ, Corless CL. Inhibition of KIT tyrosine kinase activity: a novel molecular approach to the treatment of KIT-positive malignancies. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1692-1703.
19. Dagher R, Cohen M, Williams G, Rothmann M, Gobburu J, Robbie G, Rahman A, Chen G, Staten A, Griebel D, Pazdur R. Approval summary: imatinib mesylate in the treatment of metastatic and/or unresectable malignant gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3034-3038.
20. Gold JS, Dematteo RP. Combined surgical and molecular therapy: the gastrointestinal stromal tumor model. *Ann Surg* 2006;244:176-184.
21. Efron DT, Lillemoe KD. The current management of gastrointestinal stromal tumors. *Adv Surg* 2005;39:193-221.
22. Posner MC, Forastiere AA, Minsky BD. Cancer of the esophagus. Principles and practice of Oncology. 7th edition, De Vita VT, Hellmam S, Rosemberg S. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 2004, pp 861-909.
23. Pottern LM, Morris LE, Blot WJ, Ziegler RG, Fraumeni Jr F. Esophageal cancer among black men in Washington, D. C. 1. Alcohol, tobacco, and other risk factors. *J Natl Cancer Inst* 1981; 67: 777-783.
24. Simonato L, Franceschi S, Zambon P. A population at high risk for esophageal cancer in the north-east of Italy. *Mutat Res* 2000; 462: 355-363.
25. National Cancer Institute - US National Institutes of Health. www.cancer.gov.

26. Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 2000; 50:7-33.
27. Prolla JC, Dietz J, Costa JA. Diferenças geográficas na mortalidade por câncer de esôfago no Rio Grande do Sul. *Rev Assoc Méd Brás* 1993; 39: 217-220.
28. Prolla JC, Furtado JD, Barcelos LB. Alguns aspectos da epidemiologia do câncer do esôfago no Rio Grande do Sul, Brasil, 1970-1979. Porto Alegre, *Revista Ass Méd AMRIGS* 1983; 27: 26-32.
29. Allen JW, Richardson JD, Edwards MJ. Squamous cell carcinoma of the esophagus: a review and update. *Surg Oncol* 1997; 6:193-200.
30. Blot WJ, Mc Laughlin JK. The changing epidemiology of esophageal cancer. *Seminars in Oncology* 1999; 26: 2-8.
31. Crew KD, Neugut AI. The epidemiology of upper gastrointestinal malignancies. *Semin Oncol* 2004; 31:450-464.
32. Barros SG, Vidal RM, Luz LP, Ghisolfi ES, Barlem GG, Kruel CD, Prolla JC. Prevalence of adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction in a 10 year period at a referral center in Southern Brazil. *Arq Gastroenterol* 1999; 36: 32-36.
33. Daly JM, Fry WA, Little AG, Winchester DP, McKee RF, Stewart AK, Fremgen AN. Esophageal cancer: results of an College of Surgeons Patient Care Evaluation Study. *J Am Coll Surg* 2000; 190: 562-572.

34. Brentano L, Schirmer CC, Gurski R. Curability of epidermoid carcinoma of esophagus: Experience of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre 1990, XXVII World Congress of International College of Surgeons (abstract).
35. Iyer R, Wilkison N, Demmy T, Javle M. Controversies in the multimodality management of locally advanced esophageal cancer: evidence-based review of surgery alone and combined-modality therapy. *Ann Surg Oncol* 2004; 11:335-673.
36. Urschel JD, Vasan H. A meta-analysis of randomized controlled trials that compared neoadjuvant chemoradiation and surgery to surgery alone for resectable esophageal cancer. *Am J Surg* 2003; 185:538-543.
37. Stahl M, Stuschke M, Lehmann N, Meyer HJ, Walz MK, Seeber S, Klump B, Budach W, Teichmann R, Schmitt M, Schmitt G, Franke C, Wilke H. Chemoradiation with and without surgery in patients with locally advanced squamous cell carcinoma of the esophagus. *J Clin Oncol* 2005; 23:10-2317.
38. Urba SG, Orringer MB, Turrisi A, Iannettoni M, Forastiere A, Strawderman M. Randomized trial of preoperative chemoradiation versus surgery alone in patients
39. Nicolas Pérez D, Quintero E, Parra Blanco A. Screening the at-risk population for squamous cell carcinoma of the esophagus. *Gastroenterol Hepatol* 2005;28:337-346.
40. Malafaia O. Tumores do esôfago. In: Dani R, Castro LP. Gastroenterologia Clínica 3ª edição, Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 1992 pp. 428-445.
41. Hall CC, Herring JA, Hall TJ. Molecular oncology and the surgeon. *The American Surgeon* 1995;61:156-160.

42. Krontiris TG. Oncogenes. *N Eng J Med* 1995;333:303-306.
43. Bishop JM. Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 1991;64:235-248.
44. Chan KK, Oza AM, Siu LL. The statins as anticancer agents. *Clin Cancer Res* 2003; 9:9-10.
45. Ding HF, Fisher DE. Induction of apoptosis in cancer: new therapeutic opportunities. *Ann Med* 2002; 34:451-469.
46. Fabbro D, Ruetz S, Buchdunger E, Cowan-Jacob SW, Fendrich G, Mestan J, O'Reilly T, Traxler P, Chaudhuri B, Fretz H, Zimmermann J, Meyer T, Caravatti G, Furet P, Manley PW. Protein kinases as targets for anticancer agents: from inhibitors to useful drugs. *Pharmacol Ther* 2002; 93:79-98.
47. Galmarini CM, Mackey JR, Dumontec C. Nucleoside analogues and nucleobases in cancer treatment. *Lancet Oncol* 2002; 3:415-424.
48. Levitzki A. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *Eur J Cancer* 2002;38 Suppl 5:S11-18.
49. Scappaticci FA. Mechanisms and future directions for angiogenesis-based cancer therapies. *J Clin Oncol* 2002; 20:3906-3927.
50. Yamamoto K, Tojo A, Aoki N, Shibuya M. Characterization of the promoter region of the human c-kit proto-oncogene. *Jpn J Cancer Res* 1993; 84: 1136-1144.
51. Ashman LK. The biology of stem cell factor and its receptor c-kit. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31: 1037-1051.

52. Lammie A, Drobnjak M, Gerald W, Saad A, Cote R, Cordon-Cardo C. Expression of c-kit and kit ligand proteins in normal human tissues. *J Histochem Cytochem* 1994; 42: 1417-1425.
53. Poole DP, Van Nguyen T, Kawai M, Furness JB. Protein Kinases expressed by interstitial cell of Cajal. *Histochem Cell Biol* 2004;121:21-30.
54. Matsuda R, Tahahashi T, Nakamura S, Sekido Y, Nishida K, Seto M, Seito T, Sugiura T, Ariyoshi Y, Takahashi T. Expression of c-kit protein in human solid tumors and in corresponding fetal and adult normal tissues. *Am J Pathol* 1993; 142: 339-346.
55. Cohen PS, Chan JP, Lipkuns kaya M, Biedler JL, Seeger RS. Expression of stem cell factor and c-kit in human neuroblastoma. *Blood* 1994;84:3465-3472.
56. Arber DA, Tamayo R, Weiss LM. Paraffin section detection on the c-kit gene product (CD117) in human tissues: value in the diagnosis of mast cell disorders. *Human Pathol* 1998;29:498-504.
57. Pelosi G, Barisella M, Pasini F, Leon ME, Veronesi G, Spaggiari L, Fraggetta F, Iannucci A, Masullo M, Sonzogni A, Maffini F, Viale G. CD117 immunoreactivity in stage I adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung: relevance to prognosis in a subset of adenocarcinoma patients. *Mod Pathol* 2004;17:711-721.
58. Radford IR. Imatinib. Novartis. *Curr Opin Investig Drugs* 2002; 3:492-49946.
59. Jabbour E, Cortes JE, Giles FJ, O'Brien S, Kantarjian HM. Current and emerging treatment options in chronic myeloid leukemia. *Cancer* 2007;109:2171-2181.

60. Ault P. Overview of second-generation tyrosine kinase inhibitors for patients with imatinib-resistant chronic myelogenous leukemia. *Clin J Oncol Nurs* 2007;11:125-129.
61. Johnson JR, Bross P, Cohen M, Rothmann M, Chen G, Zajicek A, Gobburu J, Rahman A, Staten A, Pazdur R. Approval summary: imatinib mesylate capsules for treatment of adult patients with newly diagnosed philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in chronic phase. *Clin Cancer Res* 2003; 9:1972-1979.
62. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S, Sawyers CL. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2001;344:1031-1037.
63. de Silva CM, Reid R. Gastrointestinal stromal tumors (GIST): c-kit mutations, CD117 expression, differential diagnosis and target cancer therapy with Imatinib. *Pathol Oncol Res* 2003; 9:13-19.
64. Dagher R, Cohen M, Williams G, Rothmann M, Gobburu J, Robbie G, Rahman A, Chen G, Staten A, Griebel D, Pazdur R. Approval summary: imatinib mesylate in the treatment of metastatic and/or unresectable malignant gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3034-3038.
65. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 2004;10:789-799.

66. Sleijfer S, Wiemer E, Verweij J. Drug Insight: gastrointestinal stromal tumors (GIST) – the solid tumor model for cancer-specific treatment. *Nat Clin Pract Oncol* 2008;5:102-111.

4. OBJETIVO

Objetivo Geral

Determinar a prevalência da expressão imunoistoquímica de CD117 no carcinoma epidermóide de esôfago.

5. ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS

CD117 expression in squamous cell carcinoma of the esophagus

Running Head: c-kit in esophageal tissue

Marcelo Marafon Maino, MS

William Lorenzi, BS

Simone Santana Contu, MS

Jane Ulbricht Kulczynski, MD

Luis Fernando Moreira, MD*

*Request off-prints and correspondence:

Luis F. Moreira, MD

Southern Surgical Oncology Group

Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul

91.035.095 Ramiro Barcelos 2400, Porto Alegre, RS, Brazil

Email: bruce@cpovo.net

ABSTRACT

Aim: To investigate the CD117 expression in specimens of patients with squamous cell carcinoma of the esophagus (SCCE).

Methods: A pilot study was performed for CD117 immunoreactivity, using a monoclonal antibody against CD117 (DAKO), on 27 esophageal squamous cell carcinoma specimens from patients who underwent surgical resection at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre University Hospital, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. As a control group, specimens of esophageal mucosa obtained from 10 healthy subjects were also studied.

Results: Twenty-one (78%) males and six (12%) females with median (sd) age of 58 (8) years, ranging from 36 to 77 years. Most of the patients were of TNM stage IIb or III and mean overall survival was 21 (2 to 72) months. Cytoplasmic membrane CD117 immunoreactivity was demonstrated in only 4 (15%) out of 27 tumors and in none of the controls (0%).

Conclusions: These results suggest that the decreased expression of CD117 may be due to lack of control of the cell cycle in SCCE. Additional studies are needed to better define the role of the CD117 in such tumors.

Key words: Esophageal cancer; Squamous cell carcinoma; CD117; Carcinogenesis; Immunohistochemistry; Oncogenes; Cell cycle

INTRODUCTION

Squamous cell carcinoma of the esophagus (SCCE) is a highly aggressive neoplasm. Statistically, esophageal carcinoma is the sixth leading cause of cancer death worldwide. It is widespread in many parts of the world, particularly in developing nations. In southern Brazil, in the state of Rio Grande do Sul, SCCE may reach an estimated prevalence of 19.7 and 7.6 cases/100000 men or women in 2008¹⁻³.

At presentation, the overwhelming majority of patients has locally or regionally advanced or disseminated tumors. Surgical treatment has traditionally been the approach choice for patients with resectable tumors. The combined modality approach of chemotherapy, radiotherapy or chemo-radiotherapy with surgery have not shown a significant improvement in overall survival rate, which rarely exceed 5% to 10% in 5 years for western countries. The underlying reasons for this disappointingly low survival rate are multifold: ineffective screening tools, cancer detection at an advanced stage, high risk for recurrent disease after esophagectomy, definitive chemo-radiotherapy, mutated expression of tumor suppressor genes leading to decreased response to therapy⁵ and limited survival achieved with isolated palliative chemotherapy for patients with metastatic or unresectable disease⁴⁻⁸.

Several risk factors for development of esophageal carcinoma have been identified, such as smoking and alcohol consumption, but the molecular mechanisms related to the esophageal carcinogenesis remain under investigation. Changes in specific genes which play important roles in several cellular functions such as adhesion, signal transduction, differentiation or DNA development and repair, as well as apoptosis have been identified^{5, 9-12}.

CD117 (KIT) is a transmembrane tyrosine kinase that acts as a receptor for stem cell factor or kit ligand. It belongs to the type III family of receptor kinases and it can be detected in several normal cell types including hematopoietic cells, germ cells, interstitial cells of Cajal, ductal breast epithelium, mast cells and melanocytes¹³⁻¹⁵. This molecule is also consistently expressed in a number of tumors, such as gastrointestinal stromal tumors (GISTs), seminoma/dysgerminoma, acute myelogenous leukemia, neuroblastoma, Ewing's sarcoma, mast cell disorders, and small-cell or large-cell neuroendocrine carcinoma of the lungs¹⁶⁻²⁰. In GISTs, the frequency of CD117 positivity is as high as 90% to 95% that immunohistochemical CD117 detection is considered a requirement for histologic diagnosis of GISTs.

Distinct efficacy and toxicity of traditional cancer therapies have led to the development of new target-based agents. In this context CD117 expression is of topical interest because CD117 is one of targets of the tyrosine kinase inhibitor imatinib mesylate, that was shown to be effective in the treatment of GISTs and chronic myeloid leukemia, since it targets the protein-kinase function^{21, 22}.

The aim of present study was to evaluate the immunohistochemical expression of CD117 in squamous cell carcinoma of the esophagus, in an attempt to determine whether this kinase plays a specific role in the esophageal carcinogenesis allowing any blocking therapy in the future if possible.

METHODS

Patients

In this pilot study, we retrospectively studied 27 cases of squamous cell carcinoma of the esophagus whose patients underwent surgical resection at Hospital de Clínicas de Porto Alegre University Hospital, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil between 1992 and 2002. Clinical data were noted from patient records. As a control group, 10 tissue specimens of esophageal mucosa of healthy volunteers were studied. The study was performed by the Southern Surgical Oncology Group, of the Post-Graduate Program of Surgery, Faculty of Medicine, after approval by the Ethics and Scientific Committees of the University Hospital.

CD117 immunohistochemistry

Immunohistochemical assessment was performed using a monoclonal antibody anti-CD117 (DakoCytomation, San Diego, CA, USA) diluted at 1:50. To determine the antibody reactivity, the avidin-biotin peroxidase complex (ABC method; Kit LSAB DAKO) was used. The procedure was carried out at the Pathology Unit of University Hospital. As positive controls for the immunohistochemical reaction, interstitial cells of Cajal known to express CD117 were used. All immunostaining reactions were evaluated by the same pathologist (JUK) unaware of patient identity, tumor condition or clinical outcome.

The slides were analyzed following a score of 0 to 3+, where 0, meant completely negative; 1+ weakly positive; 2+ moderately positive; 3+ strongly positive (Table 1). Only staining scored 2+ and 3+ at the membranous site (no cytoplasmic staining considered) were considered positive. Variables were described as mean, percentages, standard deviation and standard errors or chi-square or Fischer exact test where appropriate. Statistical significance was considered for at the 5% level for a confidence interval of 95%.

RESULTS

Tumor grade was considered according to the World Health Organization classification as follows: Three (11%) patients presented a well differentiated, 22 (82%) a moderately differentiated and 2 (7%) poorly differentiated tumors.

Twenty-one (78%) patients were male and six (12%) female. The median (sd) age was 58 (8) and ranged from 36 to 77 years.

The depth of invasion, according to TNM classification was variable, with majority of the cases were stage III ($n = 21$; 78%). The median (sd) survival time was 21 (8) ranging 2 to 72 months.

The immunohistochemical reaction produced by the anti-CD117 antibody was considered positive in four cases (15%).

Table 1 – Classification of CD117 expression determined by immunochemical method

Score	Expression	Staining pattern
0	negative	No staining is observed, or membrane staining is less than 10% of the tumor cells.
1+	negative	A faint barely perceptible membrane staining is detected in more than 10% of the tumor cells. The cells are only stained in part of the membrane.
2+	positive	A weak to moderate complete membrane staining is observed in more than 10% of the tumor cells.
3+	positive	A strong complete membrane staining is observed in more than 10% of the tumor cells.

Table 2 – Clinical and pathological features

Characteristics	n	Percent
Gender		
male/female	21:6	78:22
Tumor site		
middle third	10	37
distal third	17	63
Histological grade (CD117 expression)		
well differentiated	3 (1)	33,3
moderately differentiated	22 (2)	9
poorly differentiated	2 (1)	50
total (CD117 expression)	27 (4)	15
Staging		
I	1	3.7
IIB	5	18.5
III	21	77.8



Figure 1 – Esophageal positive sample for CD117 immunohistochemistry expression (ABC method) (arrow); cytoplasmic expression

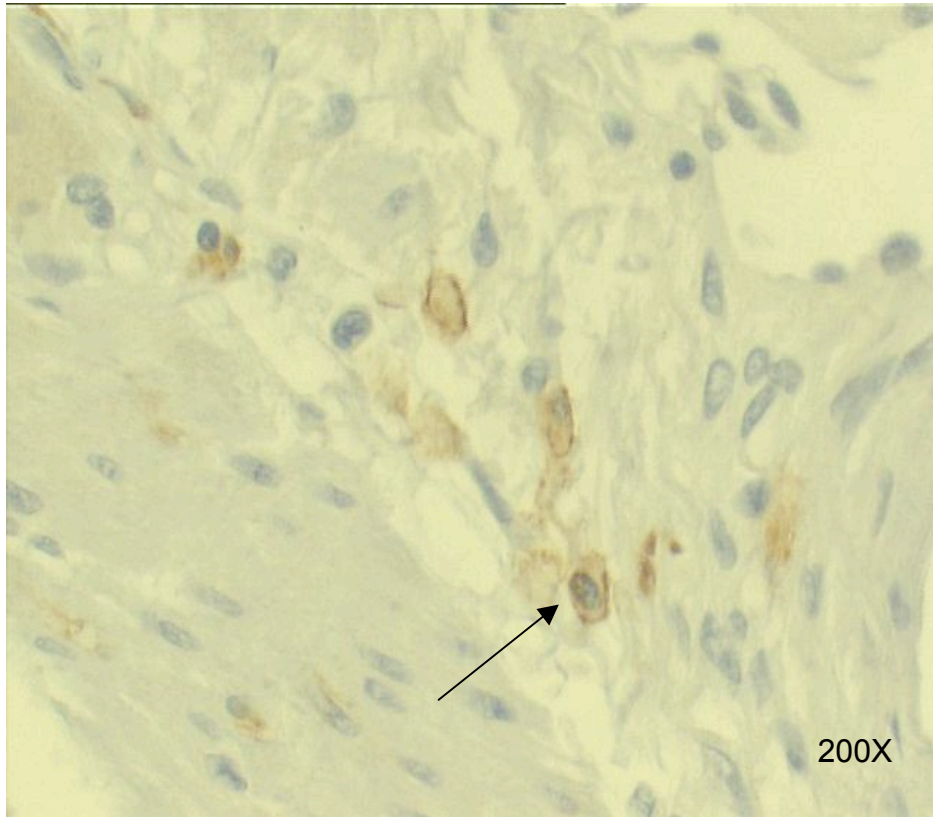


Figure 2. Cajal Cell (arrow) as a positive control (IHC, ABC method)

DISCUSSION

Squamous cell carcinoma of esophagus (SCCE) is still a disease of poor prognosis. Many therapies, such chemotherapy and radiotherapy, have been combined with surgery in order to change this scenario, yet no clear improvement on survival have been reported so far. The outcome of patients with advanced disease, the most common clinical presentation, is still very poor, and 5-year survival rates rarely exceed 10% in western countries. SCCE is highly prevalent in Southern Brazil and mortality rate in this region can be 14.3 and 4.2 per 100000 inhabitants for men and women respectively².

The multiple stage of esophageal carcinogenesis has been histologically defined. It has been established that esophageal carcinoma usually evolves through a series of progressively severe histopathologic changes which involves dysplasia of the epithelium, carcinoma *in situ* and, finally, invasive tumor. Based on the concept that precancerous cells may have early alterations at a molecular level, identification of new potential biomarkers might play an important role in detection of high-risk lesions for malignant transformation and early diagnosis of SCCE^{10, 23}.

Immunohistochemistry is nowadays a simple, reproducible way to assess the expression of oncogenic factors in paraffin-embedded samples from cancer tissues. It is therefore more routinely used to study the expression of new potential therapeutic targets and to determine which patients are the most predictable to respond to these specific therapies⁵.

The achieved improvements on molecular biology certainly favor an adequate method for molecular screening, and may result in early diagnosis allowing curative therapy. CD117, a trans-membrane tyrosine kinase receptor, has been immunoexpressed in a large variety of human neoplasms. Little, however, is known about the prevalence and clinical implications of CD117 in SCCE.

CD117 expression in malignant tumors is of crucial interest because CD117 is one of the targets of the tyrosine kinase inhibitor imatinib mesylate. Imatinib initially was shown to be effective in the treatment of chronic myeloid leukemia, in which it targets the kinase function of the BCR/ABL fusion protein. Subsequently, significant treatment responses were also reported in patients with advanced CD117-positive gastrointestinal stromal tumors (GISTs). It has been suggested that the response rate to imatinib may be particularly high in CD117-expressing tumors that also harbor activating CD117 mutations.

Went and colleagues studied the prevalence of CD117 expression in more than 3.000 human tumors from 120 different tumor types by immunohistochemistry in a tissue microarray set. The epidemiologically most important CD117-positive tumors included GIST (100%), seminoma (84%), malignant melanoma (36%), large-cell (17%) and small-cell carcinoma of the lungs (7%). For squamous cell carcinomas of the esophagus, immunoreactivity was documented in 2 out of 34 (5%)²⁴.

Zhang et al. studied the expression of CD117 in tumor tissue, surrounding-tumor tissue and normal tissue of 50 specimens of either squamous or

adenocarcinoma of esophageal tumors. The strong expression rate was low in tumor, para-tumor, and normal tissues (4%, 4%, and 12%), respectively ²⁵. Likewise, patients in that series presented with tumors of middle and lower esophagus.

Also, no statistically significant differences were noted for CD117 expression and differentiation, depth of invasion, lymph node metastasis or stage and these findings are in agreement with those results of Zhang et al.²⁵

Gilbault et al. evidenced a very rare expression of CD117 in SCCE – less than 3% of the cases (3/107). The use of external or internal positive controls (positive mastocytes in cancer stromal reaction for CD117) during immunohistochemical procedures has ruled out the hypothesis of false-negative reactions²⁶.

In the present study, the authors found 15% of overexpression of CD117, which is 3-fold higher than the expression reported by Zhang et al for both squamous and adenocarcinomas. This difference, maybe be explained by the fact that up to date to our knowledge, this is the first study addressing cancer patients from an area with high incidence squamous cell carcinomas of the esophagus and that tumors in this series were of slightly more advanced stage (66% vs 78%) as compared to Zhang et al. series²⁵.

In conclusion, our investigation suggests that CD117 should be further investigated to better determine its potential use as a biomarker of SCCE within a range of alternative monoclonal antibody therapy. The poor prognosis of esophageal cancer with the current available therapies and the good promising

response of certain tumors to the specific receptor tyrosine-kinase inhibitors, must encourage additional studies analyzing this cell surface marker in other esophageal cancer populations.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially granted by the Research Fund from Hospital de Clínicas de Porto Alegre University Hospital and the PRODOC-CAPES 2003 Developing Program for Post-graduate Institutions.

REFERENCES

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* 2001; 94: 153-156.
2. INCA – Ministério da Saúde do Brasil (www.inca.gov.br); captured in 30th October, 2008.
3. Ribeiro U Jr, Posner MC, Safatle-Ribeiro AV, Reynolds JC. Risk factors for squamous cell carcinoma of the esophagus. *Br J Surg* 1996; 83: 1174-85.
4. Lyer R, Wilkison N, Demmy T, Javle M. Controversies in the multimodality management of locally advanced esophageal cancer: evidence-based review of surgery alone and combined-modality therapy. *Ann Surg Oncol* 2004; 11:335-673.
5. Moreira LF, Naomoto Y, Kamikawa Y, Hamada M, Orita K. Assessment of apoptosis in oesophageal carcinoma preoperatively treated by chemotherapy and radiotherapy. *Anticancer Res* 1995; 15: 639-44.
6. Urschel JD, Vasan H. A meta-analysis of randomized controlled trials that compared neoadjuvant chemoradiation and surgery to surgery alone for resectable esophageal cancer. *Am J Surg* 2003; 185:538-43.
7. Stahl M, Stuschke M, Lehmann N, Meyer HJ, Walz MK, Seeber S, Klump B, Budach W, Teichmann R, Schmitt M, Schmitt G, Franke C, Wilke H. Chemoradiation with and without surgery in patients with locally advanced squamous cell carcinoma of the esophagus. *J Clin Oncol* 2005; 23:10-17.
8. Urba SG, Orringer MB, Turrisi A, Iannettoni M, Forastiere A, Strawderman M. Randomized trial of preoperative chemoradiation versus surgery alone

- in patients with locoregional esophageal carcinoma. *J Clin Oncol* 2001; 19: 305-13.
9. Faccini FP, Toneto JE, Moreira LF. Molecular screening in esophageal cancer. *South-American J Cancer* 1997; 1:272-80.
 10. Fagundes RB, Melo CR, Putten AC, Moreira LF, de Barros SG. P53 immunoexpression: an aid to conventional methods in the screening of precursor lesions of squamous esophageal cancer in patients at high-risk? *Cancer Detect Prev* 2005; 29: 227-32.
 11. Montesano R, Hollstein M, Hainaut P. Genetic alterations in esophageal cancer and their relevance to etiology and pathogenesis: a review. *Int J Cancer* 1996; 69: 225-35.
 12. Jankowski J, Jankowski R, Wormsley KG. Oesophageal carcinoma: the need for screening. *Eur J Cancer Prev* 1993; 2: 5-12.
 13. Lammie A, Drobnjak M, Gerald W, Saad A, Cote R, Cordon-Cardo C. Expression of c-kit and kit ligand proteins in normal human tissues. *J Histochem Cytochem* 1994; 42: 1417-25.
 14. Matsuda R, Tahahashi T, Nakamura S, Sekido Y, Nishida K, Seto M, Seito T, Sugiura T, Ariyoshi Y, Takahashi T. Expression of c-kit protein in human solid tumors and in corresponding fetal and adult normal tissues. *Am J Pathol* 1993; 142: 339-46.
 15. Poole DP, Van Nguyen T, Kawai M, Furness JB. Protein kinases expressed by interstitial cell of Cajal. *Histochem Cell Biol* 2004; 121: 21-30.

16. de Silva CM, Reid R. Gastrointestinal stromal tumors (GIST): c-kit mutations, CD117 expression, differential diagnosis and target cancer therapy with imatinib. *Pathol Oncol Res* 2003; 9:13-19.
17. Cohen PS, Chan JP, Lipkuns kaya M, Biedler JL, Seeger RS. Expression of stem cell factor and c-kit in human neuroblastoma. *Blood* 1994; 84: 3465-72.
18. Merchant MS, Woo CW, Mackall CL, Thiele CJ. Potential use of imatinib in Ewing's sarcoma: evidence for in vitro and in vivo activity. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 1673-79.
19. Arber DA, Tamayo R, Weiss LM. Paraffin section detection on the c-kit gene product (CD117) in human tissues: value in the diagnosis of mast cell disorders. *Human Pathol* 1998; 29: 498-504.
20. Pelosi G, Barisella M, Pasini F, Leon ME, Veronesi G, Spaggiari L, Frassetto F, Iannucci A, Masullo M, Sonzogni A, Maffini F, Viale G. CD117 immunoreactivity in stage I adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung: relevance to prognosis in a subset of adenocarcinoma patients. *Mod Pathol* 2004; 17: 711-21.
21. Dagher R, Cohen M, Williams G, Rothmann M, Gobburu J, Robbie G, Rahman A, Chen G, Staten A, Griebel D, Pazdur R. Approval summary: imatinib mesylate in the treatment of metastatic and/or unresectable malignant gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3034-38.

22. Johnson JR, Bross P, Cohen M, Rothmann M, Chen G, Zajicek A, Gobburu J, Rahman A, Staten A, Pazdur R. Approval summary: imatinib mesylate capsules for treatment of adult patients with newly diagnosed philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in chronic phase. *Clin Cancer Res* 2003; 9:1972-79.
23. Contu SS, Contu PC, Damin DC, Fagundes RB, Bevilacqua F, Rosa AS, Prolla JC, Moreira LF. pRB expression in esophageal mucosa of individuals at high risk for squamous cell carcinoma of the esophagus. *World J Gastroenterol* 2007; 13(11): 1728-31.
24. Went PT, Dirnhofer S, Bundi M, Mirlacher M, Schraml P, Mangialaio S, Dimitrijevic S, Kononen J, Lugli A, Simon A, Sauter G. Prevalence of kit expression in human tumors. *J Clin Oncol* 2004; 22: 4514-22.
25. Zhang X, Rong TH, Zhang Y, Long H, Fu JH, Ling P, Zhang LJ, Yang MT, Zeng CG, Ma GW, Su XD, Li XD, Wang JY, WEN ZS, Zhao JM. Expression and significance of c-kit and platelet-derived growth factor receptor-beta (PDGFRbeta) in esophageal carcinoma. *Chinese J Cancer* 2006; 25: 92-95 (in Chinese, English abstract).
26. Gibault L, Metges JP, Conan-Charlet V, Lozac'h P, Robaszekiewicz M, Bessaget C, Lagarde N, Volant A. Diffuse EGFR staining is associated with reduced overall survival in locally advanced oesophageal squamous cell cancer. *Br J Cancer* 2005; 93: 107-15.

6. ARTIGO ORIGINAL**Expressão imunoistoquímica de CD117
no carcinoma epidermóide de esôfago**

Marcelo Marafon Maino

William Lorenzi

Simone Santana Contu

Jane Ulbricht Kulsczynsk

Luis Fernando Moreira

RESUMO

Objetivo: Investigar a expressão imunoistoquímica de CD117 em um grupo de pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago

Pacientes e Métodos: Vinte e sete pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago submetidos à ressecção cirúrgica no Hospital de Clínicas de Porto Alegre da Universidade Federal do Rio Grande do Sul foram avaliados para imunoreatividade do CD117. Como grupo controle, foram utilizadas biópsias de mucosa esofágica de dez indivíduos saudáveis. A avaliação imunoistoquímica dos tecidos foi realizada com anticorpo monoclonal anti-CD117 (DAKO).

Resultados: Foram avaliados 21 (78%) homens e 6 (12%) mulheres com idade média de 58 anos (36 a 77). A maioria dos pacientes apresentava estadiamento TNM IIb ou III, e a sobrevida média foi de 21 meses (2 a 72). A reação imunoistoquímica em membrana produzida pelo anticorpo anti-CD117 foi considerada positiva em 4 dos 27 dos casos analisados (15%) .

Conclusões: Esses achados sugerem que CD117 deve ser investigado como marcador para o carcinoma epidermóide de esôfago. Estudos adicionais são necessários em outras amostras populacionais, para melhor definir o papel do CD117 nesses tumores.

Palavras-chave: Câncer esofágico; Carcinoma epidermóide de esôfago; CD117; Carcinogênese; Imunoistoquímica; Oncogenes; ciclo celular

INTRODUÇÃO

O carcinoma epidermóide do esôfago (CEE) é uma das neoplasias malignas mais agressivas. Estatisticamente, o carcinoma de esôfago é a sexta causa de óbito por câncer no mundo. Em muitas áreas do mundo é endêmico, particularmente nas nações em desenvolvimento. No sul do Brasil, no estado do Rio Grande do Sul, o CEE poderá atingir 19,7/100.000 casos novos em homens e 7,6/100.000 em mulheres no ano de 2008 ¹⁻³.

Ao diagnóstico, a grande maioria dos pacientes apresenta doença avançada local ou regional, ou disseminação sistêmica. A cirurgia tem sido tradicionalmente o tratamento de eleição para pacientes com carcinoma de esôfago ressecável. A terapia combinada (quimioterapia e/ou radioterapia) com a cirurgia não altera a sobrevida, que raramente excede 5 a 10% em 5 anos. As razões para estes índices desapontadores de sobrevida são: testes de *screening* inefetivos, detecção da doença em fase avançada, alto risco para recorrência após esofagectomia ou quimioradioterapia definitivas e sobrevida limitada dos pacientes com doença irresssecável ou metastática tratados com quimioterapia paliativa ⁴⁻⁸.

Muitos fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de esôfago foram identificados, como o fumo e o consumo de álcool, mas os mecanismos moleculares para a carcinogênese esofágica ainda permanecem em investigação. Alterações em genes específicos que têm papéis importantes em diversas funções celulares como adesão celular, transdução de sinal, diferenciação, desenvolvimento ou reparo de DNA têm sido identificadas ^{5,9-12}.

CD117 (KIT) é uma tirosino-quinase transmembrana que age como receptor para o fator de células-tronco (FCT) ou fator ligante de KIT. Pertence a família tipo III de receptores de quinases podendo ser encontrado em vários tipos celulares incluindo células hematopoiéticas, células germinativas, células intersticiais de Cajal, mastócitos e melanócitos ¹³⁻¹⁵. Esta molécula também é expressa em uma variedade de neoplasias como tumores estromais intestinais, seminoma/disgerminoma, leucemia mielóide aguda, neuroblastoma, Sarcoma de Ewing e câncer de pulmão ¹⁶⁻²⁰. Em tumores estromais gastrointestinais, a expressão de CD117 é considerada pré-requisito para o diagnóstico histológico devido a sua alta positividade imunoistoquímica (90 a 95%).

A eficácia e toxicidade variáveis das terapias tradicionais para o câncer têm levado ao desenvolvimento de novos agentes baseados em alvos específicos. Neste contexto, a expressão imunoistoquímica do CD117 é de particular interesse por ser alvo molecular específico para o mesilato de imatinibe, um inibidor de tirosino-quinase. O imatinibe tem apresentado boa resposta terapêutica para o tratamento de tumores estromais gastrointestinais e de leucemia mielóide crônica, onde atua inibindo a função quinase ^{21,22}.

Este estudo tem como objetivo avaliar a expressão imunoistoquímica de CD117 no carcinoma epidermóide de esôfago, vislumbrando uma futura possibilidade terapêutica específica para este tipo de câncer.

MÉTODOS

Pacientes

Foram avaliados retrospectivamente 27 casos de pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago submetidos à ressecção cirúrgica no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), entre 1992 e 2002. A coleta de dados foi realizada através de revisão de prontuários hospitalares.

Como grupo controle, biópsias de mucosa esofágica de dez voluntários saudáveis foram estudadas.

O estudo foi realizado após aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (UFRGS).

A reação imunoistoquímica produzida pelo anticorpo anti-CD117 foi considerada positiva em quatro (15%) casos.

Imunoistoquímica

A análise imunoistoquímica foi efetuada utilizando-se anticorpos anti-CD117 (DakoCytomation – CA, USA) diluído a 1:50. Para determinar a positividade desses anticorpos foi utilizado o complexo avidina-biotina-peroxidase (método ABC – kit LSAB DAKO). As amostras de tecido tumoral foram processadas por técnica de imunoistoquímica de rotina do Serviço de Patologia do HCPA. Como

controle positivo interno para a reação imunohistoquímica, foram identificadas células de Cajal, conhecidas por expressar CD117. A avaliação foi realizada pelo mesmo patologista, sem o conhecimento da evolução clínica e identificação dos pacientes.

A leitura das lâminas foi feita seguindo-se um escore de 0 a 3+, sendo o zero, completamente negativo; 1+, fracamente positivo; 2+, moderadamente positivo; 3+, fortemente positivo (Tabela 1). A coloração considerada positiva foi de membrana, sendo que a coloração citoplasmática foi somente registrada, mas não considerada positiva. Os escores 2+ e 3+ foram considerados positivos.

As variáveis foram descritas por médias, percentagens, desvio-padrão, e distribuição de frequência ou teste do qui-quadrado quando apropriado. Foi considerado significativo um $p < 0.05$ para um intervalo de confiança de 95%.

RESULTADOS

De acordo com a classificação histológica padrão (WHO), 3 (11%) pacientes apresentavam tumor bem diferenciado, 22 (82%) moderadamente diferenciado e 2 (7%), tumor pouco diferenciado.

Vinte e um (78%) pacientes eram do sexo masculino e 6 (12%) do sexo feminino. A média de idade era de 58 anos, variando de 36 a 77 anos. A sobrevida média foi de 21 meses (2 a 72). As demais características da amostra são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 1 – Classificação da expressão do CD117

Escore	Expressão	Padrão de coloração
0	negativa	Não houve coloração, ou a coloração de membrana ocorreu em menos de 10% das células tumorais.
1+	negativa	Coloração fraca quase imperceptível em menos de 10% das células tumorais. Parte da membrana é corada.
2+	positiva	Coloração fraca a moderada da membrana ocorreu em mais de 10% das células tumorais.
3+	positiva	Coloração forte e completa da membrana ocorreu em mais de 10% das células tumorais.

Tabela 2 – Características clínico-patológicas da amostra

Características	N	Percentual
Sexo		
masculino/feminino	21:6	78%:22%
Localização		
terço médio	10	37%
terço inferior	17	63%
Tipo histológico		
bem diferenciado	3 (1)	33,3%
moderadamente diferenciado	22 (2)	9%
pouco diferenciado	2 (1)	50%
Total (Expressão CD117)	27(4)	15%
Estadiamento TNM		
I	1	3,7%
IIB	5	18,5%
III	21	77,8%



Figura 1. Expressão imunoistoquímica positiva para CD117 (Método ABC)

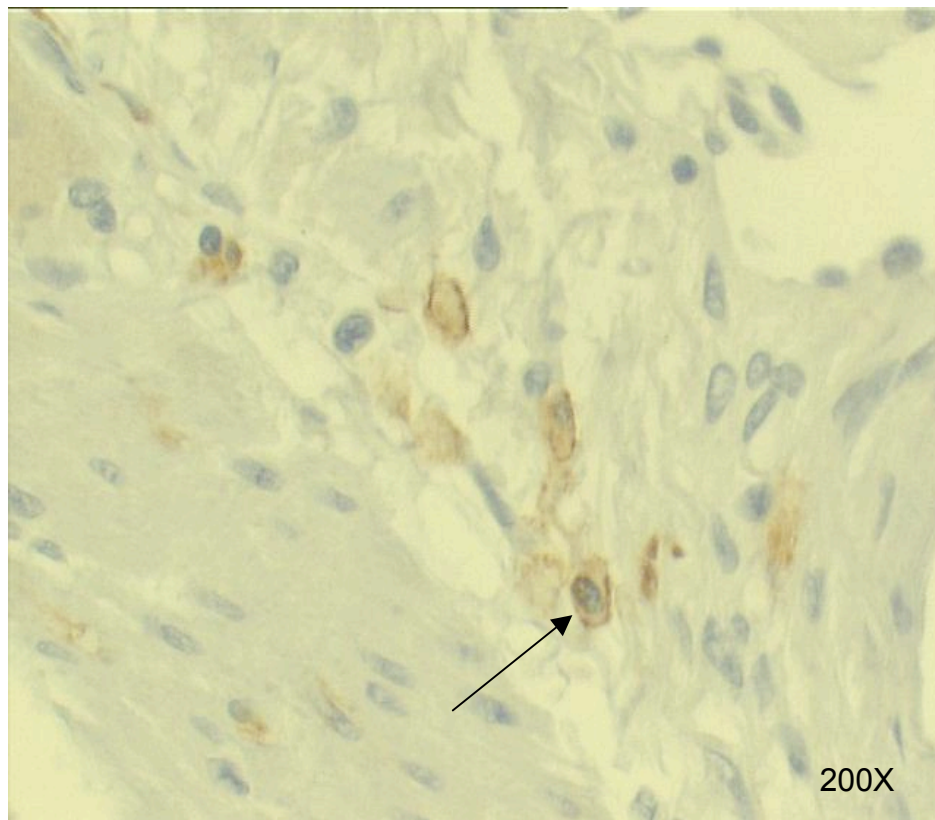


Figura 2 . Controle interno positivo – Célula de Cajal (IHC, Método ABC)

DISCUSSÃO

O carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) é ainda uma doença de péssimo prognóstico. Tratamentos como quimioterapia e radioterapia têm sido associados à cirurgia com objetivo de alterar este cenário, apesar de não haver relatos de melhora na sobrevida. A evolução dos pacientes com doença avançada, a apresentação clínica mais freqüente, é ainda muito desanimadora, com índices de sobrevida em 5 anos que raramente ultrapassam os 10%. O CEE é altamente prevalente no sul do Brasil e os índices de mortalidade estimados para 2008 nesta região são 14,3 e 4,2/100.000 habitantes para homens e mulheres, respectivamente ².

Múltiplos estágios da carcinogênese esofágica têm sido definidos histologicamente. Está estabelecido que o carcinoma esofágico passa por uma série de mudanças histopatológicas progressivamente severas que envolvem displasia do epitélio, carcinoma *in situ* e, finalmente, carcinoma invasivo. Baseado no conceito de que células pré-cancerosas podem mostrar alterações a nível molecular, a identificação de novos marcadores pode ter um papel importante na detecção de lesões de alto risco para transformação maligna e diagnóstico precoce de CEE ^{10,23}.

A imunistoquímica é atualmente uma técnica simples e reproduzível para avaliar a expressão de fatores oncogênicos em biópsias de tecidos neoplásicos. Conseqüentemente, têm sido mais usada para o estudo da

expressão de novos alvos potencialmente terapêuticos e para determinar quais pacientes são passíveis de responder a estas terapias específicas ⁵.

As melhoras atingidas com o estudo da biologia molecular favorecem o rastreamento molecular através de métodos adequados, e podem resultar no diagnóstico precoce permitindo a terapia curativa. O CD117 é um receptor de membrana de tirosino-quinase, com expressão imunohistoquímica em uma variedade de neoplasias humanas. Pouco, entretanto, se sabe sobre a prevalência e implicações clínicas do CD117 no carcinoma epidermóide de esôfago.

A expressão imunohistoquímica do CD117 em neoplasias malignas é de crucial interesse porque ele é um dos alvos moleculares do mesilato de imatinibe, um inibidor de tirosino-quinase. O imatinibe inicialmente se mostrou efetivo no tratamento da leucemia mielóide crônica, onde atua diretamente na função quinase da proteína BCR/ABL. Subsequentemente, respostas significativas ao tratamento também foram relatadas em pacientes com tumores estromais gastrointestinais avançados positivos para CD117. Foi sugerido que os índices de resposta ao imatinibe podem ser particularmente altos em neoplasias que expressam CD117 e que também apresentam mutações nesta proteína.

Went e cols estudaram a prevalência da expressão de CD117 em mais de 3.000 tumores humanos de 120 diferentes tipos de neoplasia, utilizando imunohistoquímica pela técnica de microarray (tissue microarray format). Epidemiologicamente os tumores que mais expressaram CD117 foram os

tumores estromais gastrointestinais (100%), seminoma (84%), melanoma (36%), carcinoma de células grandes (17%) e pequenas células de pulmão (7%). Para o carcinoma epidermóide de esôfago, imunoreatividade foi documentada em 5% (2/34)²⁴.

Zhang e cols estudaram a expressão de CD117 no tecido tumoral, para-tumoral e tecido normal de 50 biópsias que incluíam tanto adenocarcinoma quanto carcinoma epidermóide de esôfago. A expressão foi baixa nos tecidos tumorais, para-tumorais e tecidos normais (4%, 4% e 12%), respectivamente²⁵.

Gilbault e cols também evidenciaram uma expressão muito baixa de CD117 no CEE – menos de 3% dos casos (3/107). O uso de controles positivos externos ou internos (mastócitos positivos para CD117) durante os procedimentos imunohistoquímicos anulou a hipótese de reações falso-negativas²⁶.

No presente estudo, os autores encontraram 15% de expressão imunohistoquímica do CD117, percentual três vezes maior do que os encontrados por Zhang e cols para carcinoma epidermóide e adenocarcinoma de esôfago. A diferença com outras séries poderia ser explicada pelo fato deste experimento ter sido, ao nosso conhecimento, o primeiro realizado numa região de alta incidência anual de pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago.

Como conclusão, nossos achados sugerem que o CD117 deve ser investigado para determinar o seu potencial uso como biomarcador para o carcinoma epidermóide de esôfago, visando terapias alternativas com anticorpos monoclonais. O péssimo prognóstico do câncer esofágico com os tratamentos

atualmente disponíveis e as boas e promissoras respostas terapêuticas aos inibidores específicos de tirosino-quinase devem estimular estudos adicionais em outras amostras populacionais para melhor definir o papel do CD117 nesses tumores.

AGRADECIMENTOS

Ao programa FIPE do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e ao Programa PRODOC (2003) da CAPES pelo custeio parcial desta pesquisa.

REFERÊNCIAS

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* 2001; 94: 153-156.
2. INCA – Ministério da Saúde do Brasil www.inca.gov.br.
3. Ribeiro U Jr, Posner MC, Safatle-Ribeiro AV, Reynolds JC. Risk factors for squamous cell carcinoma of the esophagus. *Br J Surg* 1996; 83: 1174-1185.
4. Iyer R, Wilkison N, Demmy T, Javle M. Controversies in the multimodality management of locally advanced esophageal cancer: evidence-based review of surgery alone and combined-modality therapy. *Ann Surg Oncol* 2004; 11:335-673.
5. Moreira LF, Naomoto Y, Kamikawa Y, Hamada M, Orita K. Assessment of apoptosis in oesophageal carcinoma preoperatively treated by chemotherapy and radiotherapy. *Anticancer Res* 1995; 15: 639-44.
6. Urschel JD, Vasan H. A meta-analysis of randomized controlled trials that compared neoadjuvant chemoradiation and surgery to surgery alone for resectable esophageal cancer. *Am J Surg* 2003; 185:538-543.
7. Stahl M, Stuschke M, Lehmann N, Meyer HJ, Walz MK, Seeber S, Klump B, Budach W, Teichmann R, Schmitt M, Schmitt G, Franke C, Wilke H. Chemoradiation with and without surgery in patients with locally advanced squamous cell carcinoma of the esophagus. *J Clin Oncol* 2005; 25:2310-2317.

8. Urba SG, Orringer MB, Turrisi A, Iannettoni M, Forastiere A, Strawderman M. Randomized trial of preoperative chemoradiation versus surgery alone in patients with locoregional esophageal carcinoma. *J Clin Oncol* 2001; 19: 305-313.
9. Faccini FP, Toneto JE, Moreira LF. Molecular screening in esophageal cancer. *South-American J Cancer* 1997; 1:272-280.
10. Fagundes RB, Melo CR, Putten AC, Moreira LF, de Barros SG. P53 immunoexpression: an aid to conventional methods in the screening of precursor lesions of squamous esophageal cancer in patients at high-risk? *Cancer Detect Prev* 2005; 29: 227-232.
11. Montesano R, Hollstein M, Hainaut P. Genetic alterations in esophageal cancer and their relevance to etiology and pathogenesis: a review. *Int J Cancer* 1996; 69: 225-235.
12. Jankowski J, Jankowski R, Wormsley KG. Oesophageal carcinoma: the need for screening. *Eur J Cancer Prev* 1993; 2: 5-12.
13. Lammie A, Drobnjak M, Gerald W, Saad A, Cote R, Cordon-Cardo C. Expression of c-kit and kit ligand proteins in normal human tissues. *J Histochem Cytochem* 1994; 42: 1417-1425.
14. Matsuda R, Tahahashi T, Nakamura S, Sekido Y, Nishida K, Seto M, Seito T, Sugiura T, Ariyoshi Y, Takahashi T. Expression of c-kit protein in human solid tumors and in corresponding fetal and adult normal tissues. *Am J Pathol* 1993; 142: 339-346.
15. Poole DP, Van Nguyen T, Kawai M, Furness JB. Protein Kinases expressed by interstitial cell of Cajal. *Histochem Cell Biol* 2004; 121:21-30.

16. de Silva CM, Reid R. Gastrointestinal stromal tumors (GIST): c-kit mutations, CD117 expression, differential diagnosis and target cancer therapy with Imatinib. *Pathol Oncol Res* 2003; 9:13-19.
17. Cohen PS, Chan JP, Lipkunskaya M, Biedler JL, Seeger RS. Expression of stem cell factor and c-kit in human neuroblastoma. *Blood* 1994; 84:3465-3472.
18. Merchant MS, Woo CW, Mackall CL, Thiele CJ. Potential use of imatinib in Ewing's Sarcoma: evidence for in vitro and in vivo activity. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:1673-1679.
19. Arber DA, Tamayo R, Weiss LM. Paraffin section detection on the c-kit gene product (CD117) in human tissues: value in the diagnosis of mast cell disorders. *Human Pathol* 1998; 29:498-504.
20. Pelosi G, Barisella M, Pasini F, Leon ME, Veronesi G, Spaggiari L, Fraggetta F, Iannucci A, Masullo M, Sonzogni A, Maffini F, Viale G. CD117 immunoreactivity in stage I adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung: relevance to prognosis in a subset of adenocarcinoma patients. *Mod Pathol* 2004;17:711-721.
21. Dagher R, Cohen M, Williams G, Rothmann M, Gobburu J, Robbie G, Rahman A, Chen G, Staten A, Griebel D, Pazdur R. Approval summary: imatinib mesylate in the treatment of metastatic and/or unresectable malignant gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3034-3038.
22. Johnson JR, Bross P, Cohen M, Rothmann M, Chen G, Zajicek A, Gobburu J, Rahman A, Staten A, Pazdur R. Approval summary: imatinib mesylate capsules for treatment of adult patients with newly diagnosed philadelphia

chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in chronic phase. *Clin Cancer Res* 2003; 9:1972-1979.

23. Contu SS, Contu PC, Damin DC, Fagundes RB, Bevilacqua F, Rosa AS, Prolla JC, Moreira LF. pRB expression in esophageal mucosa of individuals at high risk for squamous cell carcinoma of the esophagus. *World J Gastroenterol* 2007; 13(11): 1728-31.

24. Went PT, Dirnhofer S, Bundi M, Mirlacher M, Schraml P, Mangialaio S, Dimitrijevic S, Kononen J, Lugli A, Simon A, Sauter G. Prevalence of KIT expression in human tumors. *J Clin Oncol* 2004; 22: 4514-4522.

25. Zhang X, Rong TH, Zhang Y, Long H, Fu JH, Ling P, Zhang LJ, Yang MT, Zeng CG, Ma GW, Su XD, Li XD, Wang JY, WEN ZS, Zhao JM. Expression and significance of C-kit and platelet-derived growth factor receptor-beta (PDGFRbeta) in esophageal carcinoma. *Ai Zheng* 2006; 25:92-95.

26. Gibault L, Metges JP, Conan-Charlet V, Lozac'h P, Robaszkiewicz M, Bessaget C, Lagarde N, Volant A. Diffuse EGFR staining is associated with reduced overall survival in locally advanced oesophageal squamous cell cancer. *Br J Cancer* 2005; 93: 107-115.