LIDIANE VIEIRA MARINS

**Avaliação dos subtipos morfológicos e imuno-histoquímicos
de colangiocarcinoma e sua correlação com o *status* do
oncogene HER2/c-erbB-2**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Patologia
Orientador: Prof. Dr. Venâncio Avancini
Ferreira Alves

São Paulo
2019

LIDIANE VIEIRA MARINS

**Avaliação dos subtipos morfológicos e imuno-histoquímicos
de colangiocarcinoma e sua correlação com o *status* do
oncogene HER2/c-erbB-2**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Patologia

Orientador: Prof. Dr. Venâncio Avancini
Ferreira Alves

São Paulo
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Marins, Lidiane Vieira

Avaliação dos subtipos morfológicos e imuno-
histoquímicos de colangiocarcinoma e sua correlação
com o status do oncogene HER2/c-erbB-2 / Lidiane
Vieira Marins. -- São Paulo, 2019.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Patologia.

Orientador: Venâncio Avancini Ferreira Alves.

Descritores: 1.Colangiocarcinoma/classificação
2.Adenocarcinoma 3.Neoplasias dos ductos biliares
4.Figado 5.Mucinas 6.HER2

USP/FM/DBD-171/19

À minha família e amigos pelo enorme apoio.

Aos pacientes e seus cuidadores por compreenderem,
mais do que todos, a necessidade da evolução neste tema.

Aos professores e alunos para que tenham forças
para prosseguir com os seus estudos.

Aos profissionais da área da saúde que amam o ato de cuidar
e de fazer o melhor possível para o paciente.

AGRADECIMENTOS

Ao querido orientador Professor Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves por sempre abrir as portas para os crescimentos intelectual e profissional.

Ao querido Professor Dr. Evandro Sobroza de Mello, que sempre mostrou entusiasmo pelo ensino, por sua extrema generosidade e por ser um grande professor, colaborando sempre para o meu crescimento profissional, permitindo que hoje eu desempenhe o meu trabalho com segurança.

Às queridas Professoras Dra. Kunie Iabuki Rabelo e Professora Dra. Maria Claudia Nogueira Zerbini, por serem os modelos de atitude profissional e por toda gentileza, carinho e amor em ensinar e compartilhar suas experiências.

Aos pacientes e a todos os colegas de trabalho por fornecerem a base deste trabalho, especialmente ao Dr. Ricardo Jureidini e à Sra. Alda Wakamatsu (Laboratório de Investigação Médica 14 – Patologia Hepática).

Aos meus pais amados, Lenira Vieira Marins e Luiz Antônio de Lara Marins (*in memoriam*), por terem me dado a vida, a minha educação; por serem exemplos a serem seguidos e pelo apoio em todas as etapas desta caminhada, sempre estimulando o progresso e ressaltando os meus valores pessoais.

À minha querida irmã, Lucele Vieira Marins, exemplo de amor e de competência profissional e por ser a minha maior amiga e defensora.

Ao meu marido Marcos Tsuyoshi Shinkawa, pelo amor, companheirismo, dedicação e por ser sempre exemplo de honestidade e competência.

Ao meu filho, Leonardo Marins Shinkawa e ao meu sobrinho Rafael Marins Shinkawa, por suas alegrias contagiantes e por serem o motivo principal para que eu siga sempre em frente.

Ao Deus grandioso por estar ao meu lado sempre e por me abençoar com a oportunidade de ser melhor a cada dia.

“O tempo é o melhor autor; sempre encontra um final perfeito.”

Charles Chaplin

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese segue as seguintes normas em vigor no momento de sua publicação:

Referências: adaptado de *Internacional Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo; Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List Of Journals Indexed in Index Medicus*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3 REVISÃO DA LITERATURA	24
3.1 ASPECTOS GERAIS	24
3.2 EPIDEMIOLOGIA.....	24
3.3 FATORES DE RISCO	25
3.4 DIAGNÓSTICO	27
3.4.1 História clínica.....	27
3.4.2 Marcadores tumorais	27
3.4.3 Exames de imagem.....	28
3.5 TRATAMENTO.....	29
3.6 EVOLUÇÃO DAS CLASSIFICAÇÕES UTILIZADAS EM CC	30
3.6.1 Classificações mais utilizadas em CC	31
3.7 ASPECTOS ANATOMOPATOLÓGICOS DO CC.....	31
3.7.1 Achados macroscópicos do CC	31
3.7.2 Achados microscópicos do CC	32
3.7.3 Subclassificação descrita para os CCs por Yasuni Nakanuma et al	32
3.7.4 Consenso para terminologia das Neoplasias Primárias do Fígado (NPFs) com diferenciações hepatocitária e colangiocelular	33
3.8 MUCINAS.....	34
3.9 ONCOGENE HER2/c-erbB-2.....	35
4 INDIVÍDUOS E MÉTODOS	40
4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	40
4.2 SELEÇÃO DOS CASOS	40
4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	40
4.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	41
4.5 MATERIAL SELECIONADO	41
4.6 VARIÁVEIS ANATOMOPATOLÓGICAS AVALIADAS	41
4.6.1 Subtipos histológicos.....	42
4.6.1.1 Colangiocarcinoma de padrão convencional (CCC).....	42
4.6.1.2 Colangiolocarcinoma (CLC).....	42
4.6.1.3 Formas mistas entre CCC e CLC	43
4.6.1.4 Carcinoma de células intermediárias (CaCI)	43
4.6.1.5 Variantes histológicas menos frequentes	43
4.6.2 Localização da neoplasia ao longo da árvore biliar	46
4.6.2.1 Colangiocarcinoma intra-hepático... ..	46
4.6.2.2 Colangiocarcinoma hilar	46
4.6.2.3 Colangiocarcinoma extra-hepático... ..	46
4.6.3 Padrões macroscópicos.....	47
4.6.3.1 Neoplasias com padrão de crescimento formador de massa... ..	47
4.6.3.2 Neoplasias com padrão de crescimento infiltrativo periductal.....	47

4.6.3.3 Neoplasias com padrão de crescimento intraductal.....	47
4.6.4 Tamanho do tumor em milímetros.....	48
4.6.5 Grau de diferenciação histológica tumoral.....	48
4.6.6 Evidências histológicas sugestivas de doenças de base	48
4.6.6.1 Litíase hepática.....	49
4.6.6.2 Malformação de placa ductal.....	49
4.6.7 Colangite crônica	49
4.7 CONSTRUÇÃO DE MICROARRANJO TECIDUAL (TMA) E ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO	50
4.7.1 Descrição da confecção do TMA	50
4.7.2 Estudo imuno-histoquímico.....	51
4.7.2.1 Mucinas	52
4.7.2.2 Oncoproteína HER2	52
4.7.3 Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência (FISH) para avaliação da amplificação do oncogene HER2/c-erbB-2.....	53
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	55
6 RESULTADOS.....	56
6.1 DISTRIBUIÇÃO DE CASOS DE ACORDO COM A CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA.....	56
6.2 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS	56
6.3 LOCALIZAÇÃO AO LONGO DA ÁRVORE BILIAR	57
6.4 PADRÃO MACROSCÓPICO	57
6.5 TAMANHO DA NEOPLASIA EM MILÍMETROS	57
6.6 GRAU HISTOLÓGICO DE DIFERENCIAÇÃO TUMORAL SEGUNDO A OMS	58
6.7 DOENÇA DE BASE	59
6.8 IMUNOEXPRESSÃO DE MUCINAS.....	62
6.9 PADRÃO DE IMUNOEXPRESSÃO DA ONCOPROTEÍNA HER2	64
6.10 STATUS DA AMPLIFICAÇÃO DO ONCOGENEHER2/c-erbB-2 PELA TÉCNICA DE HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i> POR FLUORESCÊNCIA (FISH).67	67
6.11 AVALIAÇÃO DA ACURÁCIA DIAGNÓSTICA DOS PROTOCOLOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS UTILIZADOS EM CARCINOMAS MAMÁRIO INVASIVO E GÁSTRICO INVASIVO (EM PEÇA CIRÚRGICA), PARA PREDIZER STATUS DA AMPLIFICAÇÃO DO ONCOGENE HER2/c- erbB-2 NOS CCs.....	68
6.11.1 Cenário 1	69
6.11.2 Cenário 2.....	71
6.11.3 Cenário 3.....	73
6.12 CONCORDÂNCIA ENTRE OS PROTOCOLOS PARA AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA HER2 (PARA CARCINOMA MAMÁRIO INVASIVO E CARCINOMA GÁSTRICO INVASIVO (EM PEÇA CIRÚRGICA)).....	74

7 DISCUSSÃO	76
7.1 ASPECTOS DEMOGRÁFICOS	76
7.2 CORRELAÇÃO ENTRE TAMANHO DA NEOPLASIA, LOCALIZAÇÃO AO LONGO DA ÁRVORE BILIAR, PADRÃO MACROSCÓPICO, GRAU DE DIFERENCIAÇÃO TUMORAL E SUBTIPO HISTOLÓGICO DE CCs	79
7.3 FATORES DE RISCO	81
7.4 MUCINAS	83
7.5 ONCOGENE HER2/c-erbB-2	85
8 CONCLUSÕES	93
9 ANEXO	95
10 REFERÊNCIAS	99

LISTA DE ABREVIATURAS

AJCC	do inglês: <i>American Joint Committee on Cancer</i>
ASCO	do inglês: <i>American Society of Clinical Oncology</i>
CaCI	carcinoma de células intermediárias
CAP	do inglês: <i>College of American Pathologists</i>
CC	colangiocarcinoma
CCA	do inglês: Cholangiocarcinoma
CCC	colangiocarcinoma convencional
CCE	colangiocarcinoma extra-hepático
CCH	colangiocarcinoma hilar
CCI	colangiocarcinoma intra-hepático
CCs	colangiocarcinomas
CEP	colangite esclerosante primária
CK	citoqueratina
CLC	colangiolocarcinoma
DAP	Divisão de Anatomia Patológica
E	especificidade
EBV	Epstein-Barr vírus
ESM	Evandro Sobroza Mello
FDA	do inglês: <i>Food and Drug Administration</i>
FISH	do inglês: <i>Fluorescence in situ hybridization</i>
FM	formador de massa
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade do Estado de São Paulo
HC	Hospital das Clínicas

HE	hematoxilina & eosina
HIV	vírus da imunodeficiência humana
ID	intraductal
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IP	infiltrativo periductal
LIM-14	Laboratório de Investigação Médica 14 da FMUSP
LVM	Lidiane Vieira Marins
MUC	mucina
NPF	neoplasia primária do fígado
OMS	Organização Mundial da Saúde
ROC	do inglês <i>Receiver Operating Characteristic</i>
S	sensibilidade
TMA	do inglês: <i>tissue microarray</i>
TNM	do inglês: <i>Classification of Malignant Tumours</i>
UICC	do inglês: <i>Union for International Cancer Control</i>
VHB	vírus da hepatite B
VHC	vírus da hepatite C
VPN	valor preditivo negativo
VPP	valor preditivo positivo

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

+	positivo
-	negativo
>	maior que
<	menor que
%	porcento
n	número
=	igual a
⊗	comentário
*	nota

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Colangiocarcinoma de padrão convencional (CCC; HE; 200x).....	44
Figura 2 – Colangiolocarcinoma (CLC; HE; 200x).....	44
Figura 3 – Carcinoma de células intermediárias (CaCI; HE; 200x).....	45
Figura 4 – Carcinoma de células em anel de sinete (HE; 200x)	45
Figura 5 – Exemplo de imunoexpressão positiva para mucinas em CCC: MUC5AC; 200x.....	64
Figura 6 – Exemplo de imunoexpressão da oncoproteína HER2 (escore 2+) em CCC, segundo protocolo proposto para câncer de mama (SP3; 200x).....	66
Figura 7 – Exemplo de imunoexpressão da oncoproteína HER2 (escore 2+) em CCC, segundo protocolo proposto para adenocarcinoma gástrico (SP3; 200x).....	66
Figura 8 – Exemplo de amplificação do oncogene HER2/c-erbB-2 pela técnica de hibridização <i>in situ</i> por fluorescência (FISH). A) Cromossomo 17; B) Gene HER2/c-erbB-2	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número e porcentagem de indivíduos com CC, segundo subtipo histológico e aspectos referentes à localização ao longo da árvore biliar, padrão macroscópico, tamanho da neoplasia e grau de diferenciação tumoral	60
Tabela 2 – Número e porcentagem de indivíduos com CC, segundo subtipo histológico e doenças hepáticas de base.....	61
Tabela 3 – Número e porcentagem de indivíduos com CC, segundo padrão de expressão das mucinas pesquisadas e subtipos histológicos	63
Tabela 4 – Número e porcentagem de indivíduos por subgrupos histológicos de CCs, segundo padrão de expressão do produto do oncogene HER2/c-erbB-2, utilizando o sistema proposto para avaliação de carcinoma mamário invasivo	65
Tabela 5 – Número e porcentagem de indivíduos nos subgrupos histológicos de CCs, segundo padrão de expressão do produto do oncogene HER2/c-erbB-2, utilizando sistema proposto para avaliação de carcinoma gástrico invasivo em peça de ressecção cirúrgica.....	65
Tabela 6 – <i>Status</i> da amplificação do oncogene HER2/c-erbB-2 nos subtipos histológicos de CCs.....	67
Tabela 7 – Cenário 1: número de indivíduos com CC, segundo resultado da avaliação imuno-histoquímica (IHQ) pelo protocolo proposto para carcinoma mamário invasivo e resultado da avaliação da amplificação do oncogene HER2/c-erbB-2 por estudo de hibridização <i>in situ</i> por fluorescência (FISH)	70
Tabela 8 – Cenário 1: número de indivíduos com CC, segundo resultado da avaliação imuno-histoquímica (IHQ) pelo protocolo proposto para carcinoma gástrico invasivo e resultado da avaliação da amplificação do oncogene HER2/c-erbB-2 por hibridização <i>in situ</i> por fluorescência (FISH).....	70
Tabela 9 – Cenário 1: estimativas de sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e área sob a curva ROC e respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%), para avaliação do escore da oncoproteína HER2 em colangiocarcinomas, segundo os protocolos imuno-histoquímicos propostos para carcinomas mamário e gástrico invasivos.....	71

Tabela 10 – Cenário 2: número de indivíduos com CC, segundo resultado da avaliação imuno-histoquímica (IHQ) pelo protocolo proposto para carcinoma mamário invasivo e resultado da avaliação da amplificação do oncogene HER2/c-erbB-2 por estudo de hibridização <i>in situ</i> por fluorescência (FISH).....	71
Tabela 11 – Cenário 2: número de indivíduos com CC, segundo resultado da avaliação imuno-histoquímica (IHQ) pelo o protocolo proposto para carcinoma gástrico invasivo e resultado da avaliação da amplificação do oncogene HER2/c-erbB-2 por hibridização <i>in situ</i> por fluorescência (FISH)	72
Tabela 12 – Cenário 2: estimativas de sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e área sob a curva ROC e respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%), para avaliação do escore da oncoproteína HER2 em colangiocarcinomas, segundo os protocolos imuno-histoquímicos propostos para carcinomas mamário e gástrico invasivos.....	72
Tabela 13 – Cenário 3: número de indivíduos com CC, segundo resultado da avaliação imuno-histoquímica (IHQ) pelo protocolo proposto para carcinoma mamário invasivo e resultado da avaliação da amplificação do oncogene HER2/c-erbB-2 por estudo de hibridização <i>in situ</i> por fluorescência (FISH).....	73
Tabela 14 – Cenário 3: número de indivíduos com CC, segundo resultado da avaliação imuno-histoquímica (IHQ) pelo o protocolo proposto para carcinoma gástrico invasivo e resultado da avaliação da amplificação do oncogene HER2/c-erbB-2 por hibridização <i>in situ</i> por fluorescência (FISH)	73
Tabela 15 – Cenário 3: estimativas de sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e área sob a curva ROC e respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%), para avaliação do escore da oncoproteína HER2 em colangiocarcinomas, segundo os protocolos imuno-histoquímicos propostos para carcinomas mamário e gástrico invasivos.....	74
Tabela 16 – Número e porcentagem de indivíduos com CC, segundo resultado do protocolo mamário e gástrico avaliando a imunoexpressão da oncoproteína HER2.....	75

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Critérios utilizados para a determinação da expressão do produto do oncogene HER2/c-erbB-2 por técnica de imuno-histoquímica (IHC) em carcinoma mamário invasivo	38
Quadro 2 – Critérios utilizados para a determinação da expressão do produto do oncogene HER2/c-erbB-2 por imuno-histoquímica (IHC) em adenocarcinoma gástrico e da junção esofagogástrica (peça cirúrgica).....	38
Quadro 3 – Resultado da avaliação do status da amplificação do oncogene HER2/c-erbB-2 por técnica de Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência (ensaio com dupla marcação)	39
Quadro 4 – Características dos anticorpos utilizados nas reações imuno-histoquímicas realizadas LIM-14/Patologia hepática/FMUSP	54
Quadro 5 – Valores do coeficiente kappa de Cohen e sua interpretação	55
Quadro 6 – Comparação entre as diferentes classificações utilizadas em CCs.....	90
Quadro 7 – Comparação entre aspectos patológicos abordados nas diferentes classificações empregadas para nomenclatura de CCs	92

RESUMO

Marins LV. *Avaliação dos subtipos morfológicos e imuno-histoquímicos de Colangiocarcinoma e sua correlação com o status do oncogene HER2/c-erbB-2* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

INTRODUÇÃO: O Colangiocarcinoma (CC) é uma neoplasia em que subtipos histológicos necessitam de melhor caracterização fenotípica e molecular. **OBJETIVOS:** Caracterizar CCs a partir da morfologia, perfil de expressão de mucinas e o *status* do oncogene HER2/c-erbB-2. **MÉTODOS:** Foram incluídos 56 pacientes com diagnóstico de CC, operados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo entre 1992 e 2009. CCs foram classificados em subgrupos baseados no fenótipo da célula neoplásica: CC convencional (CCC), colangiolocarcinoma (CLC), carcinoma de células intermediárias (CaCI) e variantes histológicas menos comuns. Dados sobre idade, sexo, tamanho, localização na árvore biliar, padrão macroscópico, grau de diferenciação tumoral e evidências de doença hepática subjacente foram coletados. Estudo imuno-histoquímico foi realizado para os antígenos MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC e MUC6 e para a oncoproteína HER2. Hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) foi conduzida para avaliar a presença da amplificação do gene HER2/c-erbB-2. **RESULTADOS:** A distribuição dos casos revelou 38 CCCs (68%), quatro CLCs (7%), nove CaCIs (16%), um CCC-CLC (2%) e quatro variantes raras (7%). Foram 33 homens (59%) e 23 mulheres (41%), com idade média de 56,3 anos. Apenas dois de 38 CCCs (5,2%), mas dois de quatro CLCs (50%) e oito de nove CaCIs (88,8%) tinham mais de 40 mm. Todos os quatro CLCs e seis dos nove CaCIs (66,6%) eram intra-hepáticos, enquanto 22 dos 38 CCCs (57,9%) estavam localizados na região hilar e 16 eram extra-hepáticos (42,2%). O padrão macroscópico mostrou 34 dos 38 CCCs com padrão infiltrativo periductal (89,5%). Todos os CLCs e CaCIs exibiram padrão de formação de massa. Quanto ao grau de diferenciação tumoral, 33 casos foram bem (58,9%), 19 moderadamente (33,9%), três poucos diferenciados (5,4%) e um indiferenciado (1,8%). Doença hepática subjacente foi avaliada em 41 casos. Detectou-se hepatolitíase em quatro (7,1%), malformação da placa ductal em 14 (25%) e colangite crônica em 27 casos (48,2%). Todos os CCCs foram positivos para MUC1 e muitos deles foram positivos para MUC5AC (92,1%), MUC4 (63,2%) e MUC6 (76,3%), enquanto uma minoria foi positiva para MUC2 (23,7%). A maioria dos CLCs foi positiva para MUC1 (75%) e todos CLCs foram negativos para MUC2, MUC5AC e MUC6. A maioria dos CaCIs foi positiva para MUC1 (77,8%) e MUC6 (55,6%) e apenas alguns casos foram positivos para MUC4 (22,2%), MUC2 (11,1%) e MUC5AC (11,1%). De acordo com o protocolo para carcinoma mamário invasivo, dois casos foram positivos (3+) para imunoexpressão de HER2, com 36 casos negativos (escores 0 e 1+) e 18 duvidosos (2+); com protocolo de carcinoma gástrico invasivo, seis casos foram positivos, 17 negativos e 33 duvidosos. A análise da amplificação do HER2/c-erbB-2 pelo FISH revelou 41 casos negativos (73,2%), sete positivos (12,5%) e oito inconclusivos (14,3%). A acurácia dos testes imuno-

histoquímicos foi comparada com o FISH sendo o protocolo proposto para carcinoma gástrico superior ao do carcinoma mamário. **CONCLUSÕES:** Os subtipos histológicos de CCs possuem diferentes características e perfil de imunoexpressão das mucinas. A frequência de amplificação do oncogene HER2/c-erbB-2 foi relativamente alta nesse câncer e o melhor protocolo imuno-histoquímico a ser usado na investigação inicial é o aplicado em carcinoma gástrico invasivo. Esses aspectos devem ser considerados nas abordagens diagnóstica e terapêutica desses tumores.

Descritores: Colangiocarcinoma/classificação; Adenocarcinoma; Neoplasia dos ductos biliares; Mucinas; HER2

ABSTRACT

Marins LV. *Evaluation of morphological and immunohistochemical subtypes of Cholangiocarcinoma and its correlation with status of HER2/c-erbB-2 oncogene* [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

INTRODUCTION: Cholangiocarcinoma (CCA) is a neoplasm in which several histological subtypes have been described and these still require better phenotypic and molecular characterization. **OBJECTIVES:** Characterize CCA morphologically, analyze mucin expression profile and evaluate HER2/c-erbB-2 oncogene product status. **METHODS:** A total of 56 cases of CCA were obtained from patients who had undergone surgery between 1992 and 2009 at Hospital das Clínicas of University of São Paulo School of Medicine. CCA was classified into subgroups based on neoplastic cell phenotype: conventional CCA (CCC), cholangiolocarcinoma (CLC), intermediate cell carcinoma (InCC) and less common histological variants. Data on patient gender, age, tumor size, location along biliary tree, macroscopic pattern, degree of differentiation and histological evidence of underlying diseases were collected. Immunohistochemistry was performed on tissue microarray for MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC and MUC6 antigens and for HER2 oncoprotein. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) study was conducted to evaluate the presence of HER2/c-erbB-2 gene amplification. **RESULTS:** Distribution of cases revealed 38 CCCs (68%), 4 CLCs (7%), 9 InCCs (16%), 1 CCC-CLC (2%) and 4 rare variants (7%). There were 33 male (59%) and 23 female patients (41%), with an average age of 56.3 years. Only 2 of 38 CCCs (5.2%), but 2 of 4 CLCs (50%) and 8 of 9 InCC (88.8%) had more than 40 mm. All 4 CLCs and 6 of 9 InCCs (66.6%) were intrahepatic, while 22 of 38 CCCs (57.9%) were located at hilar region and 16 were extrahepatic (42.2%). Macroscopic pattern showed 34 of 38 CCCs of periductal infiltrative type (89.5%). All CLCs and InCCs presented as mass-forming pattern. Regarding degree of tumor differentiation, 33 cases were well differentiated (58.9%), 19 moderately differentiated (33.9%), 3 poor differentiated (5.4%) and 1 undifferentiated (1.8%). Underlying liver disease could be evaluated in 41 cases. Hepatolithiasis was observed in 4 (7.1%), ductal plate malformation in 14 (25%) and chronic cholangitis in 27 cases (48.2%). All CCCs were positive to MUC1 and many of them were positive to MUC5AC (92.1%), MUC4 (63.2%) and MUC6 (76.3%) while a minority was MUC2 positive (23.7%). Most of CLC were positive to MUC1 (75%) and all CLC were negative to MUC2, MUC5AC and MUC6. The majority of InCCs were positive to MUC1 (77.8%) and MUC6 (55.6%), and only a few cases were positive to MUC4 (22.2%), MUC2 (11.1%) and MUC5AC (11.1%). According to invasive mammary carcinoma protocol, only 2 cases were positive (3+) to HER2 immunoexpression, with 36 cases being negative (0 and 1+ score) and 18 equivocal (2+); with invasive gastric carcinoma protocol, 6 cases were positive, 17 negative and 33 equivocal. Analysis of HER2/c-erbB-2 amplification using FISH revealed 41 negative cases (73.2%), 7 positive (12.5%) and 8

inconclusive (14.3%). Accuracy of immunohistochemistry was compared to FISH and the best immunohistochemical protocol was that proposed for invasive gastric carcinoma rather than that described for invasive mammary carcinoma. **CONCLUSIONS:** Subtypes of CCAs present different features and mucin expression profile. Amplification of HER2/c-erbB-2 was relatively frequent in CCA and the best immunohistochemical protocol to be used as initial investigation was that proposed for invasive gastric carcinoma. These aspects should be considered in diagnostic and therapeutic approach of these tumors.

Descriptors: Cholangiocarcinoma/classification; Adenocarcinoma; Neoplasm of the biliary tract; Liver; Mucin; HER2.

1 INTRODUÇÃO

O adenocarcinoma de vias biliares, também denominado colangiocarcinoma (CC), é uma neoplasia pouco frequente e agressiva, associada à elevada taxa de mortalidade (1). Estudos avaliam os fatores de risco para esta neoplasia e tentam estabelecer as vias moleculares envolvidas no processo da carcinogênese biliar, com finalidade de aplicação diagnóstica, prognóstica e terapêutica (2-4). Gradativamente, têm-se reconhecido vários subtipos de carcinomas com diferenciação colangiocelular, desde neoplasias com padrão de grandes ductos biliares, passando por neoplasias colangiolares/ductulares, até neoplasias mistas colangiocelulares e hepatocitárias, sendo propostos muitos tipos de classificações (5-9). Apesar do aumento de estudos moleculares nesta área, poucos deles consideram a heterogeneidade histológica desta neoplasia (4, 10). Há também necessidade clínica crescente de identificação de marcadores moleculares de suscetibilidade a tratamentos mais específicos, sendo que a amplificação do HER2/c-erbB-2 é alvo de alguns dos tratamentos bem sucedidos, não só em carcinomas mamários, mas também em carcinomas gástrico, colorretal, pulmonar e do trato urinário, isoladamente ou em combinação com outras terapias sistêmicas (11-13).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

A partir de uma casuística de espécimes de ressecção cirúrgica, avaliar a frequência dos diferentes subtipos histológicos de CCs, segundo os conceitos mais recentes de classificação destes tumores, estabelecendo a distribuição dos casos de acordo com o tamanho do tumor, localização ao longo da árvore biliar, padrão macroscópico, grau de diferenciação histológica e associação com aspectos sugestivos de doença hepática de base.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar, nos subtipos histológicos de CCs, o padrão de expressão de mucinas (MUCs) dos tipos 1, 2, 4, 5AC e 6 (MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC e MUC6).

- Caracterizar o padrão de expressão imuno-histoquímica da oncoproteína HER2 nos subtipos histológicos de CCs. Correlacionar os escores de imunoexpressão da oncoproteína HER2 em CCs com resultados da pesquisa de amplificação do oncogene HER2/c-erbB-2, utilizando a técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH).

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ASPECTOS GERAIS

O CC foi inicialmente descrito por Durand-Fardel em 1840 (16, 17). É uma neoplasia maligna pouco comum, compreendendo 15-20% das neoplasias hepatobiliares (18-22). Dentre os tumores gastrointestinais, é responsável por cerca de 3% das neoplasias e a sobrevida a longo prazo em cinco anos está em torno de 3,5% (20, 23, 24). Embora o CC seja classicamente aceito como neoplasia originária do revestimento epitelial dos ductos biliares, mais recentemente, estudos têm sugerido uma origem a partir de células tronco/progenitoras hepáticas (25-28).

3.2 EPIDEMIOLOGIA

A prevalência do CC é heterogênea, sendo que os maiores índices se encontram na Ásia (20, 29-31). Nos Estados Unidos, a incidência anual está em torno de 1,6 casos por 100.000 habitantes (22, 32). Estudos epidemiológicos mais antigos agrupavam CCI com outros tumores hepáticos, CCE com neoplasias da vesícula biliar e CCH eram, muitas vezes, considerados CCI. Devido à histórica falta de uniformidade na classificação dessas neoplasias, a verdadeira incidência destas pode ser ainda desconhecida (33, 34). Vários estudos documentam aumento na incidência de CCI nas últimas décadas. A causa do aumento na incidência de CCI ainda não está esclarecida, porém este fenômeno parece ser independente da melhoria nas técnicas diagnósticas ou de reclassificação de casos (23, 35). CC acomete mais homens e é raramente diagnosticado antes dos 40 anos de idade (36, 37). Há variação étnica no comprometimento por esta neoplasia, explicada por diferenças genéticas, ambientais e socioeconômicas, sendo que no continente americano há predomínio no grupo hispano-americano (38).

3.3 FATORES DE RISCO

São conhecidos muitos fatores de risco para o desenvolvimento de CC (19-21, 30, 39). Independentemente do fator de risco implicado, a presença de inflamação crônica com consequente injúria ao epitélio biliar e/ou estase de bile parecem ser condições fundamentais no processo de carcinogênese (40, 41). Neste contexto, a liberação local de citocinas e produção de derivados reativos de oxigênio, dentre outros, levam a um estresse celular prolongado com elevada proliferação celular e acúmulo de erros no DNA (30, 42-44).

Nos países ocidentais, o fator de risco mais comum para o desenvolvimento de CC é a colangite esclerosante primária (CEP) (23, 45-52). Esta doença inflamatória idiopática e progressiva dos ductos biliares costuma se associar com doenças intestinais inflamatórias, em especial com a retocolite ulcerativa (53-55). A progressão da CEP resulta em fibrose biliar com possibilidade de progressão para cirrose, porém a complicação mais temida é a ocorrência do CC (36, 41, 56, 57). A prevalência de CC em pacientes com CEP está entre 1% (57) e 7% (58), dependendo dos métodos utilizados para diagnóstico e do seguimento clínico realizado (50, 59). O desenvolvimento de CC nos pacientes com CEP é precoce quando comparado ao desenvolvimento de CC na população geral (em torno de 40 e 78 anos, respectivamente) (33, 55, 60-63). Cerca de 60% dos pacientes com CEP que desenvolvem CC apresentam displasia de ductos biliares em áreas não tumorais ao se avaliar explantes hepáticos (64). Na maioria dos pacientes, o CC é diagnosticado nos primeiros dois anos após o diagnóstico da CEP (61, 65).

A colonização da árvore biliar por parasitas é também importante fator de risco para desenvolvimento do CC, sendo a carcinogênese um evento de múltiplos passos (66). As relações entre *Clonorchis sinensis* (encontrado no Japão, Coreia e Vietnã) e *Opisthorchis viverrini* (encontrado na Tailândia, Laos e Malásia) e CC são bem estabelecidas (67, 68). A infecção por estes helmintos é problema de saúde pública no sudeste asiático e pessoas que têm hábitos de ingerir alimentos crus são expostas a maior risco de contaminação parasitária (69). Os mecanismos de carcinogênese incluem dano mecânico

causado pela movimentação dos parasitas, efeitos de moléculas secretadas/excretadas por estes e resposta imunológica associada a infecção helmíntica (70).

A hepatolitíase é um fator de risco comum em países da Ásia. A incidência de CC relatada neste grupo é variável e está entre 1,3% (71) e 21% (72). O mecanismo envolvido no desenvolvimento da neoplasia inclui colestase, com modificação na composição da bile e inflamação da árvore biliar (73). O CC associado à hepatolitíase é frequentemente evento secundário a alterações inflamatórias da árvore biliar, sendo, muitas vezes, difícil o diagnóstico diferencial entre colangite e neoplasia e, essa dificuldade, faz com que muitas vezes o CC seja descoberto em fase avançada da doença (71, 72, 74).

Anormalidades hepáticas congênitas, como síndrome de Caroli, cistos de colédoco e malformação da placa ductal hepática têm sido associadas à possibilidade de desenvolvimento de CC ao longo da vida. Os complexos de Von Meyenburg, foram inicialmente descritos em 1906 como uma lesão congênita, são encontrados incidentalmente em até 5,6% das autópsias de adultos americanos e a associação entre CCI e estes complexos foi observada em até 35% dos casos (75). A doença/síndrome de Caroli também pertence ao grupo das malformações congênitas da placa ductal e, apesar da incidência baixa na população geral (menos de 1%), tem como complicações colangite, cálculos biliares e pode evoluir neoplasia intraepitelial e carcinoma invasivo (76). Alguns estudos sugerem que a evolução para carcinoma siga o processo em múltiplas fases, passando pela etapa intermediária de displasia (75, 77, 78).

Existem evidências de aumento da incidência de CC em portadores de vírus hepatotrópicos como os vírus da hepatite C (VHC) e da hepatite B (VHB) (79-84). A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) foi identificada como potencial fator de risco, mas ainda não se sabe se o próprio vírus é o principal responsável ou se os fatores correlatos como infecção concomitante pelo VHC são responsáveis pela associação (85).

Tabagismo(86), etilismo(87) e obesidade (88) são considerados fatores de risco, mas os dados na literatura ainda são conflitantes (88).

3.4 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico de CC requer correlação entre dados clínicos, exames de imagem, marcadores tumorais e avaliação citológica/histológica, porém alguns autores referem que nenhum dos métodos diagnósticos disponíveis (incluindo análise histológica de tecido obtido por biópsia) podem diferenciar origem benigna ou maligna de estreitamentos biliares, sendo muitas vezes o diagnóstico realizado em espécime cirúrgico (89-92).

3.4.1 História clínica

A história clínica de CC é geralmente insidiosa. Pacientes com lesões extra-hepáticas, incluindo lesões hilares, costumam desenvolver síndrome colestática (93). Pacientes com lesões intra-hepáticas, em geral, apresentam perda de peso, dor abdominal e sinais e sintomas inespecíficos (93). É sempre importante pesquisar se existem fatores de risco associados (89).

3.4.2 Marcadores tumorais

Os marcadores tumorais mais estudados incluem os antígenos carboidrato 19-9 (CA 19-9), carboidrato 125 (CA-125) e carcinoembrionário (CEA). CA125 e CEA são sabidamente inespecíficos e podem estar elevados no contexto de outras malignidades gastrointestinais e ginecológicas. CA19-9 é mais frequentemente utilizado como marcador tumoral para CC, porém apresenta importantes limitações, pois pode apresentar níveis séricos aumentados em outras neoplasias gastrointestinais e ginecológicas, bem como em casos de colangite bacteriana (94). Além disso, as concentrações do CA19-9 dependem do tipo sanguíneo de Lewis, sendo que cerca de 10% da população é tipo sanguíneo de Lewis negativa e tem níveis indetectáveis de CA19-9 (95).

3.4.3 Exames de imagem

As modalidades mais utilizadas incluem ultrassonografia, tomografia computadorizada, colangiografia e ressonância magnética. A ultrassonografia costuma ser o teste inicial. Essa técnica pode detectar massa intra-hepática, extra-hepática e/ou dilatação de ductos biliares, além de sugerir diagnósticos diferenciais como litíase (96). A tomografia computadorizada é capaz de identificar massas, pode revelar linfadenopatia e é utilizada para estadiamento da doença. A colangiografia é considerada padrão ouro e é importante para diagnóstico e planejamento terapêutico. Pode ser realizada por diferentes meios, incluindo vias endoscópicas (colangiopancreatografia endoscópica retrógrada - CPER), percutânea (colangiografia trans-hepática percutânea - CTP) ou por ressonância magnética (colangiografia por ressonância magnética). Através destes meios, exames citológicos e biópsias podem ser realizados, além de terapias paliativas (97). A ressonância magnética é considerada, atualmente, modalidade de escolha para o diagnóstico de CC. É útil para visualizar parênquima, avaliar envolvimento vascular e extensão da neoplasia, sendo importante para o estadiamento. Outras modalidades incluem tomografia de emissão de pósitrons (PET), análise de imagens digitalizadas (DIA), hibridização *in situ* detectada por fluorescência (FISH), ultrassonografia endoscópica e aspiração por agulha fina guiada por ultrassonografia endoscópica. A confirmação histológica e/ou citológica é importante para o diagnóstico de CC (98). Alguns autores acham controversa a necessidade de biópsia para o diagnóstico de CC. Embora o diagnóstico positivo de câncer seja confirmatório, o resultado negativo não exclui a possibilidade de neoplasia maligna, sendo a cirurgia a melhor opção para o esclarecimento de lesões suspeitas, especialmente em exames de imagem com biópsias negativas (90). A CPER com realização de escovado da via biliar é utilizada para analisar áreas de estreitamento, porém a sensibilidade do método é baixa (positividade em apenas 30% dos CC). A combinação de citologia e histologia permite diagnóstico de 40-70% dos casos de CC (89).

3.5 TRATAMENTO

Diferentes modalidades de tratamento podem ser aplicadas. A ressecção cirúrgica com finalidade curativa é o tratamento de escolha, mas a maioria dos pacientes apresenta doença avançada no momento do diagnóstico. Para CCI isolado, pode ser realizada lobectomia ou segmentectomia hepática. Para lesões hilares, é realizada ressecção de ducto biliar acompanhada ou não por ressecção de parênquima hepático. Pacientes com CCE podem ser submetidos à ressecção da árvore biliar associado ou não à pancreatoduodenectomia. Vários fatores que influenciam a ressecabilidade do tumor devem ser avaliados, incluindo extensão local da neoplasia, metástases, envolvimento vascular e comorbidades. Terapias neoadjuvantes, apesar de serem utilizadas, têm aplicação, muitas vezes, restrita por mal estado geral do paciente ou obstrução biliar (29). O transplante hepático não é o tratamento de escolha inicial para a maioria dos pacientes com CC, porém estudos demonstram benefícios para pacientes selecionados por critérios restritos (99). A radioterapia e/ou quimioterapia adjuvantes parecem não melhorar a sobrevida ou evitar recorrência, entretanto o uso destas terapias é apropriado após a ressecção, mesmo em pacientes com margens cirúrgicas livres de neoplasia, devido à possibilidade de recorrência (99). A terapia paliativa é aplicada em pacientes com tumores não passíveis de ressecção, pois pode melhorar a qualidade de vida e inclui cirurgias de descompressão, *stents*, terapia fotodinâmica e ablação local do tumor (99). Devido aos recentes avanços no entendimento das alterações moleculares, muitas anormalidades genéticas foram demonstradas em diferentes tipos de CC e estudos clínicos têm sido realizados com a utilização de terapia específica, voltada para alguns alvos moleculares que incluem: inibidores pan-HER, inibidores multiquinase, inibidores ROS1 e/ou ALK, anti-IDH1, inibidores MET, análogos de nucleotídeos, antagonistas VEGFR2 e imunoterapia com uso de inibidores anti-PD-1 (100, 101), entretanto a utilização destas ferramentas é ainda limitada a protocolos de pesquisa clínica (102, 103). Dados sobre utilização de terapia anti-HER2 em carcinomas da árvore biliar são pouco numerosos, sendo as

drogas mais utilizadas o Trastuzumabe (104), o Lapatinibe (105) e o Pertuzumabe (13), isolados ou em associação, na dependência da presença da amplificação do oncogene HER2/c-erbB-2 e presença de mutações associadas (13, 101).

3.6 EVOLUÇÃO DAS CLASSIFICAÇÕES UTILIZADAS EM CC

Historicamente, a classificação das neoplasias primárias do fígado é um assunto bastante discutido na literatura mundial. A classificação microscópica inicial dos tumores hepáticos foi proposta por Yamagiwa em 1911, o qual dividiu esses tumores em hepatomas e colangiomas, tendo como objetivo principal dar ênfase à célula que originou a neoplasia. Em 1911, Goldzieher e von Bokay complementaram esta classificação com a introdução das nomenclaturas carcinoma hepatocelular e carcinoma colangiocelular para reforçar a natureza maligna das neoplasias. Edmondson-Steiner em 1954, a partir de uma série com 100 autópsias, inseriu a classificação com base na topografia: carcinoma dos ductos biliares intra-hepáticos e carcinomas hilares. Em 1976, a Associação Internacional para Estudo do Fígado recomendou o uso do termo colangiocarcinoma para as neoplasias originadas na árvore biliar de modo geral e esse termo passou a ser, então, empregado para as neoplasias originadas em qualquer ponto da árvore biliar. Com a evolução do conhecimento de fatores de risco e implicações clínicas, houve uma tendência para se empregar CC para neoplasias originadas da árvore biliar intra-hepática e carcinoma de ductos biliares para tumores com origem extra-hepática e hilar (106). Nas últimas décadas, além dos debates sobre classificação prosseguirem, houve um aumento nos sistemas de classificação propostos para os CCs (34, 107, 108). A elaboração da melhor terminologia ainda é buscada com o intuito de permitir, não apenas a uniformização das nomenclaturas mundialmente, mas também melhores correlações clínico-patológica-radiológicas, avanços no conhecimento molecular e na terapia-alvo (9).

3.6.1 Classificações mais utilizadas em CC

Uma das classificações mais utilizadas em CC é baseada na localização anatômica do tumor ao longo da via biliar. Esta classificação tem importante correlação com aspectos clínicos, patológicos e epidemiológicos (89). As neoplasias de ductos biliares podem ser divididas em CC intra-hepáticos (CCI) e CC extra-hepáticos (CCE), sendo que os limites anatômicos que separam CCE do CCI são os ductos biliares de segunda ordem (109). A maioria dos autores inclui os tumores hilares no grupo CCE, porém em muitos estudos, as neoplasias originadas na confluência dos ductos hepáticos principais, direito e esquerdo (região do hilo hepático), são avaliadas como subgrupo distinto (CCH) (110). Os CCEs, incluindo os tumores hilares, compreendem cerca de 80-90% de todos os casos. Os CCIs são responsáveis por 5-10% de todos os CC (111). Há crescente uso das classificações embasadas em aspectos anatomopatológicos dos tumores, avaliando, especialmente, padrões macroscópicos, aspectos histológicos e, mais recentemente, aspectos imunofenotípicos das células neoplásicas (9, 25, 110, 112).

3.7 ASPECTOS ANATOMOPATOLÓGICOS DO CC

3.7.1 Achados macroscópicos do CC

Os CCs são firmes, esbranquiçados e sem necrose proeminente, havendo diferenças entre CCI e CCE. CCI pode formar massa única, com ou sem nódulos satélites e, usualmente, o fígado é não cirrótico (113). Os CCIs são classificados de acordo com o padrão de crescimento tumoral em: a) subtipo formador de massa (FM), b) subtipo infiltrativo periductal (IP), c) subtipo formador de massa e infiltrativo periductal (FM-IP) e d) subtipo intraductal (ID) (5). Os CCEs, de acordo com o crescimento tumoral, são classificados em: a) esclerosante, b) papilífero ou c) nodular. A classificação morfológica se

relaciona com o tempo de crescimento tumoral e pode revelar implicações prognósticas (114). O padrão macroscópico foi utilizado com finalidades de estadiamento até a sétima edição do *American Joint Committee on Cancer*/União Internacional Contra o Câncer/Classificação para Tumores Malignos (AJCC/UICC/TNM), uma vez que a presença do padrão macroscópico IP determinava a neoplasia como tumor primário 4 (pT4). Na oitava edição do manual da AJCC, a classificação pT4, baseada no aspecto macroscópico foi retirada devido a controvérsias quanto ao prognóstico, sendo preconizado maiores estudos comparativos (115).

3.7.2 Achados microscópicos do CC

Cerca de 95% dos CCs são adenocarcinomas, sendo que a arquitetura da neoplasia costuma ser acinar (padrão mais frequente), tubular, trabecular, sólida ou papilífera (6). CCs podem ser graduados em neoplasias bem diferenciadas, moderadamente diferenciadas ou pouco diferenciadas, sendo a presença de formação glandular, bem como a porcentagem desta, a base para a graduação histológica adotada pela OMS (6).

3.7.3 Subclassificação descrita para os CCs por Yasuni Nakanuma et al

Esta classificação se baseia em aspectos macroscópicos e microscópicos, distinguindo subtipos convencional (ou ductal), ductular, intraductal e variantes menos frequentes. As principais considerações sobre cada subtipo incluem: a) subtipo convencional: consiste em adenocarcinoma invasivo com padrões arquiteturais tubular ou acinar, geralmente bem ou moderadamente diferenciado, podendo, entretanto, apresentar áreas pouco diferenciadas. Macroscopicamente, o padrão ductal se apresenta como lesão formadora de massa e/ou com aspecto infiltrativo periductal e tende a ocupar localização mais central no fígado. O padrão convencional é subdividido em tipo periférico (de pequenos ductos biliares) e tipo peri-hilar (de grandes ductos

biliares); b) subtipo ductular: pertence ao grupo macroscópico formador de massa, com localização periférica no fígado mais frequente. Histologicamente, a neoplasia se assemelha a proliferação ductular extensa, com formações tubulares pequenas, com lumens semelhantes a fendas e formações cordonais. Uma variante descrita para este subtipo histológico se assemelha à malformação de placa ductal, mimetizando complexos de von Meyenburg (Nakanuma, Sato et al. 2012) e c) subtipo intraductal: as neoplasias intraductais dos ductos biliares intra-hepáticos geralmente são observadas nos grandes ductos biliares e geralmente são de duas formas: c1) neoplasia papilífera intraductal ou c2), neoplasia tubular intraductal (Nakanuma 2012). As neoplasias extra-hepáticas são frequentemente adenocarcinomas ou neoplasias com padrão papilífero e podem exibir diferenciações biliar, intestinal, foveolar ou escamosa (6, 116).

3.7.4 Consenso para terminologia das Neoplasias Primárias do Fígado (NPFs) com diferenciações hepatocitária e colangiocelular

Este consenso aborda principalmente as NPFs com diferenciações concomitantes hepatocitárias e colangiocelular (carcinomas hepatobiliares mistos). Os autores reforçam o conceito de um espectro contínuo de NPF com diferenciação hepatocelular exclusiva (carcinoma hepatocelular) e colangiocelular exclusiva (colangiocarcinoma clássico). Entre esses dois polos, reforçam o conceito das neoplasias bifenotípicas. A base para a classificação histológica das NPFs deve ser a observação dos padrões citológicos e arquiteturais das neoplasias em cortes histológicos corados pela HE. Estudos imuno-histoquímicos podem ser realizados em casos de difícil classificação, porém a presença de imunomarcagem para células progenitoras não deve ser o pilar para a nomenclatura destas lesões. Neste consenso, dois tipos de neoplasias são destacados: o carcinoma de células intermediárias (CCInt) e o colangiocarcinoma (CLC). CCInt engloba o carcinoma com células neoplásicas monomórficas, menores do que os hepatócitos clássicos e maiores do que células progenitoras. As células tumorais se organizam em trabéculas, cordões e arranjos sólidos, associados ao estroma com importante

desmoplasia. Glândulas bem formadas não são observadas e mucina não é encontrada. Estudos imuno-histoquímicos revelam imunomarcações das linhagens hepatocelular e colangiocelular. O CLC se assemelha a malformação de placa ductal extensa e caracteristicamente apresenta estruturas ductulares malignas que se anastomosam, com padrões arquiteturais tubular ou glandular associadas ao estroma hialino denso.

3.8 MUCINAS

Mucinas são glicoproteínas de alto peso molecular, presentes na superfície de muitas células epiteliais, com importantes funções de proteção e lubrificação. Tem sido sugerido que a expressão alterada das mucinas teria implicação na biologia tumoral e, estudos revelam que diferentes perfis de expressão de mucinas em CC têm impacto prognóstico (117, 118). A superexpressão de MUC1 é mais comum quando comparada à superexpressão das demais mucinas e esta glicoproteína tem importante participação na ocorrência de metástases, através da inibição da adesão celular e permitindo o escape da vigilância imunológica, influenciando na progressão tumoral e sobrevivência (119). No epitélio intestinal, a secreção de MUC2 pelas células caliciformes gera um microambiente protetor à ativação da inflamação por bactérias, além de apresentar papel na supressão tumoral (120). MUC5AC é uma mucina formadora de gel, expressa em células foveolares gástricas e em células epiteliais traqueobrônquicas (121). Expressão aberrante de MUC5AC é observada em lesões pré-neoplásicas e carcinomas que originam da árvore biliar intra ou extra-hepática, sendo que a superexpressão de MUC5AC é mais observada em neoplasias originadas dos grandes ductos biliares. MUC6 é expressa em uma grande variedade de tecidos, incluindo glândulas gástricas de padrão pilórico, glândulas de Brunner no duodeno, vesícula biliar e vesícula seminal. Poucos estudos avaliam a participação de MUC6 nos CC. Park et al (117) evidenciaram que a expressão de MUC6 apresenta boa correlação com a sobrevida e com melhor grau histológico. MUC4 é expressa em vários tecidos humanos e é uma mucina associada à

membrana. Seus mecanismos moleculares são complexos, interagindo com receptores ERBB2 (122). Quando superexpressa é capaz de influenciar a via de sinalização da proteína HER2, suprimir a apoptose e alterar a adesão celular e interação com a matriz celular, favorecendo migração e metástase a distância (123). Vandenhoute et al (124) relataram que MUC4 não é expressa pelo epitélio biliar normal, porém Lee e Liu (125) referiram que MUC4 é encontrada em 10% dos controles normais e em 67% dos CCs e estaria associada a pior prognóstico.

3.9 ONCOGENE HER2/c-erbB-2

Uma grande variedade de alterações genéticas e moleculares tem sido descrita no CC(126). O CC é frequentemente associado à inativação de genes supressores tumorais como TP53, SMAD4, BCL2 e CDKN2A. Mutações nos oncogenes KRAS, MYC e HER2/c-erbB-2 também são descritas. O oncogene HER2/c-erbB-2 está localizado na banda q21 do cromossomo 17 e codifica uma glicoproteína transmembrana de 185kD. Esta proteína possui atividade tirosinoquinase intracelular semelhante ao receptor de crescimento epidérmico e atua como um receptor de fatores de crescimento. Ela é um membro da família dos receptores do fator de crescimento epidérmico (EGF), a qual inclui o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR/Her1), HER2, HER3 e HER4. A ligação de um fator de crescimento a um dos receptores da família resulta na formação de dímeros. A dimerização é seguida de fosforilação do domínio intracelular do receptor, dando origem a uma cascata de transdução de sinais e consequente ativação do gene, o qual tem importante função no crescimento celular e manutenção do estado de transformação das células. Além disso, ele está envolvido na diferenciação, adesão e motilidade celular, tendo sido demonstrada correlação entre a amplificação do oncogene HER2/c-erbB-2 e agressividade biológica em diversos carcinomas. Quando superexpresso, o oncogene HER2/c-erbB-2 pode sofrer homodimerização espontânea, fato que pode ser clinicamente relevante nos tumores com superexpressão desta proteína de superfície (127). Recentemente, a avaliação

do *status* do oncogene HER2/c-erbB-2 em neoplasias se tornou ainda mais importante após a aprovação pelo *Food and Drug Administration (FDA)* do Trastuzumabe (Herceptin®, Genentech Corporation, EUA), que associado à quimioterapia, pode diminuir a progressão tumoral em carcinomas mamários invasores (128). Existe uma crescente demanda clínica para detecção precisa do *status* do oncogene HER2/c-erbB-2 não apenas em carcinomas mamários invasores, mas também em carcinomas do trato gastrointestinal e pulmão (129). Apesar de existirem diferentes variedades métodos para detecção do *status* do HER2/c-erbB-2, os dois testes mais utilizados na prática de rotina são a imuno-histoquímica para detecção de superexpressão protéica e a hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) ou cromogênica (CISH) para detecção de amplificação gênica (130, 131). A forma mais utilizada como etapa inicial para avaliar a superexpressão da proteína HER2 é o estudo imuno-histoquímico. A análise se concentra na avaliação membrana da célula neoplásica e é semiquantitativa, empregando um sistema de escore (132). Esse sistema avalia a proporção de células com membrana corada e a intensidade da reação, gerando uma escala de quatro pontos que varia de zero ("0") a três ("3"). Existem variações de interpretação que estão associadas à qualidade técnica da reação, ao tipo de anticorpo empregado e à experiência do examinador (133). Testes como FISH e CISH são mais dispendiosos e, apesar dos seus usos serem limitados como testes iniciais, são necessários quando o resultado por estudo imuno-histoquímico é duvidoso, pois o conhecimento do *status* real do gene HER2 é de extrema importância clínica. Métodos de hibridização *in situ* de campo claro foram desenvolvidos, permitindo a detecção de cópias de genes usando um microscópio de fundo claro convencional, permitindo teoricamente que esta avaliação faça parte do trabalho diário do patologista. Estudo conduzido por Hanna et al (134) demonstrou concordância entre as técnicas de CISH e de FISH. Para a interpretação dos resultados de todos esses testes são adotadas as recomendações do Colégio Americano de Patologistas (CAP) e da Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) (135). Os dois protocolos padronizados para interpretação imuno-histoquímica foram determinados em carcinomas mamários invasivos (Quadro 1) e carcinomas gástricos e da junção gastroesofágica (Quadro 2), sendo que neste último grupo há critérios para

interpretação dos resultados em produtos de biópsia e em produtos de ressecção cirúrgica. O protocolo padronizado para interpretação dos resultados de hibridização *in situ* foram determinados em carcinomas mamários invasivos(136) (Quadro 3). Poucos estudos tentam esclarecer as relações entre a proteína HER2 e os achados clinicopatológicos em CC que originam em diferentes partes da árvore biliar e os resultados do status do oncogene HER2/c-erbB-2 em carcinomas da árvore biliar variam na literatura (137). A porcentagem de superexpressão proteica de HER2 varia entre estudos com porcentagens entre 0 e 4% para CCI e entre 5 e 8,5% para CCE (3, 137-142). Essas diferenças podem estar associadas a diferentes critérios de interpretação e à falta de protocolos imuno-histoquímicos ou de estudos de hibridização *in situ* para avaliação específica do escore do HER2 em CC (142).

Quadro 1 – Critérios utilizados para a determinação da expressão do produto do oncogene HER2/c-erbB-2 por técnica de imuno-histoquímica (IHC) em carcinoma mamário invasivo (143)

Resultado	Critério
Negativo (escore 0)	Nenhuma coloração observada ou marcação de membrana incompleta, fraca, / pouco perceptível em $\leq 10\%$ das células tumorais invasivas
Negativo (escore 1+)	Marcação incompleta, fraca / coloração quase imperceptível em $> 10\%$ das células tumorais invasivas *
Duvidoso (escore 2+)	Marcação de membrana circunferencial incompleta e / ou fraca à moderada em $> 10\%$ de células tumorais invasivas ou marcação de membrana completa, intensa e circunferencial em $\leq 10\%$ de células tumorais invasivas *
Positivo (escore 3+)	Marcação de membrana completa, intensa e circunferencial em $> 10\%$ de células tumorais invasivas *

*Facilmente observado em objetiva de pequeno aumento e observado dentro de uma população homogênea e contígua de células tumorais invasivas.

Quadro 2 – Critérios utilizados para a determinação da expressão do produto do oncogene HER2/c-erbB-2 por técnica de imuno-histoquímica (IHC) em adenocarcinoma gástrico e da junção esofagogástrica (peça cirúrgica) (12, 144, 145)

Resultado	Critério
Negativo (escore 0)	Ausência de marcação ou marcação em $\leq 10\%$ das células neoplásicas
Negativo (escore 1+)	Marcação de membrana fraca ou discretamente perceptível em $\geq 10\%$ das células; células são positivas apenas em parte da sua membrana
Duvidoso (escore 2+)	Marcação completa fraca a moderada, basolateral ou lateral em $> 10\%$ das células neoplásicas
Positivo (escore 3+)	Marcação forte, basolateral ou lateral em $> 10\%$ das células neoplásicas

Quadro 3 – Resultado da avaliação do status da amplificação do oncogene HER2/c-erbB-2 por técnica de Hibridização *in situ* por fluorescência (ensaio com dupla marcação) (146)

Grupo	Critério/Resultado
Grupo 1	O resultado é considerado POSITIVO se a razão HER2/Chr17 $\geq 2,0$ e número médio de sinais de HER2 por célula $\geq 4,0$.
Grupo 2	Se a razão HER2/Chr17 $\geq 2,0$ e número médio de sinais de HER2 por célula $< 4,0$: avaliar o resultado imuno-histoquímico de HER2: se HER2 0 ou 1+, considerar NEGATIVO; se 2+, recontagem de sinais (pelo menos 20 células) por outro observador que não tenha conhecimento dos resultados prévios. Se houver manutenção desse resultado, considerar NEGATIVO; se 3+, considerar POSITIVO.
Grupo 3	Se a razão HER2/Chr17 $< 2,0$ e número médio de sinais de HER2 por célula $\geq 6,0$: avaliar o resultado imuno-histoquímico de HER2: se HER2 0 ou 1+, considerar NEGATIVO; se 2+, recontagem de sinais (pelo menos 20 células) por outro observador que não tenha conhecimento dos resultados prévios. Se houver manutenção desse resultado, considerar POSITIVO; se 3+, considerar POSITIVO.
Grupo 4	Se a razão HER2/Chr17 $< 2,0$ e número médio de sinais de HER2 por célula $\geq 4,0$ e $< 6,0$: avaliar o resultado imuno-histoquímico de HER2: se HER2 0 ou 1+, considerar NEGATIVO; se 2+, recontagem de sinais (pelo menos 20 células) por outro observador que não tenha conhecimento dos resultados prévios. Se houver manutenção desse resultado, considerar NEGATIVO ; se 3+, considerar POSITIVO.
Grupo 5	O resultado é considerado NEGATIVO (NÃO AMPLIFICADO) se a razão HER2/Chr17 $< 2,0$ e número médio de sinais de HER2 por célula $< 4,0$.

Resultados observados em uma população homogênea e contínua de $\geq 10\%$ de células tumorais invasivas.

4 INDIVÍDUOS E MÉTODOS

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Uma vez que a análise das peças cirúrgicas faz parte da rotina do serviço de patologia e que a coleta de dados de prontuário se deu de maneira retrospectiva, foi considerada desnecessária pelo comitê de ética a utilização de termo de consentimento por parte dos pacientes (número do protocolo no comitê de ética: 248/14).

4.2 SELEÇÃO DOS CASOS

Todos os casos de pacientes com diagnóstico de colangiocarcinoma ou adenocarcinoma de vias biliares, operados entre 1992 e 2009, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade do Estado de São Paulo (HC-FMUSP), encaminhados para a Divisão de Anatomia Patológica (DAP) deste hospital, presentes no banco de dados do Laboratório de Investigação Médica 14 (LIM-14) foram considerados para o estudo.

4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Paciente submetido a procedimento cirúrgico excisional realizado no HC-FMUSP com laudo anatomopatológico emitido pela DAP no período avaliado.
- Comprometimento tumoral de vias biliares intra-hepáticas, da região hilar ou extra-hepáticas.
- Comprometimento predominante de vias biliares em detrimento de tecido pancreático, quando a lesão for localizada no colédoco distal.
- Disponibilidade de blocos de parafina representativos da neoplasia nos arquivos da DAP.

- Material suficiente nos blocos de parafina para confecção do microarranjo tecidual (TMA).

4.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Casos que não tinham o espécime de ressecção disponível para reavaliação. Não foram utilizados espécimes representados apenas por biópsia incisional da lesão.
- Presença de diferenciação morfológica hepatocitária na neoplasia.

4.5 MATERIAL SELECIONADO

Os espécimes cirúrgicos haviam sido previamente fixados em solução de formalina tamponada a 10%, seguindo os protocolos convencionais de processamento de tecido. As lâminas histológicas originais coradas pela HE, quando presentes, foram reavaliadas. Quando apenas os blocos de parafina estavam disponíveis no departamento de patologia, foram obtidas novas lâminas a partir destes.

4.6 VARIÁVEIS ANATOMOPATOLÓGICAS AVALIADAS

Em reuniões realizadas com o Grupo de Estudo do Fígado da DAP-HCFMUSP foram estabelecidos os dados a serem coletados nos casos selecionados. Os resultados foram obtidos através das revisões do prontuário médicos, do laudo anatomopatológico original e das lâminas coradas pela HE dos casos selecionados. No prontuário médico foram pesquisadas informações sobre possível doença hepática de base e analisados os relatórios de exames de imagem com referências sobre localização e medida das neoplasias. A partir dos laudos anatomopatológicos originais foram obtidas informações sobre localização ao longo da árvore biliar, medida do tumor e tipo histológico

diagnosticado. Em seguida, os casos foram revistos pela autora (LVM) e por outro colega patologista (ESM) para obtenção dos dados morfológicos (aspectos macroscópicos, microscópicos e achados sugestivos de doença hepática de base).

4.6.1 Subtipos histológicos

Levando em consideração as recomendações da OMS 2010 (6), a classificação descrita por Nakanuma et al (7, 8, 10, 110) e, mais recentemente, a classificação proposta pelo consenso para terminologia para NPF com diferenciações colangiocítica e hepatocelular (9), as neoplasias foram assim classificadas:

4.6.1.1 Colangiocarcinoma de padrão convencional (CCC)

Neoplasias com aspectos histológicos semelhantes a ductos biliares maduros, geralmente com formações glandulares ou cribriformes, em meio a desmoplasia moderada/acentuada, com aspecto citológico bileopancreático e frequente infiltração perineural associada (Figura 1).

4.6.1.2 Colangiolocarcinoma (CLC)

Neoplasias com aspectos histológicos semelhantes a ductos biliares em fase intermediária de maturação, também denominados colangiólos, exibindo formações tubulares mais irregulares ou cordonais, com padrão citológico semelhante às proliferações biliares metaplásicas, com células cuboidais ou colunares baixas (Figura 2).

4.6.1.3 Formas mistas entre CCC e CLC

Aspectos histológicos que mesclam os dois itens anteriormente descritos.

4.6.1.4 Carcinoma de células intermediárias (CaCI)

Neoplasias menos diferenciadas, com padrões arquiteturais cordonais, tubulares e até mesmo sólidos, com aspecto citológico precursor entre hepatócito e colangiócito (Figura 3).

4.6.1.5 Variantes histológicas menos frequentes

Incluem os carcinomas mucinoso, escamoso, de células claras, de células pouco coesas (com células em anel de sinete), além dos adenocarcinomas intraductais (Figura 4).

Figura 1 – Colangiocarcinoma de padrão convencional (CCC; HE; 200x)

Figura 2 – Colangiolocarcinoma (CLC; HE; 200x)

Figura 3 – Carcinoma de células intermediárias (CaCl; HE; 200x)

Figura 4 – Carcinoma de células em anel de sinete (HE; 200x)

4.6.2 Localização da neoplasia ao longo da árvore biliar

As lesões foram divididas em intra-hepáticas (CCI), hilares (CCH) e extra-hepáticas (CCE) e os critérios utilizados seguiram os parâmetros descritos pela literatura e previamente comentados na sessão 3.6.1.

4.6.2.1 Colangiocarcinoma intra-hepático

Neoplasias da árvore biliar que se originam a partir de ductos biliares de segunda ordem em sentido aos ductos biliares menores, os quais têm localização mais periférica no órgão (148).

4.6.2.2 Colangiocarcinoma hilar

Neoplasias originadas na confluência dos ductos hepáticos principais direito e esquerdo, mais especificadamente, a região hilar, incluindo os ductos biliares de segunda ordem (149).

4.6.2.3 Colangiocarcinoma extra-hepático

Neoplasias originadas após a confluência dos ductos biliares de segunda ordem (148).

4.6.3 Padrões macroscópicos

Os tumores foram classificados em formadores de massa (FM), infiltrativos periductais (IP) e com crescimento intraductal (ID), conforme a apresentação predominante, sendo esta definição baseada em informes obtidos pela avaliação de relatório de exames de imagem exames de imagem e em descrições dos exames anatomopatológicos.

4.6.3.1 Neoplasias com padrão de crescimento formador de massa

Geralmente se apresentam como lesões firmes, esbranquiçadas, sem necrose proeminente, sendo lesões únicas ou com nódulos satélites.

4.6.3.2 Neoplasias com padrão de crescimento infiltrativo periductal

Tendem a espessar longitudinalmente a parede dos ductos biliares, muitas vezes estreitando a luz destes de forma significativa.

4.6.3.3 Neoplasias com padrão de crescimento intraductal

Crescem para o interior do ducto biliar, de modo vegetante ou papilífero, dilatando e ocluindo a sua luz.

4.6.4 Tamanho do tumor em milímetros

Foi considerada a medida do maior eixo em milímetros da neoplasia. Essa medida foi obtida pela descrição dos relatórios de exames de imagem presentes nos prontuários médicos e confirmada pelas descrições macroscópicas dos laudos anatomopatológicos, porquanto há estudo que sugere que exames de imagem podem subestimar o tamanho da neoplasia, sendo mais fiel à medida realizada no espécime cirúrgico, referida no relatório anatomopatológico (147). Para efeitos de análise neste trabalho, os tumores foram agrupados em menores ou iguais a 40 mm e maiores que 40 mm.

4.6.5 Grau de diferenciação histológica tumoral

As lesões foram classificadas de acordo com a porcentagem de formação tubular, seguindo diretrizes aplicadas pela OMS 2010. Foram consideradas bem diferenciadas quando há mais de 95% de formação acinar, moderadamente diferenciadas quando se observava entre 50 e 95% de formação acinar, pouco diferenciadas se entre 5 e 50% de formação acinar e indiferenciadas quando a neoplasia exibia menos de 5% de formação acinar.

4.6.6 Evidências histológicas sugestivas de doenças de base

Evidências histológicas sugestivas de doenças hepáticas, especialmente litíase hepática, malformação de placa ductal e colangite crônica foram pesquisadas em todos os casos nos quais havia tecido hepático adjacente não comprometido pela neoplasia.

4.6.6.1 Litíase hepática

Considerada presente quando havia referência sobre a presença de cálculos biliares nos relatórios dos exames anatomopatológicos ou estes foram identificados ao microscópio.

4.6.6.2 Malformação de placa ductal

Considerada presente quando estruturas semelhantes aos complexos de Von Meyenburg foram detectadas. Estes são considerados uma malformação hepática benigna que se apresenta histologicamente como dilatações císticas e irregulares dos ductos biliares, de 1 mm a 15 mm de diâmetro, envolvidas por abundante tecido fibroso.

4.6.7 Colangite crônica

Considerada presente quando manguitos colagênicos mais espessos do que o esperado ao redor de ductos biliares e colangiólos foram observados à microscopia.

4.7 CONSTRUÇÃO DE MICROARRANJO TECIDUAL (TMA) E ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO

4.7.1 Descrição da confecção do TMA

Esta técnica é útil para realização de estudos imuno-histoquímicos e de hibridização *in situ*. Em cada caso, duas áreas representativas da neoplasia foram marcadas nas lâminas e nos blocos de parafina correspondentes. Cilindros teciduais de 1,0 milímetro de diâmetro foram extraídos das áreas marcadas nos blocos de parafina doadores e transportados para outro bloco de parafina receptor através de equipamento mecanizado de precisão MTA1 (Manual Tissue Microarayer, Beecher Instruments, EUA). Os blocos receptores foram confeccionados com parafina Histosec em pastilhas (Merck, EUA). Cada cilindro foi colocado no bloco receptor de acordo com posição determinada em planilha previamente elaborada em Excel (Microsoft Office, 2003, EUA), com espaçamento de 0,3 milímetro entre as amostras. Para orientação de posição para análise em microscópio, na primeira linha e nas primeiras três posições da primeira coluna foram dispostas amostras de tecidos controles obtidas de autopsia (rim ou pulmão), conforme protocolo de procedimentos do LIM-14.

Cada caso foi representado em quatro cilindros distribuídos em duplicidade em bloco receptor e bloco espelho, visando minimizar possível viés de amostragem, resultante de perdas físicas e/ou de representatividade inerentes à tecnologia de TMA. Os blocos de TMA foram submetidos, em sessão única para evitar perdas ao bloco com aparamentos deste a cortes seriados com espessura de 3µm em micrótomo manual (Leica Instruments), obtendo-se 70 cortes de cada bloco, cada um distribuído em lâmina sinalizada, que foi embebida em parafina e arquivada em caixa escura a -20°C, visando à preservação da antigenicidade das amostras, conforme descrito por DiVito et al (150).

4.7.2 Estudo imuno-histoquímico

As reações imuno-histoquímicas foram realizadas nos cortes de TMA pela equipe do LIM-14/Patologia hepática/FMUSP, seguindo as etapas discriminadas a seguir: a) desparafinização dos cortes de 3µm de espessura do material incluído em parafina: incubação com xilol a 60°C por 15 minutos, seguido de outra incubação com xilol à temperatura ambiente por 15 minutos; b) hidratação dos cortes em concentrações de etanol a 100% com 3 banhos de 30 segundos cada, seguidos de etanol a 95%, 80% e 70% por 30 segundos cada e lavagem em água corrente e água destilada; c) recuperação antigênica mediante incubação das lâminas em solução de EDTA 1 mM pH 8,0, em panela a vapor; após a fervura da água da panela, colocada a cuba com as lâminas em solução de recuperação, por 40 minutos. Deixado esfriar por 20 minutos à temperatura ambiente; d) lavagens em água corrente e água destilada; e) bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada (H₂O₂) a 6% diluída v/v em metanol, em três banhos de 10 minutos cada; f) lavagens em água corrente e água destilada, seguida de lavagem com solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 10 mM pH 7,4 por 5 minutos; g) bloqueio de proteínas com Cas Block (Zymed) por 10 minutos a 37°C; h) incubação das lâminas com anticorpo primário (específico para o antígeno) diluído em solução de albumina bovina (BSA) (SIGMA, E.U.A.) a 1,0% e azida sódica NaN₃ (Inlab, São Paulo) 0,1% em PBS, em câmara úmida: 30 min. a 37°C e, em seguida, 18 horas (overnight) a 4°C; i) lavagens em tampão PBS com três trocas de cinco minutos cada; j) incubação com o bloqueador pós-primário (Post Primary Block, NovoLink Max Polymer Detection System, Newcastle, Reino Unido), por 30 minutos a 37°C; k) lavagens com tampão PBS com três trocas de três a cinco minutos cada; l) incubação com NovoLink (Polímero) do mesmo kit por 30 minutos a 37°C; m) revelação com solução de substrato cromogênico contendo diaminobenzidina (Sigma, E.U.A.) a 0,10%, peróxido de hidrogênio a 0,06%, dimetil sulfoxido (Labsynth) a 1% em PBS, em banho de cinco minutos, a 37°C; n) lavagens em água corrente e água destilada; o) contracoloração com Hematoxilina de Harris por um minuto, lavagens em água corrente e água

destilada. Imersão rápida em água amoniacal (solução de hidróxido de amônia 0,5%) seguido de lavagens em água corrente e água destilada; p) desidratação dos cortes em banhos sucessivos de etanol a 50%, 80%, 95% e etanol absoluto (três trocas de um minuto cada), diafanização em banhos de xilol (04 trocas de um minuto cada) e montagem em meio permanente (Entellan Merck) com lamínula. As características dos anticorpos utilizados estão listadas no quadro 4.

4.7.2.1 Mucinas

As reações imuno-histoquímicas dirigidas aos antígenos MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC e MUC6 foram interpretadas como positivas ou negativas. Resultado positivo foi assinalado quando mais de 5% das células tumorais exibiram imunorreatividade citoplasmática. O caso foi definido como positivo quando, em pelo menos, uma das duas amostras do tumor, o valor de corte pode ser identificado. Os casos foram definidos como negativos se a positividade para o marcador foi observada em quantidade menor ou igual a 5% das células ou se a reação foi completamente negativa.

4.7.2.2 Oncoproteína HER2

As amostras foram avaliadas segundo protocolos determinados pelo (CAP)/ASCO, aplicando os critérios para carcinoma de mama invasivo (Quadro 1) e para carcinomas gástricos/da junção gastroesofágica (Quadro 2) em produtos de ressecção cirúrgica, pois os casos estudados com diagnóstico de CC são também provenientes de ressecção cirúrgica (12, 143, 145, 151-153).

O protocolo proposto para carcinoma mamário invasivo foi nomeado neste trabalho como protocolo mama e o protocolo proposto para carcinomas gástricos/da junção gastroesofágica invasivos em produto de ressecção cirúrgica foi nomeado como protocolo gástrico.

4.7.3 Hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) para avaliação da amplificação do oncogene HER2/c-erbB-2

O estudo foi realizado no laboratório de patologia molecular do ICESP. Cortes de 3µm de espessura de cada TMA obtidos por micrótomo histológico foram dispostos em lâminas de vidro carregadas com cargas (Starfrost) e submetidos, nessa ordem, à desparafinação em xilol, hidratação em álcool etílico absoluto, lavagem em água destilada, pré-tratamento em solução de tampão MES (ácido Z- [N – morfolino] etassulfônico) em banho maria pré-aquecido a 80°C por uma hora, sendo então submetidas à digestão enzimática com pepsina (pronta para uso –DAKO®) em concentração estabelecida pelo fabricante por oito minutos à temperatura ambiente. Após serem lavadas com solução 2x SSC (Sodium citrate, Sodium chloride/DAKO®) por dois minutos, desidratadas em álcool em concentrações crescentes (75%, 80% e 100% por dois minutos cada) e secas em temperatura ambiente por cinco minutos, foram aplicados dez microlitros da sonda em concentração pré-estabelecida pelo fabricante (HER-2/CEN17 IQISH-DAKO®), recobertas com lamínula 22 x 22 mm e vedadas em material selante (Selante – DAKO®). As lâminas foram coloradas no equipamento Hybridizer – DAKO® para codenaturação por cinco minutos a 82°C e hibridação por 20 horas a 45°C, conforme indicações do fabricante. No segundo dia, as lâminas foram retiradas do equipamento, foram removidos o selante e a lamínula e as lâminas foram mergulhadas em solução pré-aquecida de tampão de lavagem adstringente em banho maria pré-aquecido a 45°C por 30 minutos. As lâminas foram lavadas em solução 2x SSC (Sodium citrate, Sodium chloride/DAKO®) por dois minutos à temperatura ambiente, passando-as em álcool em concentrações crescentes (75%, 80% e 100% por dois minutos cada) para desidratação. Após secagem das lâminas em temperatura ambiente foi efetuada a contracoloração com 15 microlitros de DAPI (meio de montagem de fluorescência – DAKO).

A contagem de sinais fluorescentes vermelhos referentes ao número de cópias do gene HER2 e de sinais fluorescentes verdes referentes ao centrômero do cromossomo 17 foi realizada de modo visual, em sala escura, com o auxílio de um microscópio de fluorescência Nikon®eclipse 80i com filtros

apropriados para o espectro dos sinais a serem observados. Os resultados sobre o status da amplificação do oncogene HER2/c-erbB-2 foram obtidos conforme critérios apresentados no quadro 3.

Quadro 4 – Características dos anticorpos utilizados nas reações imuno-histoquímicas realizadas LIM-14/Patologia hepática/FMUSP

Antígeno	Clone	Título	Recuperação Antigênica	Revelação
HER2	SP3	1:2000	pv, ác. Cítrico 10 mM, pH 6	Novolink
MUC1	VU-4-H5	1:400	pv, EDTA 1mM, pH 8	Novolink
MUC2	CCP58	1:800	pv EDTA pH 8,0	Novolink
MUC4	1G8	1:200	pv, EDTA 1mM, pH 8	Novolink
MUC5AC	45M1	1:800	pv EDTA pH 8,0	Novolink
MUC6	CLH5	1:600	pv EDTA pH 8,0	Novolink

HER2: oncoproteína HER2; MUC1: mucina 1; MUC4: mucina 4; MUC5AC: mucina 5AC; MUC6: mucina 6; LIM-14: laboratório de investigação médica 14; FMUSP: Faculdade de Medicina da Universidade do Estado de São Paulo.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram calculadas as frequências absolutas e relativas (porcentagens) para a descrição das variáveis categóricas e medidas de tendência central e dispersão para as variáveis quantitativas.

Para as variáveis categóricas, foi aplicado o teste multivariado de Fisher. Valores de p abaixo de 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados significativos.

Para a avaliação da validade diagnóstica da análise imuno-histoquímica do produto do oncogene HER-2/c-erbB-2, segundo os protocolos para tumores mamários e gástricos, foram estimadas as medidas de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e seus respectivos intervalos de confiança de 95%. O resultado da hibridização *in situ* por fluorescência foi considerado o padrão-ouro para a determinação do resultado final da amplificação do oncogene HER-2/c-erbB-2.

Para a avaliação da concordância entre os dois protocolos imuno-histoquímicos foi calculado o coeficiente Kappa de Cohen (acompanhado do intervalo de confiança de 95%) e os resultados foram classificados segundo os critérios de Landis & Koch (Quadro 5).

Toda a análise foi feita com auxílio do pacote estatístico Stata versão 15.1.

Quadro 5 – Valores do coeficiente kappa de Cohen e sua interpretação

Kappa	Interpretação
<0,00	Concordância insignificante (menor que por acaso)
0,01-0,20	Concordância pobre
0,21-0,40	Concordância razoável
0,41-0,60	Concordância moderada
0,61-0,80	Concordância forte
0,81-1,00	Concordância quase perfeita

6 RESULTADOS

6.1 DISTRIBUIÇÃO DE CASOS DE ACORDO COM A CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA

No presente estudo, foram observados 38 casos de CC convencional (CCC) ($38/56 = 68\%$), quatro casos de colangiolo carcinoma (CLC) ($4/56 = 7\%$), nove casos de carcinoma de células intermediárias (CaCI) ($9/56 = 16\%$), um caso combinado CCC-CLC ($1/56 = 2\%$) e quatro casos de variantes menos freqüentes ($4/56 = 7\%$), que incluíram um carcinoma com células em anel de sinete, um carcinoma de células claras, um carcinoma mucinoso e um carcinoma intraductal (Tabela 1).

6.2 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS

Do grupo de 56 pacientes selecionados, foram observados 33 homens (59%) e 23 mulheres (41%).

A idade dos pacientes desta série de casos variou entre 23 e 85 anos, sendo a idade média de 56,3 anos (desvio padrão = 12,9 anos).

No sexo feminino, foram observados 12 casos CCCs ($12/38 = 31,6\%$), três casos CLCs ($3/4 = 75\%$), seis casos CaCIs ($6/9 = 66,7\%$) e duas variantes menos frequentes ($2/4 = 50\%$). No sexo masculino foram observados 26 casos CCCs ($26/56 = 68,4\%$), um caso CLC ($1/4 = 25\%$), três casos CaCIs ($3/9 = 33,3\%$) e duas variantes menos frequentes ($2/4 = 50\%$).

Os subgrupos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quanto à distribuição por gênero (teste de Fisher, $p = 0,135$).

6.3 LOCALIZAÇÃO AO LONGO DA ÁRVORE BILIAR

Os CCCs estão localizados principalmente no hilo hepático (22/38 = 57,9%) ou na árvore biliar extra-hepática (16/38 = 42,1%). Por sua vez, todos os casos CLCs são intra-hepáticos (4/4 = 100%), bem como o caso combinado CCC-CLC (1/1 = 100%) e a maioria dos casos CaCIs (6/9 = 66,7%). Os demais casos CaCIs (3/9=33,3%) são hilares. No que se refere às variantes menos comuns, a distribuição revela metade dos casos na região hilar (2/4=50%) e metade dos casos na região extra-hepática (2/4=50%)(Tabela1).

Os subtipos histológicos apresentam diferenças estatisticamente significativas quanto à localização na árvore biliar (teste de Fisher, $p<0,01$).

6.4 PADRÃO MACROSCÓPICO

A avaliação do aspecto macroscópico do tumor revela que a maioria dos CCCs é do tipo IP (34/38 = 89,5%), sendo os quatro casos restantes do tipo FM (4/38 =10,5%). Todos os casos CLCs (4/4 = 100%), CaCI (9/9 = 100%) e o caso misto CCC-CLC (1/1 = 100%) apresentam o padrão FM. Para as variantes menos frequentes, observam-se dois casos do tipo FM (2/4 = 50%), um caso do tipo IP (1/4 = 25%) e um caso (1/4 = 25%) com padrão ID (Tabela 1). O padrão macroscópico difere entre os subtipos histológicos com significância estatística (teste de Fisher, $p<0,01$).

6.5 TAMANHO DA NEOPLASIA EM MILÍMETROS

O tamanho tumoral variou de 6 a 130 mm com mediana de 25 mm. Considerando o intervalo de tamanho, 42 casos possuem tamanho igual ou inferior a 40 mm (42/56 = 75%) e 14 casos apresentaram tamanho superior a 40 mm (14/56 = 25%).

Considerando os subtipos histológicos, a maioria dos CCCs (36/38 = 94,7%), metade dos CLCs (2/4 = 50%), a minoria dos CaCIs (1/9 = 11,1%) e a

maioria das variantes menos comuns ($3/4 = 75\%$) apresentam tamanho igual ou inferior a 40 mm. Para as neoplasias com extensão superior a 40 mm temos a minoria dos CCC ($2/38 = 5,3\%$), metade dos CLCs ($2/4 = 50\%$), a maioria dos CaCIs ($8/9 = 88,9\%$), o caso misto CCC-CLC ($1/1 = 100\%$) e a minoria das variantes menos comuns ($1/4 = 25\%$) (Tabela 1).

Os subtipos histológicos são diferentes quando correlacionados com o seu tamanho, com significância estatística e o tamanho é especialmente importante para diferenciar CCC, mais associados a dimensões menores do que 40 mm e CaCI mais associados a dimensões maiores que 40mm (teste de Fisher, $p < 0,01$).

6.6 GRAU HISTOLÓGICO DE DIFERENCIAÇÃO TUMORAL SEGUNDO A OMS

A maioria dos casos de CC foi graduada como bem diferenciada ($33/56 = 58,9\%$), seguida por casos moderadamente diferenciados ($19/56 = 33,9\%$), e pouco diferenciados ($3/56 = 5,4\%$), com um único caso indiferenciado ($1/56 = 1,8\%$). Para o grupo CCC, 30 casos são bem diferenciados ($30/38 = 78,9\%$), seis casos moderadamente diferenciados ($6/38 = 15,8\%$) e dois casos pouco diferenciados ($2/38 = 5,3\%$). No grupo CLC obtivemos um caso bem diferenciado ($1/4 = 25\%$) e três casos moderadamente diferenciados ($3/4 = 75\%$). Para o grupo CaCI foram observados oito casos moderadamente diferenciados ($8/9 = 88,9\%$) e um caso pouco diferenciado ($1/9 = 11,1\%$). O caso combinado CCC-CLC foi moderadamente diferenciado ($1/1 = 100\%$) e para as variantes menos comuns, dois casos foram graduados como bem diferenciados ($2/4 = 50\%$), um caso como moderadamente diferenciado ($1/4 = 25\%$) e um caso indiferenciado ($1/4 = 25\%$) (Tabela 1). O grau de diferenciação tumoral difere entre os subgrupos histológicos com significância estatística (teste de Fisher, $p < 0,01$).

6.7 DOENÇA DE BASE

Hepatolítíase foi detectada em quatro casos ($4/56 = 7,1\%$), sendo dois casos CCCs ($2/38 = 5,3\%$), um caso CaCI ($1/9 = 11,1\%$) e o caso misto CCC-CLC ($1/1 = 100\%$). A malformação de placa ductal foi visualizada em 14 casos ($14/56 = 25\%$), sendo nove CCCs ($9/38 = 23,7\%$), um CLC ($1/4 = 25\%$), três CaCIs ($3/9 = 33,3\%$) e um misto CCC-CLC ($1/1 = 100\%$). Aspectos indicativos de colangite crônica foram diagnosticados em 27 casos de CCs ($27/56 = 48,2\%$) sendo 13 casos CCCs ($13/56 = 34,2\%$), três casos CLCs ($3/4 = 75\%$), sete casos CaCIs ($7/9 = 88,9\%$) e três variantes menos comuns ($3/4 = 75\%$) (Tabela 2).

A presença ou tipo de doença de base hepática não se correlaciona com subtipo histológico de CC (teste de Fisher, $p=0,187$, $p=0,531$ e $p=0,413$, respectivamente para hepatolítíase, malformação de placa ductal e colangite crônica).

Tabela 1 – Número e porcentagem de indivíduos com CC, segundo subtipo histológico e aspectos referentes à localização ao longo da árvore biliar, padrão macroscópico, tamanho da neoplasia e grau de diferenciação tumoral

Variáveis	Subtipo Histológico (%)				Variantes menos comuns (n=4)	Total (n=56)
	CCC (n=38)	CLC (n=4)	CaCI (n=9)	CCC-CLC (n=1)		
Localização*						
CCI	0 (0,0)	4 (100)	6 (66,7)	1 (100)	0 (0,0)	11 (19,6)
CCH	22 (57,9)	0 (0,0)	3 (33,3)	0 (0,0)	2 (50,0)	27 (48,2)
CCE	16 (42,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (50,0)	18 (32,2)
Padrão macroscópico*						
FM	4 (10,5)	4 (100)	9 (100)	1 (100)	2 (50,0)	20 (35,7)
IP	34 (89,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (25,0)	35 (62,5)
ID	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (25,0)	1 (1,8)
Tamanho (mm)*						
≤40	36 (94,7)	2 (50,0)	1 (11,1)	0 (0,0)	3 (75,0)	42 (75,0)
>40	2 (5,3)	2 (50,0)	8 (88,9)	1 (100)	1 (25,0)	14 (25,0)
Grau de diferenciação*						
Bem	30 (78,9)	1 (25,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (50,0)	33 (58,9)
Moderadamente	6 (15,8)	3 (75,0)	8 (88,9)	1 (100)	1 (25,0)	19 (33,9)
Pouco	2 (5,3)	0 (0,0)	1 (11,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (5,4)
Indiferenciado	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (25,0)	1 (1,8)

*Nível de significância inferior a 0,05

CCC: colangiocarcinoma de padrão convencional; CLC: colangiolo carcinoma; CCC-CLC: colangiocarcinoma misto convencional e ductular; CaCI: carcinoma de células intermediárias; CCI: colangiocarcinoma intra-hepático; CCH: colangiocarcinoma hilar; CCE: colangiocarcinoma extra-hepático; MF: formador de massa; IP: infiltrativo periductal, ID: intraductal; mm: milímetros, n: número, %: porcentagem.

Tabela 2 – Número e porcentagem de indivíduos com CC segundo subtipo histológico e doenças hepáticas de base

Doença de base	Subtipo Histológico n (%)					Total (n=56)
	CCC (n=38)	CLC (n=4)	CaCI (n=9)	CCC-CLC (n=1)	Variantes menos comuns (n=4)	
Hepatolitíase*						
Não	22 (57,9)	4 (100)	8 (88,9)	0 (0,0)	3 (75,0)	37 (66,1)
Sim	2 (5,3)	0 (0,0)	1 (11,1)	1 (100)	0 (0,0)	4 (7,1)
Não avaliável	14 (36,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (25,0)	15 (26,8)
Malformação da placa*						
Não	15 (39,5)	3 (75,0)	6 (66,7)	0 (0,0)	3(75,0)	27 (48,2)
Sim	9 (23,7)	1 (25,0)	3 (33,3)	1 (100)	0 (0,0)	14 (25,0)
Não avaliável	14 (36,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (25,0)	15 (26,8)
Colangite crônica*						
Não	11 (29,0)	1 (25,0)	2 (11,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	14 (25,0)
Sim	13 (34,2)	3 (75,0)	7 (88,9)	1 (100)	3 (75,0)	27 (48,2)
Não avaliável	14 (36,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (25,0)	15 (26,8)

* Ausência de significância em nível inferior a 0,05

CCC: colangiocarcinoma de padrão convencional; CLC: colangiocarcinoma; CCC-CLC: colangiocarcinoma misto convencional e ductular; CaCI: carcinoma de células intermediárias; n: número, %: porcentagem.

6.8 IMUNOEXPRESSÃO DE MUCINAS

A maioria dos CCs examinados ($52/56 = 92,9\%$) é positiva para imunexpressão de MUC1 e, dentre estes, temos todos os 38 casos CCCs ($38/38 = 100\%$), três casos CLCs ($3/4 = 75\%$), sete casos CaCIs ($7/9 = 77,8\%$), o caso misto CCC-CLC ($1/1 = 100\%$) e três variantes menos comuns ($3/4 = 75\%$).

Para a imunexpressão de MUC2, 12 casos são positivos ($12/56 = 21,4\%$) sendo a maioria do tipo CCC ($9/38 = 27,7\%$), seguidos por um caso CaCI ($1/9 = 11,1\%$), o caso misto CCC-CLC ($1/1 = 100\%$) e uma variante menos comum ($1/4 = 25\%$).

Mais da metade dos CCs examinados imuno expressam MUC4 ($31/56 = 55,4\%$), sendo 24 CCCs ($24/38 = 63,2\%$), dois CLCs ($2/4 = 50\%$), dois CaCIs ($2/9 = 22,2\%$), o caso misto CCC-CLC ($1/1 = 100\%$) e dois casos menos frequentes ($2/5 = 50\%$).

A avaliação da imunexpressão de MUC5AC evidencia positividade em 40 casos de CCs ($40/56 = 71,4\%$), com a seguinte distribuição entre os grupos: 35 casos CCCs ($35/38 = 92,1\%$), um caso CaCI ($1/9 = 11,1\%$), o caso misto CCC-CLC ($1/1 = 100\%$) e três variantes raras ($3/4 = 75\%$). Todos os casos CLCs ($4/4 = 100\%$) foram negativos para MUC5AC.

A expressão de MUC6 é vista em 37 casos ($37/56 = 66,1\%$) e a maior parte deles é do tipo CCC ($29/38 = 76,3\%$), seguidos por cinco casos CaCIs ($5/9 = 55,6\%$) e três variantes menos comuns ($3/4 = 75\%$). Todos os casos CLC ($4/4 = 100\%$) foram negativos para MUC6.

Houve significância estatística para diferenciar os subgrupos histológicos pelo padrão de imunexpressão das mucinas MUC1, MUC5AC e MUC6 (teste de Fisher, $p=0,01$, $p=0,332$ e $p=0,179$, $p<0,001$ e $p=0,019$, respectivamente para MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC e MUC6) (Tabela 3).

Tabela 3 – Número e porcentagem de indivíduos com CC, segundo padrão de expressão das mucinas pesquisadas e subtipos histológicos

Mucinas	Subtipo Histológico (%)				Variantes menos comuns (n=4)	Total (n=56)
	CCC (n=38)	CLC (n=4)	CaCl (n=9)	CCC-CLC (n=1)		
MUC1*						
Negativo	0 (0,0)	1 (25,0)	2 (22,2)	0 (0,0)	1 (25,0)	4 (7,1)
Positivo	38 (100)	3 (75,0)	7 (77,8)	1 (100)	3 (75,0)	52 (92,9)
MUC2**						
Negativo	29(76,3)	4 (100)	8 (88,9)	0 (0,0)	3 (75,0)	44 (78,6)
Positivo	9 (23,7)	0 (0,0)	1 (11,1)	1 (100)	1 (25,0)	12 (21,4)
MUC4**						
Negativo	14 (36,8)	2 (50,0)	7 (77,8)	0 (0,0)	2 (50,0)	25 (44,6)
Positivo	24 (63,2)	2 (50,0)	2 (22,2)	1 (100)	2 (50,0)	31 (55,4)
MUC5AC*						
Negativo	3 (7,9)	4 (100)	8 (88,9)	0 (0,0)	1 (25,0)	16 (28,6)
Positivo	35 (92,1)	0 (0,0)	1 (11,1)	1 (100)	3 (75,0)	40 (71,4)
MUC6*						
Negativo	9 (23,7)	4 (100)	4 (44,4)	1 (100)	1 (25,0)	19 (33,9)
Positivo	29 (76,3)	0 (0,0)	5 (55,6)	0 (0,0)	3 (75,0)	37 (66,1)

*Nível de significância inferior a 0,05

** Ausência de significância em nível inferior a 0,05

CCC: colangiocarcinoma de padrão convencional; CLC: colangiocarcinoma; CCC-CLC: colangiocarcinoma misto convencional e ductular; CaCl: carcinoma de células intermediárias; MUC1: mucina 1; MUC2: mucina 2, MUC4: mucina 4; MUC5AC: mucina 5AC; MUC 6: mucina 6; +: positivo; n:número, %: porcentagem.

Figura 5 – Exemplo de imunoexpressão positiva para mucinas em CCC: MUC5AC; 200x

6.9 PADRÃO DE IMUNOEXPRESSÃO DA ONCOPROTEÍNA HER2

Aplicando o protocolo para carcinoma mamário invasivo, a maioria dos CCs é considerada negativa para a imunoexpressão da oncoproteína HER2, com escores 0 ou 1+ ($36/56 = 64,3\%$), seguidos pelos casos duvidosos com escore 2+ ($18/56 = 32,1\%$) e casos positivos com escore 3+ ($2/56 = 3,6\%$), sendo os casos positivos todos do tipo CCC ($2/38 = 5,2\%$).

Aplicando o protocolo para carcinoma gástrico invasivo em peça cirúrgica, a maioria dos casos apresenta resultado duvidoso para a imunoexpressão desta proteína ($33/56 = 59\%$), seguidos pelos casos negativos com escores 0 ou 1+ ($17/56 = 30,3\%$). São observados seis casos positivos com escore 3+ ($6/56 = 10,7\%$), sendo a maioria destes do tipo CCC ($5/38 = 13,1\%$) (Tabelas 4 e 5; Figuras 6 e 7).

Os subgrupos histológicos não diferem quanto aos escores para a avaliação do *status* da proteína HER2, tanto utilizando o protocolo para câncer de mama invasivo ($p=0,427$), como para o protocolo de câncer gástrico invasivo ($p=0,137$).

Tabela 4 – Número e porcentagem de indivíduos por subgrupos histológicos de CCs, segundo padrão de expressão do produto do oncogene HER2/c-erbB-2, utilizando o sistema proposto para avaliação de carcinoma mamário invasivo

Escore da oncoproteína HER2	Subtipo Histológico n (%)					Total (n=56)
	CCC (n=38)	CLC (n=4)	CaCl (n=9)	CCC-CLC (n=1)	Variantes menos comuns (n=4)	
0*	5 (13,2)	0 (0,0)	1 (11,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	6 (10,7)
1+*	21 (55,3)	4 (100)	5 (55,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	30 (53,6)
2+*	10 (26,3)	0 (0,0)	3 (33,3)	1 (100)	4 (100)	18 (32,1)
3+*	2 (5,2)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (3,6)

* Ausência de significância em nível inferior a 0,05

CCC: colangiocarcinoma de padrão convencional; CLC: colangiocarcinoma; CCC-CLC: colangiocarcinoma misto convencional e ductular; CaCl: carcinoma de células intermediárias; n: número, % = porcentagem.

Tabela 5 – Número e porcentagem de indivíduos nos subgrupos histológicos de CCs, segundo padrão de expressão do produto do oncogene HER2/c-erbB-2, utilizando sistema proposto para avaliação de carcinoma gástrico invasivo em peça de ressecção cirúrgica

Escore da oncoproteína HER2	Subtipo Histológico n (%)					Total (n=56)
	CCC (n=38)	CLC (n=4)	CaCl (n=9)	CCC-CLC (n=1)	Variantes menos comuns (n=4)	
0*	3 (7,8)	1 (25,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (25,0)	5 (8,9)
1+*	9 (23,7)	0 (0,0)	2 (22,2)	0 (0,0)	1 (25,0)	12 (21,4)
2+*	21 (55,3)	3 (75,0)	6 (66,7)	1 (100)	2 (50,0)	33 (59,0)
3+*	5 (13,2)	0 (0,0)	1 (11,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	6 (10,7)

* Ausência de significância em nível inferior a 0,05

CCC: colangiocarcinoma de padrão convencional; CLC: colangiocarcinoma; CCC-CLC: colangiocarcinoma misto convencional e ductular; CaCl: carcinoma de células intermediárias; n: número, %: porcentagem.

Figura 6 – Exemplo de imunoexpressão da oncoproteína HER2 (escore 2+) em CCC, segundo protocolo proposto para câncer de mama (SP3; 200x)

Figura 7– Exemplo de imunoexpressão da oncoproteína HER2 (escore 2+) em CCC, segundo protocolo proposto para adenocarcinoma gástrico (SP3; 200x)

6.10 STATUS DA AMPLIFICAÇÃO DO ONCOGENE HER2/c-erbB-2 PELA TÉCNICA DE HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* POR FLUORESCÊNCIA (FISH)

Nesta casuística, foram observados 41 casos negativos ($41/56 = 73,2\%$), sete casos positivos ($7/56 = 12,5\%$) e oito casos inconclusivos ($8/56 = 14,3\%$) para a amplificação do oncogene HER2/c-erbB-2 pela técnica de FISH. Dentro dos casos positivos para a amplificação do oncogene encontramos cinco casos CCCs (71,4%), um caso CaCl (14,3%) e uma variante menos frequente (14,3%).

Considerando os casos negativos para a amplificação do oncogene temos 29 casos CCCs ($29/38 = 76,3\%$), três casos CLCs ($3/4 = 75\%$), sete casos CaCl ($7/9 = 77,8\%$) e duas variantes menos comuns ($2/4 = 50\%$). Os resultados inconclusivos são representados por casos nos quais houve desgaste do material em TMA ou nos quais a reação não funcionou em nenhum dos *spots* disponíveis para avaliação (Tabela 6; Figura 8).

Tabela 6 – Status da amplificação do oncogene HER2/c-erbB-2 nos subtipos histológicos de CCs

Resultado da amplificação do gene HER2/c-erbB-2	Subtipo Histológico n (%)					Total (n=56)
	CCC (n=38)	CLC (n=4)	CaCl (n=9)	CCC-CLC (n=1)	Variantes menos comuns (n=4)	
Positivo*	5 (13,2)	0 (0,0)	1 (11,1)	0 (0,0)	1 (25,0)	7 (12,5)
Negativo*	29 (76,3)	3 (75,0)	7 (77,8)	0 (0,0)	2 (50,0)	41 (73,2)
Inconclusivo*	4 (10,5)	1 (25,0)	1 (11,1)	1 (100)	1 (25,0)	8 (14,3)

*Ausência de significância em nível inferior a 0,05

CCC: colangiocarcinoma de padrão convencional; CLC: colangiocarcinoma; CCC-CLC: colangiocarcinoma misto convencional e ductular; CaCl: carcinoma de células intermediárias; n: número, %: porcentagem.

Figura 8 – Exemplo de amplificação do oncogene HER2/c-erbB-2 pela técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH). A) Cromossomo 17; B) Gene HER2/c-erbB2

6.11 AVALIAÇÃO DA ACURÁCIA DIAGNÓSTICA DOS PROTOCOLOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS UTILIZADOS EM CARCINOMAS MAMÁRIO INVASIVO E GÁSTRICO INVASIVO (EM PEÇA CIRÚRGICA), PARA PREDIZER STATUS DA AMPLIFICAÇÃO DO ONCOGENE HER2/c-erbB-2 NOS CCs

A avaliação da acurácia diagnóstica dos dois protocolos imuno-histoquímicos utilizados neste estudo, considerados testes iniciais de triagem, teve como teste padrão ouro, o estudo da amplificação do oncogene HER2/c-erbB-2 pela técnica do FISH. Neste momento, não houve separação dos casos pelos respectivos subtipos histológicos devido ao pequeno número de casos nos subgrupos CLC, CaCI e variantes menos comuns.

Foram determinados parâmetros de sensibilidade (S), de especificidade (E), de valor preditivo positivo (VPP), de valor preditivo negativo (VPN) e área sob a curva ROC em três cenários distintos envolvendo as combinações entre os casos com resultados positivos e negativos e os casos com resultados duvidosos pelos estudos imuno-histoquímicos.

Para a elaboração do cenário um (cenário 1), situação inexistente na prática clínica, comparamos apenas os resultados positivos (3+) e negativos (0 e 1+) dos testes imuno-histoquímicos com o padrão ouro, e a análise de acurácia revelou que o teste proposto para carcinoma gástrico é muito superior ao teste proposto para carcinoma mamário invasivo para indicar a presença da amplificação do oncogene HER2/c-erbB-2, quando aplicado em amostras de CCs (Tabelas 7, 8 e 9).

Para a construção do cenário dois (cenário 2), consideramos as amostras classificadas como 2+ como sendo negativas e então agrupamos estas aos casos com resultados 0 e 1+. Este novo grupo foi comparado com os casos positivos 3+. A análise da acurácia revelou que o teste proposto para carcinoma gástrico invasivo supera os resultados do teste proposto para carcinoma mamário invasivo para indicar a presença da amplificação do oncogene HER2/c-erbB-2, quando aplicado em amostras de CCs (Tabelas 10, 11 e 12).

Por fim, na elaboração do cenário três (cenário 3), consideramos as amostras classificadas como 2+ como sendo positivas e então agrupamos estas aos casos com resultados 3+. Este último grupo foi comparado aos casos com resultados negativos (escores 0 ou 1+). A análise da acurácia revelou que o teste proposto para carcinoma gástrico invasivo tem desempenho inferior nos parâmetros especificidade e valor preditivo positivo, quando comparado ao carcinoma mamário invasivo para indicar a presença da amplificação do oncogene HER2/c-erbB-2, quando aplicado em amostras de CCs (Tabelas 13, 14 e 15).

6.11.1 Cenário 1

Neste cenário, comparamos os casos negativos (0 e 1+) e os casos positivos (3+) com o padrão ouro (FISH) (Tabelas 13, 14 e 15).

Tabela 7 – Cenário 1: número de indivíduos com CC, segundo resultado da avaliação imuno-histoquímica (IHQ) pelo protocolo proposto para carcinoma mamário invasivo e resultado da avaliação da amplificação do oncogene HER2/c-erbB-2 por estudo de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH)

Resultado IHQ	FISH		Total
	Negativo	Positivo	
Negativo*	32	1	33
Positivo**	0	2	2
Total	32	3	35

*escores 0 e 1+

**escore 3+

Tabela 8 – Cenário 1: número de indivíduos com CC, segundo resultado da avaliação imuno-histoquímica (IHQ) pelo o protocolo proposto para carcinoma gástrico invasivo e resultado da avaliação da amplificação do oncogene HER2/c-erbB-2 por hibridização *in situ* por fluorescência (FISH)

Resultado IHQ	FISH		Total
	Negativo	Positivo	
Negativo*	12	0	12
Positivo**	0	6	6
Total	12	6	18

*escores 0 e 1+

**escore 3+

Tabela 9 – Cenário 1: Estimativas de sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e área sob a curva ROC e respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%), para avaliação do escore da oncoproteína HER2 em colangiocarcinomas, segundo os protocolos imuno-histoquímicos propostos para carcinomas mamário e gástrico invasivos

Protocolo – HER2	Parâmetros (%) (IC 95%)				Área sob a curva ROC
	S	E	VPP	VPN	
Para carcinoma mamário invasivo	66,7 (9,4-99,2)	100 (89,1-100)	100 (15,8-100)	97,0 (84,2-99,9)	0,83 (0,51-1,00)
Para carcinoma gástrico invasivo	100 (54,1-100)	100 (73,5-100)	100 (54,1-100)	100 (73,5-100)	1,00 (NC)

6.11.2 Cenário 2

Neste cenário, consideramos os casos duvidosos (+2) como negativos, agrupando-os com os casos classificados como 0 e 1+. Foram considerados como positivos aqueles com 3+ (Tabelas 10,11 e 12).

Tabela 10 – Cenário 2: número de indivíduos com CC, segundo resultado da avaliação imuno-histoquímica (IHQ) pelo protocolo proposto para carcinoma mamário invasivo e resultado da avaliação da amplificação do oncogene HER2/c-erbB-2 por estudo de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH)

Resultado IHQ	FISH		Total
	Negativo	Positivo	
Negativo*	41	5	46
Positivo**	0	2	2
Total	41	7	48

*escores 0, 1+ e 2+

**escore 3+

Tabela 11 – Cenário 2: número de indivíduos com CC, segundo resultado da avaliação imuno-histoquímica (IHQ) pelo o protocolo proposto para carcinoma gástrico invasivo e resultado da avaliação da amplificação do oncogene HER2/c-erbB-2 por hibridização *in situ* por fluorescência (FISH)

Resultado IHQ	FISH		Total
	Negativo	Positivo	
Negativo*	41	1	42
Positivo**	0	6	6
Total	41	7	48

*escores 0, 1+ e 2+

**escore 3+

Tabela 12 – Cenário 2: Estimativas de sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e área sob a curva ROC e respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%), para avaliação do escore da oncoproteína HER2 em colangiocarcinomas, segundo os protocolos imuno-histoquímicos propostos para carcinomas mamário e gástrico invasivos

Protocolo – HER2	Parâmetros (%) (IC 95%)				
	S	E	VPP	VPN	Área sob a curva ROC
Para carcinoma mamário invasivo	28,6 (3,7-71,0)	100 (91,4-100)	100 (15,8-100)	89,1 (76,4-96,4)	0,64 (0,46-0,82)
Para carcinoma gástrico invasivo	85,7 (42,1-99,6)	100 (91,4-100)	100 (54,1-100)	97,6 (87,4-99,9)	0,93 (0,79-1,00)

6.11.3 Cenário 3

Neste cenário, consideramos os casos duvidosos (+2) como positivos, agrupando-os com os casos classificados como 3+. Foram considerados como negativos aqueles classificados como 0 ou 1+ (Tabelas 13, 14 e 15).

Tabela 13 – Cenário 3: número de indivíduos com CC, segundo resultado da avaliação imuno-histoquímica (IHQ) pelo protocolo proposto para carcinoma mamário invasivo e resultado da avaliação da amplificação do oncogene HER2/c-erbB-2 por estudo de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH)

Resultado IHQ	FISH		Total
	Negativo	Positivo	
Negativo*	32	1	33
Positivo**	9	6	15
Total	41	7	48

*escores 0 e 1+

**escores 2+ e 3+

Tabela 14 – Cenário 3: número de indivíduos com CC, segundo resultado da avaliação imuno-histoquímica (IHQ) pelo o protocolo proposto para carcinoma gástrico invasivo e resultado da avaliação da amplificação do oncogene HER2/c-erbB-2 por hibridização *in situ* por fluorescência (FISH)

Resultado IHQ	FISH		Total
	Negativo	Positivo	
Negativo*	12	0	12
Positivo**	29	7	36
Total	41	7	48

*escores 0 e 1+

**escores 2+ e 3+

Tabela 15 – Cenário 3: Estimativas de sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e área sob a curva ROC e respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%), para avaliação do escore da oncoproteína HER2 em colangiocarcinomas, segundo os protocolos imuno-histoquímicos propostos para carcinomas mamário e gástrico invasivos

Protocolo – HER2	Parâmetros (%) (IC 95%)				
	S	E	VPP	VPN	Área sob a curva ROC
Para carcinoma mamário invasivo	85,7 (42,1-99,6)	78,0 (62,4-89,4)	40,0 (16,3-67,7)	97,0 (84,2-100)	0,82 (0,66-0,97)
Para carcinoma gástrico invasivo	100 (59,0-100)	29,3 (16,1-45,5)	19,4 (8,2-36,0)	100 (73,5-100)	0,65 (0,58-0,72)

6.12 CONCORDÂNCIA ENTRE OS PROTOCOLOS PARA AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA HER2 (PARA CARCINOMA MAMÁRIO INVASIVO E CARCINOMA GÁSTRICO INVASIVO (EM PEÇA CIRÚRGICA))

Foi observada uma concordância pobre entre o resultado do protocolo proposto para carcinoma mamário invasivo e o resultado do protocolo proposto para carcinoma gástrico invasivo (Kappa = 0,19, IC 95% 0,02-0,36). Somente 24 dos 56 casos (42,9%) apresentaram resultados iguais nos dois protocolos (Tabela 16).

Tabela 16 – Número e porcentagem de indivíduos com CC, segundo resultado do protocolo mamário e gástrico avaliando a imunoeexpressão da oncoproteína HER2

Protocolo Mamário	Protocolo Gástrico (%)				Total
	0	1+	2+	3+	
0	3 (50,0)	3 (50,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	6 (10,7)
1+	1 (3,1)	8 (25,0)	22 (68,8)	1 (3,1)	32 (57,1)
2+	0 (0,0)	0 (0,0)	11 (68,8)	5 (31,2)	16 (28,6)
3+	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (100)	2 (3,6)
Total	4 (7,1)	11 (19,6)	33 (59,0)	8 (14,3)	56 (100)

7 DISCUSSÃO

Na literatura atual, apesar do crescente número de classificações dos CCs (108), uma categorização baseada no grau de maturação da célula que origina a neoplasia pode permitir melhor correlação com prognóstico e desenvolvimento de terapias alvo (108).

Neste trabalho, o ponto inicial para a categorização histológica dos grupos foi a observação das características morfológicas das células neoplásicas, em especial o grau de maturação fenotípica. Os CCs com células semelhantes a colangiócitos (polo biliar maduro), com produção frequente de mucina, foram denominados CCC. Os tumores cujas células são semelhantes a colangiólos (polo biliar imaturo) foram denominados CLC e as neoplasias com características intermediárias entre hepatócitos e colangiócitos foram denominadas como carcinoma de células intermediárias (CaCI). A mesma terminologia foi aplicada ao longo de toda a extensão da árvore biliar. As análises comparativas das classificações previamente descritas em CCs e da classificação empregada nesta análise estão resumidas nos quadros 6 e 7.

7.1 ASPECTOS DEMOGRÁFICOS

Historicamente, a grande quantidade de classificações utilizada em CCs dificulta a obtenção de dados epidemiológicos robustos mundiais (23, 107, 154, 155). É conhecida a grande variação da incidência desta neoplasia nos continentes, sendo que, na Tailândia observa-se valor superior a 80 casos por 100.000 habitantes, ao passo em que no Canadá observam-se 0,3 casos por 100.000 habitantes (155). Mosadeghi et al (156) compilaram registros de CC na população americana entre os anos de 2000 e 2011 para obtenção de informações sobre distribuições por sexo, idade e raça, dentre outros. Os grupos de CCs foram estratificados de acordo com a topografia em CCI e CCE e não pelo subtipo histológico. No estudo destes autores, com desenho retrospectivo, foram identificados 11.296 pacientes portadores de CCI e 8.672

portadores de CCE. Os autores referem aumento na incidência do CC a partir dos 60 anos (4,3%, 4,3%, 6,6%, 6,7% para as raças branca não hispânica, negra, asiática e hispânica, respectivamente), mas após os 80 anos, a chance de desenvolver CC se eleva de modo substancial (7,2%, 6,8%, 13,8% e 11,3% para as raças branca não hispânica, negra, asiática e hispânica, respectivamente). A distribuição por sexo no grupo CCE evidenciou 52,5% homens e 47,5% mulheres e, no grupo CCI evidenciou 53,4% homens e 46,6% mulheres. Entretanto, os autores ressaltam que houve predomínio das mulheres quando os grupos etários foram estratificados entre 20-39 anos e acima de 80 anos (156). Pesquisa semelhante realizada por Beal et al (157), também baseada em registros epidemiológicos americanos, observou predomínio em homens (51,5%) e idade média de $69,6 \pm 11,9$ anos. Walter et al (158) abordaram dados do registro de câncer da Alemanha entre os anos de 2003 e 2014, incluindo 26.186 pacientes e também notou-se incidência maior no sexo masculino (incidência de 2,61 e 3,93 por 100.000 pacientes para mulheres e homens, respectivamente). É considerável mencionar que estes três autores reconhecem que as diferentes classificações empregadas nos CCs têm impacto nos resultados epidemiológicos. No continente asiático, Chaiteerakij et al (159) avaliaram o registro hospitalar nacional da Tailândia e incluíram 39.421 pacientes com diagnóstico de CC entre 2008 e 2013 e observaram maior incidência nos homens (61,2% dos casos) e idade média de $64,1 \pm 11,7$ anos. Akita et al (160) conduziram estudo comparando CCI de grandes e pequenos ductos com CCH. A partir de uma casuística de 58 casos, foram observados 44 casos de CCH, 22 casos de CCI tipo grandes ductos e 36 casos de CCI pequenos ductos. Houve importante predomínio do sexo masculino no grupo hilar (30 casos), porém no grupo CCI grandes ductos, houve predomínio na população feminina. Dados atuais sobre incidência mundial do CC podem ser obtidos no website *World Cholangiocarcinoma Day*^{*}. No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) na atualização de sua página na *internet* realizada em 2018^{*}, traz como estatísticas para o nosso país em 2018, 9.711 casos de câncer de fígado, sendo 5.647 homens e 4.063 mulheres

^{*} Disponível em: <http://worldcholangiocarcinomaday.org>

^{*} Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-figado>

(2015 – Atlas de Mortalidade por Câncer). No entanto, não foram disponibilizados dados isolados sobre o câncer da via biliar. Até onde sabemos, não há publicações na literatura com dados específicos sobre incidência de CC e distribuição entre gêneros na população brasileira. De forma semelhante ao descrito na literatura, a maioria dos pacientes da casuística deste trabalho pertenceram ao sexo masculino (58%), com idade média mais baixa (56,3 anos) se comparamos aos estudos anteriormente descritos.

Este estudo, ao avaliar as distribuições por idade e sexo, utilizando uma classificação histológica bem definida associada à localização topográfica da neoplasia, contribui, pelo menos parcialmente, para as literaturas brasileira e mundial por fornecer dados epidemiológicos a partir de uma casuística cirúrgica. Deve-se ressaltar que os casos avançados, não elegíveis para a cirurgia, não foram considerados neste trabalho. Foi possível avaliar possível associação entre o subtipo histológico e o gênero do paciente, embora este dado não tenha significância estatística ($p=1,135$). Nos homens, houve predomínio do subtipo histológico CCC, mas quando se considera os padrões CLC e CaCI há predomínio no sexo feminino. Até onde sabemos, análises que determinam especificamente a distribuição por gênero nos subtipos histológicos dos CCs não estão disponíveis na literatura, mas há referências sobre a distribuição por gênero e a localização da neoplasia ao longo da árvore biliar que revela que CCI predomina no sexo masculino e CCE tem uma distribuição mais equilibrada entre os sexos, embora exista tendência de aumento no sexo feminino, não sendo claro se esta tendência reflete alteração de fatores de risco nas mulheres ou novos fatores de risco para este grupo (98, 161, 162).

7.2 CORRELAÇÃO ENTRE TAMANHO DA NEOPLASIA, LOCALIZAÇÃO AO LONGO DA ÁRVORE BILIAR, PADRÃO MACROSCÓPICO, GRAU DE DIFERENCIAÇÃO TUMORAL E SUBTIPO HISTOLÓGICO DE CCs

A correlação entre tamanho da neoplasia e prognóstico dos pacientes que são submetidos à cirurgia por CC não está totalmente elucidada, uma vez que a maior parte das pesquisas correlaciona o tamanho do tumor com a localização topográfica da neoplasia e nem sempre com o desfecho final do paciente. De Jong et al (163) avaliaram 449 pacientes submetidos à cirurgia com diagnóstico de CCI e defendem que o tamanho da neoplasia, isoladamente, não traz informações prognósticas. Por outro lado, Spolverato et al (164) examinaram 443 pacientes portadores de CCI, definiram como grandes as neoplasias acima de 5,0 cm e, defendem a associação entre o tamanho e prognóstico, sendo que quanto maior o tumor, pior o prognóstico. Estes autores, por afirmarem que as neoplasias de maior tamanho, no geral, têm pior grau de diferenciação e maior porcentagem de invasão angiolinfática, discutem que o critério tamanho pode exibir viés de tendenciosidade e não recomendam o uso da medida do tumor de modo isolado pelos cirurgiões como fator determinante para a decisão cirúrgica. Na oitava edição do AJCC, o tamanho da neoplasia em centímetros é utilizado para estadiamento dos CCIs, mas o mesmo não ocorre para os CCHs. Hu et al (165) avaliaram 216 pacientes submetidos à cirurgia por CCH e observaram que o tamanho da neoplasia teria implicação prognóstica, sendo que neoplasias com dimensões acima de 2,0 cm e 3,0 cm teriam pior prognóstico e, inclusive, sugeriram a incorporação da medida no descritor do tumor do TMN. No que se refere aos CCE, após estudos conduzidos por Jun et al (166) que avaliaram 147 pacientes com CCE, a profundidade de infiltração da neoplasia na parede do ducto biliar foi introduzida para finalidade de estadiamento e não à sua medida. Neste estudo, o grupo CaCI geralmente apresenta tumores maiores superiores a 40 mm (88,9%) e, por sua vez, CCC na maioria dos casos apresentam tumores menores ou iguais a 40 mm (94,7%).

A avaliação desta casuística permite também considerar correlação entre a localização na árvore biliar, padrão macroscópico e padrão histológico do CC. A localização intra-hepática se associa mais frequentemente ao padrão

macroscópico FM e sugere como possibilidades histológicas principais CLC e CaCl. A localização hilar se associa ao padrão IP e levanta como possibilidade principal CCC. Por sua vez, ao nos depararmos com CCE, estaremos diante dos subtipos CCCs ou subtipos não convencionais.

Estas considerações vão ao encontro dos ensinamentos clínico-cirúrgicos tradicionais que relatam que os tumores intra-hepáticos são mais frequentemente maiores, pois o crescimento tumoral, associado ao padrão substitutivo no parênquima hepático adjacente, permite que a neoplasia cresça formando uma massa, sem que sintomas ocorram rapidamente (167). Já os tumores peri-hilares e distais, com tamanhos menores, promovem sintomas obstrutivos por estreitarem a luz da árvore biliar, com padrões de crescimento infiltrativo periductal e intraductal, o que permite que o diagnóstico se estabeleça sem que grandes massas sejam formadas.

A determinação do grau histológico também apresenta aspectos contraditórios devido à falta de uniformização de terminologias. Ao avaliar o grau de diferenciação tumoral proposto pela OMS 2010 (6), grau este que deve apontar o quanto a neoplasia se aproxima (neoplasia bem diferenciada) ou se afasta do tecido que lhe deu origem (neoplasia pouco diferenciada) e que, portanto, deveria refletir o polo de maturação da célula envolvida na carcinogênese, acaba por se basear na porcentagem de formação glandular, sendo possível, mesmo em fenótipos com células mais precursoras (para a qual seria esperado grau de diferenciação pouco diferenciado), que seja obtido um grau de diferenciação, pelo menos, moderado. É possível, com os sistemas de graduação atualmente disponíveis, que haja redução no valor desta devido à possibilidade de equívocos em denominação de subtipo histológico (por exemplo, classificar como CCC pouco diferenciado, uma neoplasia que corresponderia a um CaCl). Neste estudo, a graduação seguiu a regra da porcentagem de formação glandular e é um dado útil por permitir considerar que CCC é geralmente bem diferenciado (78,9%) e CLC e CaCl são geralmente moderadamente diferenciados (75% e 88,9%), pois apesar do aspecto fenotípico celular, a neoplasia ainda preserva um padrão parcial de organização glandular.

Esta pesquisa estudou as correlações entre tamanho do tumor, topografia, padrão macroscópico, grau de diferenciação tumoral e subtipo histológico de CCs, havendo significância estatística para todas essas variáveis ($p < 0.001$).

7.3 FATORES DE RISCO

Vários fatores de risco são implicados no processo de carcinogênese da árvore biliar, promovendo quadros inflamatórios crônicos. Dentre os fatores, merecem destaque a CEP (55), seguida pelas hepatolitíase (73), infecções parasitárias (66, 168), infecções por vírus hepatotrópicos (79, 83, 84, 169), doenças congênitas e malformações biliares (75).

A CEP é o principal fator de risco para o desenvolvimento do CC e as taxas de incidência de CC neste grupo variam entre 4,8 e 36,4%, sendo esta variação explicada pela diferença de metodologia dos estudos (séries populacionais gerais *versus* séries de transplante hepático) (53, 170). Pacientes diagnosticados com CEP poderão desenvolver CC, especialmente nos dois primeiros anos após o diagnóstico da doença de base (54). A fisiopatogenia do processo de carcinogênese tem como base o processo inflamatório crônico e a colestase gerados por esta doença primária hepática. No estudo realizado por Liang et al (55) no Reino Unido, dos 250 pacientes portadores de CEP, 63 evoluíram para óbito e, dentre as causas da mortalidade, a mais frequente foi neoplasia maligna (30,2% dos casos), liderada pelo carcinoma de árvore biliar (9,5%). Estudo conduzido por Fevery et al (171) na Bélgica incluiu 200 pacientes portadores de CEP, sendo que 40% destes desenvolveram neoplasias malignas e 45,9% dos pacientes evoluíram para óbito. A principal mortalidade relacionada a câncer neste grupo foi também CC (31% das neoplasias).

A litíase na árvore biliar é um fator de risco conhecido para a gênese do CC provavelmente via episódios repetidos de inflamação decorrentes do trauma relacionado à formação e passagem dos cálculos biliares (73). Cai et al (73) conduziram um estudo na China para estabelecer a correlação entre CC e

condições pré-existentes. Foram incluídos 313 pacientes com diagnóstico de CC e observou-se que a prevalência de coledocolitíase, hepatolitíase e colelitíase foi estatisticamente significativa no grupo CC quando comparados ao grupo controle saudável (73).

Os parasitas da árvore biliar aumentam a susceptibilidade dos colangiócitos a carcinógenos endógenos e exógenos através de irritação pelo processo inflamatório crônico e por aumento da renovação celular (172, 173). Xia et al (168) realizaram uma metanálise, incluindo 36 estudos provenientes da China, Hong-Kong, Taiwan, Coréia e Tailândia e os pesquisadores demonstraram correlação positiva entre a infecção pelos parasitas e CC.

O mecanismo pelo qual a infecção pelos vírus hepatotrópicos contribui para o processo de carcinogênese não está totalmente compreendido e há resultados conflitantes na literatura. Estudo conduzido por Fillipowicz et al (174) sugere que o VHC infecta diretamente o epitélio da árvore biliar e leva ao processo de inflamação crônica, o que explicaria o microambiente para a carcinogênese. Para o VHB, o mecanismo envolvido também seria a inflamação, porém no parênquima hepático (175). Wang et al (83) avaliaram o impacto da infecção pelo VHB e VHC em câncer primário do fígado em 2.172 pacientes. Dentro da população total, 238 pacientes eram portadores de CCI. Os autores demonstraram correlação entre CCI e infecção pelo VHB, mas não com o VHC. Matsumoto et al (79) estudaram 145 pacientes japoneses com diagnóstico de CC, incluindo casos intra-hepáticos e extra-hepáticos. Observaram que a prevalência do HbsAg foi elevada em pacientes portadores de CCI (10%) e que a prevalência de VHC foi bastante elevada em pacientes portadores de CCI, em torno de 20%.

Bhalla et al (75) correlacionaram complexos de Von Meyenburg e CC em 86 produtos de hepatectomia e observaram progressão das lesões benignas para displasia e neoplasia.

Estudos na literatura referem a forte associação entre CEP e CC, porém até onde temos conhecimento, estudos sobre a correlação entre o padrão morfológico indicativo de colangite crônica, independente da sua etiologia, e o CC não foram encontrados nas bases de dados literários. Observação que talvez permita interpretar a colangite crônica como uma doença hepática de

base verdadeira é que tal achado tenha sido observado em áreas do parênquima hepático distante da massa tumoral, teoricamente não sujeitas diretamente aos fenômenos compressivos secundários. Entretanto, não é possível afastar que a evidência histológica de colangite crônica seja um evento secundário ao efeito estenosante/obstrutivo que o crescimento da neoplasia impõe à árvore biliar e não evento precursor à gênese do CC. A hepatolitíase apresenta incidência global variável, sendo que no continente asiático as taxas para esta doença variam entre 2 e 25%, ao passo em que nos países do leste, esta incidência está entre 0,6 e 1,3%, por sua vez a incidência do CC em portadores de hepatolitíase está entre 5 e 13% (176). Bhalla et al (75) estabeleceram associação entre malformação de placa ductal e CC em 35% dos 86 espécimes cirúrgicos analisados.

Neste trabalho, a presença de aspectos sugestivos de doença hepática de base não se correlacionaram estatisticamente com o subtipo histológico de CCs ($p=0,187$, $p=0,531$ e $p=0,413$, respectivamente para hepatolitíase, malformação de placa ductal e colangite crônica), mas chama a atenção à evidência histológica de colangite crônica inespecífica (manguito fibroso ao redor de ductos biliares originais, sem obliteração destes), o qual esteve presente em 48,2% dos casos, seguidos por hepatolitíase (7,1%) e malformação de placa ductal (25%).

7.4 MUCINAS

A possibilidade da expressão de mucinas ter impacto prognóstico torna relevante a pesquisa destas glicoproteínas nos CCs (117). A superexpressão de MUC1 se relaciona com a capacidade de metástase por inibir a adesão celular, possibilitando o escape do sistema imunológico, sendo que a sua expressão confere pior prognóstico a diferentes tipos de carcinoma (120). No epitélio intestinal, a perda de MUC2 gera um microambiente propenso à ativação da inflamação e contribui para a proliferação celular (120). A superexpressão de MUC5AC pela célula neoplásica faz com que ela adquira carga elétrica negativa, levando ao mecanismo físico de repulsão, favorecendo

a migração celular (117). MUC4 é uma mucina importante na interação célula-célula e célula-matriz, através de mecanismos c-erbB2 dependentes e independentes, atuando nas capacidades de invasão e de metástase. O grupo de Park et al (117) realizou um dos trabalhos de maior amplitude neste tema. Avaliaram a expressão de mucinas (MUC1, MUC2, MUC5AC e MUC6) em 85 pacientes portadores de CCs, em 11 pacientes portadores de adenocarcinoma da vesícula biliar e 14 pacientes com adenocarcinoma pancreático. No desenho metodológico, o grupo de pacientes com CC foi dividido de acordo com a localização topográfica (34 CCl e 51 CCEs) e padrão macroscópico, mas não pelo subtipo histológico. A imunoexpressão para MUC1 foi maior no grupo CCE quando comparado ao CCl (72,5% e 55,8%, respectivamente) e no grupo CCl foi maior no padrão macroscópico FM. Os autores observaram que a expressão de MUC1 (68,5%) estava diretamente relacionada com a progressão tumoral e pior sobrevida. Em relação ao MUC2, a minoria dos casos (23,5%) exibiu positividade para este marcador (29,4% e 19,6% para CCl e CCE, respectivamente). Positividade para MUC5AC foi observada em 61,1% dos casos (47,1% e 70,6% para CCl e CCE, respectivamente). A minoria dos casos (14,1%) exibiu positividade para MUC6, sendo a distribuição equilibrada entre CCl (14,7%) e CCE (13,7%). Para MUC2, MUC5AC e MUC6 os autores não encontraram correlação entre expressão e padrão macroscópico.

Este estudo realizou a análise com base no subtipo histológico e pudemos observar resultados semelhantes ao descrito por Park et al (117): imunoexpressão de MUC1 em 92,9% dos casos, sendo a maioria pertencente ao grupo CCC (100%) seguidos por CaCl (77,8%), positividade para MUC2 em 21,4% dos casos (a maioria deles com padrão CCC), imunoexpressão positiva para MUC5AC em 71,4% dos casos (sendo 92,1% CCC). Diferentemente de Park et al (177), a positividade para MUC6 foi vista na maioria dos casos deste trabalho (66,1%). Yeh et al (178) avaliaram a expressão de MUC4 em 51 pacientes portadores de CC com padrão macroscópico FM, sendo a positividade observada em 28,3% dos casos e observaram que a imunoexpressão positiva para esta glicoproteína foi fator de pior prognóstico independente para os pacientes submetidos à hepatectomia. Observamos

positividade para MUC4 em 55,4% dos casos deste trabalho, a maior parte deles do tipo CCC (63,2%).

Este estudo descreve o padrão de expressão das mucinas de acordo com os subtipos histológicos com valores estatisticamente significativos para MUC1 ($p=0,01$), MUC5AC ($p<0,001$) e MUC6 ($p=0,019$), ressaltando que a pesquisa das mucinas pode contribuir para a classificação dos subtipos dos CCs, especialmente para diagnóstico de CCC (com 100% de positividade para MUC1) e de CLC (com imunoexpressão negativa para MUC2, MUC5AC ou MUC6).

7.5 ONCOGENE HER2/c-erbB-2

Na literatura atual, não há consenso estabelecido para a interpretação dos resultados da avaliação do *status* do oncogene HER2/c-erbB-2 por estudo imuno-histoquímico nos CCs. A falta de consenso se refere tanto ao melhor protocolo a ser adotado para o exame imuno-histoquímico quanto à associação dos resultados destes testes com os resultados dos estudos moleculares por técnicas de hibridização *in situ*, considerado um dos testes padrão ouro para determinação do *status* final da amplificação deste oncogene.

Um dos estudos pioneiros nesta área foi realizado por Yoshikawa et al (179), os quais avaliaram 236 pacientes portadores de CC, usando casuística cirúrgica de modo semelhante a este estudo. Os autores subclassificaram os pacientes de acordo com diretrizes topográfica (CCIs e CCEs) e macroscópica (tumores formadores de massa, infiltrativos periductais e com crescimento intraductal). O protocolo utilizado para interpretação dos resultados foi o descrito no HerceptestTM (DAKO). Neste estudo, 12 casos foram positivos sendo que a positividade foi referida tanto para escore 2+ como para escore 3+ (179) e tal achado deve ser interpretado com ressalva, uma vez que resultados 2+ devem ser referidos como duvidosos. Shafizadeh et al (180) avaliaram em seu estudo 51 casos de adenocarcinomas biliares, sendo 26 CCIs, 19 CCEs e seis adenocarcinomas de vesícula biliar, não sendo divididos em subgrupos morfológicos ou histológicos. Foi utilizado o mesmo protocolo imuno-

histoquímico aplicado por Yoshikawa et al (179) e os autores também consideraram como positivos casos com resultados 2+ ou 3+, sendo o resultado positivo observado em apenas dois casos, confirmado em estudo de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH). Galdy et al (181) conduziram metanálise para identificar estudos que reportaram a expressão da oncoproteína HER2 por teste imuno-histoquímico e/ou amplificação do oncogene por técnica de FISH. Em 27 estudos considerados pelos autores como de alta qualidade, as neoplasias biliares extra-hepáticas (incluindo casos de adenocarcinomas de vesícula biliar) apresentaram uma maior porcentagem de superexpressão da oncoproteína quando comparados aos carcinomas intra-hepáticos (19,9% e 4,8%, respectivamente). Também observaram que a taxa de amplificação era maior em pacientes com superexpressão proteica no estudo imuno-histoquímico (57,6% dos pacientes com superexpressão exibiram amplificação para o oncogene HER2/c-erbB-2). Yang et al (182) estudaram a positividade para HER2 por testes imuno-histoquímicos e/ou testes de hibridização *in situ* em diversos órgãos e observaram resultado positivo em 6,3% dos CCE e 0,6% dos CCl. Até onde temos conhecimento, não identificamos nas bases de dados, pesquisas direcionadas para correlação entre diferentes protocolos utilizados em estudos imuno-histoquímico e amplificação do oncogene HER2/c-erbB-2 por estudos de hibridização *in situ*, além destes resultados em subgrupos histológicos.

Esta pesquisa avalia os padrões de imunoexpressão da oncoproteína HER2, utilizando o clone SP3 em subgrupos histológicos bem definidos de CCs, aplica os dois principais protocolos disponíveis na literatura atual para interpretação imuno-histoquímica do produto do oncogene HER2/c-erbB-2 (carcinoma mamário e carcinoma gástrico) e permite observar que a escolha do protocolo utilizado pode interferir na complementação com estudo molecular o que traz impacto em questões gerenciais. A escolha do clone SP3 se deve ao fato deste apresentar relatos de boa performance em estudos prévios para os dois protocolos (183). Poucos estudos publicados tentam esclarecer as relações entre a expressão da oncoproteína HER2, os achados clínico-patológicos em CC que se originam em diferentes partes da árvore biliar e os resultados do *status* do oncogene HER2/c-erbB-2 em carcinomas da árvore

biliar. A porcentagem de superexpressão proteica de HER2 varia entre estudos com porcentagens entre 0 e 4% para CCI e entre 5 e 8,5% para CCE (3, 137-142).

Neste trabalho, partimos da avaliação da expressão proteica por testes imuno-histoquímicos, analisados em dois momentos, utilizando protocolos para carcinomas mamário invasivo e gástrico invasivo em peça cirúrgica. Ao utilizar os critérios de interpretação das reações imuno-histoquímicas aplicados para carcinomas mamários invasivos, a maioria dos CCs deste estudo são alocados no grupo negativo para a amplificação do oncogene (64,3%). Estudos com resultados negativos são necessitam de complementação diagnóstica em outros tumores. Porém, ao se utilizar o protocolo para câncer gástrico em peça cirúrgica, mais da metade dos casos apresenta escore duvidoso 2+ (59%). Em ambos os protocolos propostos para carcinoma mamário invasivo e para carcinoma gástrico invasivo, resultados 2+ não são considerados positivos e justificam a complementação da pesquisa com técnica complementar de hibridização *in situ*. Não houve diferença com significância estatística entre os escores obtidos pela análise imuno-histoquímica da oncoproteína HER2 nos subtipos histológicos de CCs, tanto para o protocolo proposto para carcinoma mamário invasivo como para o protocolo proposto para carcinoma gástrico invasivo ($p=0,427$ e $p=0,137$, respectivamente).

O *status* da amplificação do oncogene HER2/c-erbB-2 foi considerado o teste padrão ouro para determinação de presença ou ausência de amplificação do oncogene, sendo que os testes imuno-histoquímicos para a avaliação da imunoexpressão da oncoproteína HER2 (propostos para carcinomas mamário e gástrico invasivos) foram considerados os testes diagnósticos iniciais. Estes testes iniciais foram confrontados com o padrão ouro para se observar a exatidão de cada um. Como testes diagnósticos iniciais, em geral mais simples que o padrão ouro, são realizados na prática médica como estratégias de rastreamento ou triagem, mesmo sabendo-se que o uso destes resulte em certo risco de diagnóstico incorreto, tal risco é justificado pela segurança e conveniência (para o indivíduo ou do ponto de vista financeiro) do teste mais simples. A sensibilidade é a capacidade de um teste de identificar corretamente os indivíduos que possuem uma doença ou alteração (casos). A especificidade

é a capacidade do teste de identificar corretamente os indivíduos que não possuem a doença ou alteração (não casos). A sensibilidade e a especificidade são propriedades que influenciam na tomada de decisão sobre pedir ou não um teste inicial com finalidade de rastreamento e elas não se modificam por serem inerentes ao teste. Uma maneira de expressar a relação entre a sensibilidade e a especificidade é a área sob a curva de ROC (do inglês *receiver operator characteristic*). O valor preditivo positivo é a proporção de casos verdadeiramente positivos entre todos os indivíduos com teste positivo. O valor preditivo negativo é a proporção de casos verdadeiramente negativos entre todos os indivíduos com teste negativo. Estas características são alteradas pela prevalência da doença testada na área, especialmente o valor preditivo positivo.

Devido ao recente avanço no que se refere à terapia alvo, a identificação de uma alteração genética para a qual exista um modo de atuação terapêutica justifica o uso de um teste de rastreamento sensível, sendo que se este teste for negativo há pouca chance do caso ser um falso negativo (casos falsos negativos não são desejados, pois implicariam na perda de uma possibilidade terapêutica para o paciente). Com a construção dos cenários envolvendo o cruzamento entre os resultados dos testes imuno-histoquímicos e padrão ouro buscou-se identificar qual dos testes iniciais exibiria maior sensibilidade e valor preditivo negativo.

Considerando dados na literatura, a frequência de superexpressão do oncogene HER2/c-erbB-2 varia entre 4,4% a 53,4%, com média de 17,9% para os carcinomas gástricos (183). Para o carcinoma mamário invasivo a frequência da amplificação está entre 15-20% dos casos (184). Este estudo revelou uma frequência de amplificação do oncogene HER2/c-erbB-2 em 12,5% dos CCs. Apesar de se considerar como ressalva o tempo do material embocado em parafina, a porcentagem observada é equivalente à dos outros tumores e permite considerar o teste imuno-histoquímico como triagem para a detecção da amplificação do oncogene em situações de discussão clínica sobre eventual uso de terapia alvo. Dentro deste contexto, a análise dos três cenários anteriormente descritos permite considerar que quando um CC é classificado como 2+ utilizando o protocolo proposto para carcinoma gástrico

invasivo, será elevada a possibilidade de não haver a amplificação do oncogene HER2-c-erbB-2, sendo os aspectos observados nas reações imuno-histoquímicas destes casos mais indicativos de ausência de amplificação do oncogene e não de *status* verdadeiramente duvidoso.

No contexto de uma neoplasia tão agressiva, na dependência da integração de todos os dados clínicos e laboratoriais, a existência de uma ferramenta de auxílio terapêutico é sempre um ponto benéfico a ser discutido no manejo clínico, justificando a realização dos testes moleculares.

Quadro 6 – Comparação entre as diferentes classificações utilizadas em CCs

Classificação	Nome da entidade diagnóstica	Subtipo especial de adenocarcinoma*	Topografia	Padrão macroscópico	Aspecto histológico
WHO 2010	Colangiocarcinoma intra-hepático	Adenocarcinoma SOE	CCI	FM / ID	Adenocarcinoma de padrão bileopancreático usual
		Carcinoma colangiolo-celular	CCI	FM	Adenocarcinoma com ductos pequenos lembrando aspecto de malformação de ductos biliares
	Carcinoma dos ductos biliares extra-hepáticos, incluindo colangiocarcinoma hilar	Adenocarcinoma SOE	CCH / CCE	FM / ID / IP	Adenocarcinoma de padrão bileopancreático usual
	Carcinoma combinado hepatobiliar	Não se aplica	Carcinoma intra-hepático	FM	Aspectos morfológicos de carcinoma hepatocelular e colangiocarcinoma clássicos
Nakanuma et al	Convencional (ductal)	Pequenos ductos biliares	CCI	FM	Adenocarcinoma de padrão bileopancreático usual com ductos grandes
	Convencional (ductal)	Grandes ductos biliares	CCH	FM IP	Adenocarcinoma de padrão bileopancreático usual com ductos pequenos
	Ductular tipo malformação de placa ductal	Não se aplica	CCI	FM	Adenocarcinoma com ductos pequenos lembrando aspecto de malformação de ductos biliares
	Intraductal	Não se aplica	CCE	ID	Adenocarcinoma tubular/papilífero

Quadro 6 – Comparação entre as diferentes classificações usadas em CCs (cont.)

Classificação	Nome da entidade diagnóstica	Subtipo especial de adenocarcinoma*	Topografia	Padrão macroscópico	Aspecto histológico
Brunt et al**	Colangiocarcinoma clássico	⊖	⊖	⊖	Adenocarcinoma de padrão bileopancreático usual
	Carcinoma de células intermediárias	⊖	⊖	⊖	Carcinoma com aspecto de células progenitoras
	Colangiolo-carcinoma	⊖	⊖	⊖	Adenocarcinoma com ductos pequenos lembrando aspecto de malformação de ductos biliares
Marins et al	Colangiocarcinoma convencional	Não se aplica	CCI / CCH / CCE	IP / FM	Adenocarcinoma de padrão bileopancreático usual
	Colangiolo-carcinoma	Não se aplica	CCI	FM	Adenocarcinoma com ductos pequenos lembrando aspecto de malformação de ductos biliares
	Carcinoma de células intermediárias	Não se aplica	CCI	FM	Carcinoma com aspecto precursor (entre polos hepatocelular e colangiocelular), sem evidências de diferenciação hepatocitária ao H&E
	Carcinomas combinados (CCC-CLC)	Não se aplica	CCI / CCH	FM	Áreas distintas com características morfológicas observadas em CCC e CLC
	Carcinoma intraductal*	Não se aplica	CCE	ID	Adenocarcinoma com padrões tubular e papilífero

CCI: colangiocarcinoma intra-hepático; CCE: colangiocarcinoma extra-hepático; CCH: colangiocarcinoma hilar; FM: colangiocarcinoma formador de massa; IP: colangiocarcinoma infiltrativo periductal; ID: colangiocarcinoma intraductal (geralmente polipoide); ⊖: não é a ênfase do trabalho publicado; * variantes raras excluídas dos comentários; ** não inclui a discussão sobre carcinoma hepatocelular.

Quadro 7 – Comparação entre aspectos patológicos abordados nas diferentes classificações empregadas para nomenclatura de CCs

Classificação				
Características abordadas	WHO 2010	Nakanuma et al	Brunt et al	Marins et al
Topografia da neoplasia	XXX	XX	⊖	X
Aspectos macroscópicos	XX	XXX	⊖	XX
Aspectos fenotípicos das células neoplásicas	X	XXX	XXX	XXX

⊖: comenta sobre alguns aspectos, porém não correlaciona com os achados histológicos.; X: comenta sobre a característica e correlaciona com os achados histológicos, dando importância menor para a classificação final; XX: comenta sobre a característica e correlaciona com os achados histológicos, dando importância moderada para a classificação final; XXX: comenta sobre a característica e correlaciona com os achados histológicos, dando forte importância para a classificação final.

8 CONCLUSÕES

- Nessa casuística cirúrgica foi possível a identificação dos diferentes subtipos histológicos de CCs com predomínio do subtipo CCC (68%), seguido por CaCI (16%), CLC (7%), variantes menos frequentes (7%) e um caso combinado CCC-CLC (2%).
- Os subtipos histológicos apresentaram distribuição diferente no que se refere às variáveis, distribuição ao longo da árvore biliar, padrão macroscópico, tamanho do tumor e grau de diferenciação tumoral: os CCCs foram menores, hilares e peri-hilares, predominantemente infiltrativos periductais e melhor diferenciados; os CaCIs e os CLCs foram maiores, intra-hepáticos, formadores de massa e menos diferenciados. Estes aspectos devem ser integrados e analisados em conjunto com os achados histológicos para a subclassificação final dos CCs.
- A presença de aspectos sugestivos de doença hepática de base não se correlacionou com subtipo histológico de CCs, mas deve-se ressaltar a alta frequência de detecção de colangite crônica inespecífica (48,2%), malformação de placa ductal (25%) e hepatolitíase (7,1%) em nossa casuística.
- As expressões de MUC1, MUC5AC e MUC6 foram diferentes entre os subtipos de CCs, com 100% de positividade para MUC1 nos CCCs, ausência de imunoexpressão de MUC5AC e MUC6 nos CLCs e baixa frequência de expressão de MUC5AC e MUC6 nos CaCIs. O imunoperfil de mucinas pode representar ferramenta adicional para a classificação dos subtipos de CCs.
- Não houve diferença no padrão de expressão imuno-histoquímica da oncoproteína HER2 nos diferentes subtipos histológicos. A frequência de amplificação do oncogene HER2/c-erbB-2 em 12,5% dos CCs está apenas um pouco abaixo das porcentagens descritas para carcinomas gástricos (cerca de 17,9%) e mamário (15-20%), o que permite considerar a pesquisa deste oncogene em cenários clínicos específicos, dos quais exista possibilidade de terapêutica direcionada para este alvo molecular. A análise

da acurácia de testes imuno-histoquímicos para pesquisa da oncoproteína HER2 em CCs (utilizados como testes de triagem), demonstra que o protocolo atualmente aplicado em carcinomas gástricos invasivos apresenta desempenho superior quando comparado ao protocolo aplicado em carcinomas mamários invasivos, sendo que os casos com resultados duvidosos pelo protocolo para carcinoma gástrico invasivo quando aplicado em CCs, muito provavelmente corresponderão a casos não amplificados pelo padrão ouro (FISH).

9 ANEXO

Variáveis estudadas nos colangiocarcinomas

Caso	Número HC	Sexo	Idade	Padrão macroscópico	Padrão microscópico	Diferenciação tumoral	Topografia	Tamanho (cm)	Malformação de placa	Manguito	Litase	MUC2	MUC5AC	MUC6	MUC1	MUC4	HER2 mama	HER2 gastro	Score oncogene HER2
				(1) Formador de massa	(1) CCC	(1) BD	(1) BG	(1) CCI	Hilar	Periférica		(0) Neg	(0) Neg	(0) Neg	(0) Neg	(0) Neg	(0) Neg	(0) Neg	(0) Negativo
				(2) Periducial	(2) CLC	(2) MD	(2) AG	(2) CCE	(0) Ausente	(0) Ausente	(0) Ausente	(1) Pos	(1) Pos	(1) Pos	(1) Pos	(1) Pos	(1) Neg	(1) Neg	(2) Positivo
				(3) Intraducial	(3) CaCI	(3) PD		(3) CCH	(1) Leve	(1) Leve	(1) Leve	(1) Presente					(2) Duv	(2) Duv	(3) Inconclusivo
					(4) VR	(4) Ind			(2) Moderada	(2) Moderada	(2) Moderada						(3) Pos	(3) Pos	
									(3) Intensa	(3) Intensa	(3) Intensa								
									(4) NA	(4) NA	(4) NA								
1	10-3593-2 (B92-4777)	F	72	2	1	1	1	3	2,5	1	0	1	0	0	1	1	1+	2+	1
2	10-3797-8 (B92-4897)	F	61	2	1	1	1	3	1	4	4	4	4	2	0	1	1	1+	1
3	10-6199-2 (B92-6345)	F	48	1	3	2	1	3	1,8	0	0	0	0	0	0	1	1+	2+	1
4	11-6588-7 (B92-12034)	M	65	2	1	1	1	2	2,5	4	4	4	4	2	1	1	1+	2+	1
6	12-7669-7	M	56	2	1	1	1	2	1,2	4	4	4	4	2	1	1	1+	2+	1
7	13-6833-8	F	36	2	1	1	1	3	3	0	0	0	0	0	1	1	1+	2+	1

Variáveis estudadas nos colangiocarcinomas (continuação)

Caso	Número HC	Sexo	Idade	Padrão macroscópico	Padrão microscópico	Diferenciação tumoral		Topografia	Tamanho (cm)	Malformação de placa		Manguito		Litíase	MUC2	MUC5AC	MUC6	MUC1	MUC4	HER2 mama	HER2 gastro	Score oncogene HER2
9	14-6745-0	M	67	2	1	1	1	2	2,2	4	4	4	4	2	0	1	1	1	1	1+	2+	1
10	16-1690-0	M	82	1	3	2	1	1	8	0	0	2	1	0	1	0	1	1	0	1+	2+	1
11	18-5846-7	F	85	2	1	1	1	3	3	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1+	1
12	23-3368-6	M	60	2	1	1	1	3	1,2	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1+	2+	1
13	26-3765-0	F	49	1	2	2	1	1	10	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	2+	3+	3
14	26-4579-3	F	49	1	1	1	2	3	2,1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	2+	3+	2
15	269868-4	F	56	1	1	1	2	3	2,1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1+	2+	1
16	271135-4	F	71	1	3	2	2	1	5	0	0	2	2	0	0	0	1	1	0	1+	2+	1
17	28-3542-8	F	56	1	3	2	1	1	7,5	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	2+	2+	1
18	289459-9	F	50	1	3	2	1	3	4,5	0	0	2	1	0	0	0	1	1	0	1+	2+	3
19	30-6860-9	F	50	1	2	2	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
20	30-6911	M	58	1	1	1	1	3	2,5	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1+	2+	3
21	34-8712-1	M	48	2	1	1	1	3	1,2	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1+	2+	1
23	36-7167-4	M	70	2	1	1	1	2	3	4	4	4	4	2	0	0	0	1	1	3+	3+	2
24	36-8299-4	M	49	2	1	1	1	3	2,5	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1+	1+	3
25	36-9536-0	M	52	2	1	1	1	2	2	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1+	3+	2
26	37-2993-1	M	53	2	1	1	1	2	1	4	4	4	4	2	1	1	1	1	1	2+	3+	2
28	40-8527-2	F	63	1	3	2	2	3	13	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1+	1+	1
29	41-8200-6	M	32	2	1	1	1	2	1,9	4	4	4	4	2	0	0	0	1	1	2+	3+	2
30	42-5186-5	F	58	1	4	2	1	3	13	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	2+	2+	3

Variáveis estudadas nos colangiocarcinomas (continuação)

Caso	Número HC	Sexo	Idade	Padrão macroscópico	Padrão microscópico	Diferenciação tumoral		Topografia	Tamanho (cm)	Malformação de placa				Manguito		Litase	MUC2	MUC5AC	MUC6	MUC1	MUC4	HER2 mama	HER2 gastro	Score oncogene HER2
31	43-5759-0	M	39	1	1 e 2	2	1	1	7	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2+	3+	3
32	43-7369-3	M	62	1	4	1	1	3	1,7	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1
33	43-7911-0	M	57	2	1	1	1	3	1,6	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1+	1
34	45-5634-8	M	23	2	1	1	1	2	0,6	0	0	0	2	0	0	0	0	1	0	1	1	1+	2+	1
35	45-8932-7	M	72	2	4	4	2	2	3	4	4	4	4	2	0	0	1	1	1	1	1	2+	2+	1
36	49-7046-2	M	63	2	1	1	1	2	4,5	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1+	2+	1
37	51-1195-1	M	56	1	3	2	1	1	6	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1+	2+	1
38	51-3301-7	F	61	3	4	1	1	2	3	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1+	1+	1
39	51-8451-7	F	29	2	1	1	1	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1+	2+	1
40	53-2229-4	M	71	2	1	2	2	3	2,5	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	3+	3+	2
41	55-0608-5	M	48	2	1	2	1	2	2	4	4	4	4	2	0	0	0	1	1	1	1	2+	2+	1
42	56-0485-0	F	56	1	3	2	1	1	6,5	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	2+	2+	1
43	56-0489-3	F	62	2	1	1	2	2	1,3	4	4	4	4	2	1	0	0	1	1	1	1	2+	2+	1
44	58-2172-0	M	43	2	1	1	1	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1+	2+	1
45	58-8718-6	F	59	2	1	1	1	2	1	4	4	4	4	2	0	0	0	1	1	1	1	2+	2+	2
46	59-2914-8	F	59	1	1	1	2	3	2,5	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	2+	2+	1
47	60-5546-0	M	73	2	1	3	2	2	1,5	4	4	4	4	2	0	0	0	1	1	1	0	1+	2+	1
48	61-2196-9	M	59	2	1	1	1	3	3	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1+	2+	1
49	61-3152-2	M	43	2	1	1	1	2	1,7	4	4	4	4	2	0	0	0	1	1	1	1	2+	2+	1
50	61-3273-1	F	50	2	1	1	1	3	2,5	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1+	1+	1

Variáveis estudadas nos colangiocarcinomas (conclusão)

Caso	Número HC	Sexo	Idade	Padrão macroscópico	Padrão microscópico	Diferenciação tumoral		Topografia	Tamanho (cm)	Malformação de placa				Manguito		Litíase	MUC2	MUC5AC	MUC6	MUC1	MUC4	HER2 mama	HER2 gastro	Score oncogene HER2
51	70-3930	M	35	2	1	2	1	3	2,7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1+	2+	1
52	06 6682	M	74	2	1	3	2	3	4,5	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1+	2+	1
57	07 3786	M	61	1	2	2	1	1	3	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	2+	2+	1
58	07 39270	M	50	2	1	2	1	3	1,3	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1+	1+	1
59	07 41297	M	48	2	1	2	1	2	2,5	4	4	4	4	2	2	0	0	1	1	1	0	2+	2+	1
60	07 9481	M	70	2	1	1	1	2	1,1	4	4	4	4	2	2	0	0	1	1	1	0	1+	1+	3
61	2008-6549	M	67	1	3	3	1	1	7,5	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1
62	2009-32807	M	72	2	1	2	1	3	3,1	3	2	0	2	0	0	0	0	1	0	1	0	1+	0	1
63	2009-42733	F	55	1	2	1	1	1	11	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1+	1+	1
64	63-2525-4	F	38	2	1	1	1	3	1,5	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1+	1+	3

10 REFERÊNCIAS

1. Patel T. Increasing incidence and mortality of primary intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States. *Hepatology*. 2001;33(6):1353-7.
2. Cong WM, Bakker A, Swalsky PA, Raja S, Woods J, Thomas S, et al. Multiple genetic alterations involved in the tumorigenesis of human cholangiocarcinoma: a molecular genetic and clinicopathological study. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2001;127(3):187-92.
3. Nakazawa K, Dobashi Y, Suzuki S, Fujii H, Takeda Y, Ooi A. Amplification and overexpression of c-erbB-2, epidermal growth factor receptor, and c-met in biliary tract cancers. *J Pathol*. 2005;206(3):356-65.
4. Braconi C, Roessler S, Kruk B, Lammert F, Krawczyk M, Andersen JB. *Molecular Perturbations in Cholangiocarcinoma: Is it Time for Precision Medicine?* *Liver Int*. 2019.
5. Sano T, Kamiya J, Nagino M, Uesaka K, Kondo S, Kanai M, et al. Macroscopic classification and preoperative diagnosis of intrahepatic cholangiocarcinoma in Japan. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 1999;6(2):101-7.
6. Bosman FT CF, Hruban RH, et al. WHO Classification of Tumours of the Digestive System, Fourth Edition. WHO Classification of Tumours, *IARC WHO Classification of Tumours*, No 3, 2010.
7. Nakanuma Y, Sato Y, Harada K, Sasaki M, Xu J, Ikeda H. Pathological classification of intrahepatic cholangiocarcinoma based on a new concept. *World J Hepatol*. 2010;2(12):419-27.
8. Nakanuma Y, Kakuda Y. Pathologic classification of cholangiocarcinoma: New concepts. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2015;29(2):277-93.
9. Brunt E, Aishima S, Clavien PA, Fowler K, Goodman Z, Gores G, et al. cHCC-CCA:Consensus terminology for primary liver carcinomas with both hepatocytic and cholangiocytic differentiation. *Hepatology*. 2018;68(1):113-26.
10. Nakanuma Y. [Classification of intrahepatic cholangiocarcinoma based on recent progress and new proposal]. *Nihon Shokakibyo Gakkai Zasshi*. 2012;109(11):1865-71.
11. Wolff AC. Current status of taxanes as adjuvant therapy for early-stage breast cancer. *Int J Fertil Womens Med*. 2005;50(5 Pt 1):227-9.
12. Bang YJ. Advances in the management of HER2-positive advanced gastric and gastroesophageal junction cancer. *J Clin Gastroenterol*. 2012;46(8):637-48.
13. Javle M, Churi C, Kang HC, Shroff R, Janku F, Surapaneni R, et al. HER2/neu-directed therapy for biliary tract cancer. *J Hematol Oncol*. 2015;8:58.
14. Nakanuma Y, Harada K, Ishikawa A, Zen Y, Sasaki M. Anatomic and molecular pathology of intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2003;10(4):265-81.
15. Nakanuma Y, Sato Y, Ikeda H, Harada K, Kobayashi M, Sano K, et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma with predominant "ductal plate

- malformation" pattern: a new subtype. *Am J Surg Pathol*. 2012;36(11):1629-35.
16. Renshaw K. Malignant neoplasms of the extrahepatic biliary ducts. *Ann Surg*. 1922;76(2):205-21.
 17. Olnes MJ, Erlich R. A review and update on cholangiocarcinoma. *Oncology*. 2004;66(3):167-79.
 18. Kirstein MM, Vogel A. Epidemiology and Risk Factors of Cholangiocarcinoma. *Visc Med*. 2016;32(6):395-400.
 19. Ramanan P, Cummins NW, Wilhelm MP, Heimbach JK, Dierkhising R, Kremers WK, et al. Epidemiology, risk factors, and outcomes of infections in patients undergoing liver transplantation for hilar cholangiocarcinoma. *Clin Transplant*. 2017;31(8).
 20. Blechacz B. Cholangiocarcinoma: Current Knowledge and New Developments. *Gut Liver*. 2017;11(1):13-26.
 21. Gupta A, Dixon E. Epidemiology and risk factors: intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2017;6(2):101-4.
 22. Massarweh NN, El-Serag HB. *Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma and Intrahepatic Cholangiocarcinoma*. *Cancer Control*. 2017;24(3):1073274817729245.
 23. Shaib YH, Davila JA, McGlynn K, El-Serag HB. Rising incidence of intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States: a true increase? *J Hepatol*. 2004;40(3):472-7.
 24. Ethun CG, Lopez-Aguilar AG, Anderson DJ, Adams AB, Fields RC, Doyle MB, et al. Transplantation Versus Resection for Hilar Cholangiocarcinoma: An Argument for Shifting Treatment Paradigms for Resectable Disease. *Ann Surg*. 2017.
 25. Komuta M, Govaere O, Vandecaveye V, Akiba J, Van Steenberghe W, Verslype C, et al. Histological diversity in cholangiocellular carcinoma reflects the different cholangiocyte phenotypes. *Hepatology*. 2012;55(6):1876-88.
 26. Kondo F, Fukusato T. Pathogenesis of Cholangiolocellular Carcinoma: Possibility of an Interlobular Duct Origin. *Intern Med*. 2015;54(14):1685-94.
 27. Wei M, Lü L, Lin P, Chen Z, Quan Z, Tang Z. Multiple cellular origins and molecular evolution of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer Lett*. 2016;379(2):253-61.
 28. Sia D, Villanueva A, Friedman SL, Llovet JM. Liver Cancer Cell of Origin, Molecular Class, and Effects on Patient Prognosis. *Gastroenterology*. 2017;152(4):745-61.
 29. Blechacz BR, Gores GJ. Cholangiocarcinoma. *Clin Liver Dis*. 2008;12(1):131-50, ix.
 30. Petrick JL, Yang B, Altekruse SF, Van Dyke AL, Koshiol J, Graubard BI, et al. Risk factors for intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma in the United States: A population-based study in SEER-Medicare. *PLoS One*. 2017;12(10):e0186643.
 31. Treeprasertsuk S, Poovorawan K, Soonthornworasiri N, Chaiteerakij R, Thanapirom K, Mairiang P, et al. A significant cancer burden and high mortality of intrahepatic cholangiocarcinoma in Thailand: a nationwide database study. *BMC Gastroenterol*. 2017;17(1):3.

32. Shaib YH, El-Serag HB, Nooka AK, Thomas M, Brown TD, Patt YZ, et al. Risk factors for intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma: a hospital-based case-control study. *Am J Gastroenterol*. 2007;102(5):1016-21.
33. Welzel TM, Graubard BI, El-Serag HB, Shaib YH, Hsing AW, Davila JA, et al. Risk factors for intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma in the United States: a population-based case-control study. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007;5(10):1221-8.
34. Cardinale V. Classifications and misclassification in cholangiocarcinoma. *Liver Int*. 2019;39(2):260-2.
35. Charbel H, Al-Kawas FH. Cholangiocarcinoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, and diagnosis. *Curr Gastroenterol Rep*. 2011;13(2):182-7.
36. Tyson GL, El-Serag HB. Risk factors for cholangiocarcinoma. *Hepatology*. 2011;54(1):173-84.
37. Chinchilla-López P, Aguilar-Olivos NE, García-Gómez J, Hernández-Alejandro KK, Chablé-Montero F, Motola-Kuba D, et al. Prevalence, Risk Factors, and Survival of Patients with Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Ann Hepatol*. 2017;16(4):565-8.
38. McLean L, Patel T. Racial and ethnic variations in the epidemiology of intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States. *Liver Int*. 2006;26(9):1047-53.
39. Shaib YH, El-Serag HB, Davila JA, Morgan R, McGlynn KA. Risk factors of intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States: a case-control study. *Gastroenterology*. 2005;128(3):620-6.
40. Balkwill F, Mantovani A. Cancer and inflammation: implications for pharmacology and therapeutics. *Clin Pharmacol Ther*. 2010;87(4):401-6.
41. Lazaridis KN, Gores GJ. Primary sclerosing cholangitis and cholangiocarcinoma. *Semin Liver Dis*. 2006;26(1):42-51.
42. Andersen JB, Thorgeirsson SS. Genetic profiling of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Curr Opin Gastroenterol*. 2012;28(3):266-72.
43. Andersen JB, Thorgeirsson SS. Genomic decoding of intrahepatic cholangiocarcinoma reveals therapeutic opportunities. *Gastroenterology*. 2013;144(4):687-90.
44. Brivio S, Cadamuro M, Fabris L, Strazzabosco M. Molecular mechanisms driving cholangiocarcinoma invasiveness: an overview. *Gene Expr*. 2017.
45. Kornfeld D, Ekbohm A, Ihre T. Survival and risk of cholangiocarcinoma in patients with primary sclerosing cholangitis. A population-based study. *Scand J Gastroenterol*. 1997;32(10):1042-5.
46. Bergquist A, Glaumann H, Persson B, Broomé U. Risk factors and clinical presentation of hepatobiliary carcinoma in patients with primary sclerosing cholangitis: a case-control study. *Hepatology*. 1998;27(2):311-6.
47. Ahrendt SA, Pitt HA, Nakeeb A, Klein AS, Lillemoe KD, Kalloo AN, et al. Diagnosis and management of cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis. *J Gastrointest Surg*. 1999;3(4):357-67; discussion 67-8.
48. de Groen PC. Cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis: who is at risk and how do we screen? *Hepatology*. 2000;31(1):247-8.
49. Boberg KM, Bergquist A, Mitchell S, Pares A, Rosina F, Broomé U, et al. Cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis: risk factors and clinical presentation. *Scand J Gastroenterol*. 2002;37(10):1205-11.

50. Björnsson E, Angulo P. Cholangiocarcinoma in young individuals with and without primary sclerosing cholangitis. *Am J Gastroenterol*. 2007;102(8):1677-82.
51. Jesudian AB, Jacobson IM. Screening and diagnosis of cholangiocarcinoma in patients with primary sclerosing cholangitis. *Rev Gastroenterol Disord*. 2009;9(2):E41-7.
52. Kerr SE, Barr Fritcher EG, Campion MB, Voss JS, Kipp BR, Halling KC, et al. Biliary dysplasia in primary sclerosing cholangitis harbors cytogenetic abnormalities similar to cholangiocarcinoma. *Hum Pathol*. 2014;45(9):1797-804.
53. Helzberg JH, Petersen JM, Boyer JL. Improved survival with primary sclerosing cholangitis. A review of clinicopathologic features and comparison of symptomatic and asymptomatic patients. *Gastroenterology*. 1987;92(6):1869-75.
54. Broomé U, Glaumann H, Lindstöm E, Lööf L, Almer S, Prytz H, et al. Natural history and outcome in 32 Swedish patients with small duct primary sclerosing cholangitis (PSC). *J Hepatol*. 2002;36(5):586-9.
55. Liang H, Manne S, Shick J, Lissos T, Dolin P. *Incidence, prevalence, and natural history of primary sclerosing cholangitis in the United Kingdom. Medicine (Baltimore)*. 2017;96(24):e7116.
56. Lazaridis KN. Dissecting the genetic susceptibility for cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis. *Hepatology*. 2008;47(1):8-10.
57. Deneau MR, El-Matary W, Valentino PL, Abdou R, Alqoaer K, Amin M, et al. The natural history of primary sclerosing cholangitis in 781 children: A multicenter, international collaboration. *Hepatology*. 2017;66(2):518-27.
58. Burak K, Angulo P, Pasha TM, Egan K, Petz J, Lindor KD. Incidence and risk factors for cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis. *Am J Gastroenterol*. 2004;99(3):523-6.
59. Abbas G, Lindor KD. Cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis. *J Gastrointest Cancer*. 2009;40(1-2):19-25.
60. Bergquist A, Prytz H, Björnsson E. [Difficult to stop primary sclerosing cholangitis]. *Läkartidningen*. 2010;107(21):1392-5.
61. Sirpal S, Chandok N. Primary sclerosing cholangitis: diagnostic and management challenges. *Clin Exp Gastroenterol*. 2017;10:265-73.
62. Rosen CB, Nagorney DM, Wiesner RH, Coffey RJ, LaRusso NF. Cholangiocarcinoma complicating primary sclerosing cholangitis. *Ann Surg*. 1991;213(1):21-5.
63. Boonstra K, Weersma RK, van Erpecum KJ, Rauws EA, Spanier BW, Poen AC, et al. Population-based epidemiology, malignancy risk, and outcome of primary sclerosing cholangitis. *Hepatology*. 2013;58(6):2045-55.
64. Fleming KA, Boberg KM, Glaumann H, Bergquist A, Smith D, Clausen OP. Biliary dysplasia as a marker of cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol*. 2001;34(3):360-5.
65. Liu R, Cox K, Guthery SL, Book L, Witt B, Chadwick B, et al. Cholangiocarcinoma and high-grade dysplasia in young patients with primary sclerosing cholangitis. *Dig Dis Sci*. 2014;59(9):2320-4.
66. Pairojkul C, Shirai T, Hirohashi S, Thamavit W, Bhudhisawat W, Uttaravicien T, et al. Multistage carcinogenesis of liver-fluke-associated cholangiocarcinoma in Thailand. *Princess Takamatsu Symp*. 1991;22:77-86.

67. Rustagi T, Dasanu CA. Risk factors for gallbladder cancer and cholangiocarcinoma: similarities, differences and updates. *J Gastrointest Cancer*. 2012;43(2):137-47.
68. Benamrouz S, Conseil V, Creusy C, Calderon E, Dei-Cas E, Certad G. Parasites and malignancies, a review, with emphasis on digestive cancer induced by *Cryptosporidium parvum* (Alveolata: Apicomplexa). *Parasite*. 2012;19(2):101-15.
69. Zheng S, Zhu Y, Zhao Z, Wu Z, Okanurak K, Lv Z. Liver fluke infection and cholangiocarcinoma: a review. *Parasitol Res*. 2017;116(1):11-9.
70. Surapaitoon A, Suttiaprapa S, Mairiang E, Khuntikeo N, Pairojkul C, Bethony J, et al. Subsets of Inflammatory Cytokine Gene Polymorphisms are Associated with Risk of Carcinogenic Liver Fluke *Opisthorchis viverrini*-Associated Advanced Periductal Fibrosis and Cholangiocarcinoma. *Korean J Parasitol*. 2017;55(3):295-304.
71. Suzuki Y, Mori T, Yokoyama M, Nakazato T, Abe N, Nakanuma Y, et al. Hepatolithiasis: analysis of Japanese nationwide surveys over a period of 40 years. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2014;21(9):617-22.
72. Suzuki Y, Mori T, Yokoyama M, Kim S, Momose H, Matsuki R, et al. A proposed severity classification system for hepatolithiasis based on an analysis of prognostic factors in a Japanese patient cohort. *J Gastroenterol*. 2017.
73. Cai H, Kong WT, Chen CB, Shi GM, Huang C, Shen YH, et al. Cholelithiasis and the risk of intrahepatic cholangiocarcinoma: a meta-analysis of observational studies. *BMC Cancer*. 2015;15:831.
74. Lin CC, Lin PY, Chen YL. Comparison of concomitant and subsequent cholangiocarcinomas associated with hepatolithiasis: Clinical implications. *World J Gastroenterol*. 2013;19(3):375-80.
75. Bhalla A, Mann SA, Chen S, Cummings OW, Lin J. Histopathological evidence of neoplastic progression of von Meyenburg complex to intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hum Pathol*. 2017;67:217-24.
76. Kasper HU, Drebber U, Stippel DL, Dienes HP, Gilleßen A. Liver tumor infiltrating lymphocytes: comparison of hepatocellular and cholangiolar carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2009;15(40):5053-7.
77. Burgos San Juan L. [Cholangiocarcinoma]. *Rev Med Chil*. 2008;136(2):240-8.
78. Lendoire JC, Raffin G, Grondona J, Bracco R, Russi R, Ardiles V, et al. Caroli's disease: report of surgical options and long-term outcome of patients treated in Argentina. Multicenter study. *J Gastrointest Surg*. 2011;15(10):1814-9.
79. Matsumoto K, Onoyama T, Kawata S, Takeda Y, Harada K, Ikebuchi Y, et al. Hepatitis B and C virus infection is a risk factor for the development of cholangiocarcinoma. *Intern Med*. 2014;53(7):651-4.
80. Fiorino S, Bacchi-Reggiani L, de Biase D, Fornelli A, Masetti M, Tura A, et al. Possible association between hepatitis C virus and malignancies different from hepatocellular carcinoma: A systematic review. *World J Gastroenterol*. 2015;21(45):12896-953.
81. Fletcher NF, Humphreys E, Jennings E, Osburn W, Lissauer S, Wilson GK, et al. Hepatitis C virus infection of cholangiocarcinoma cell lines. *J Gen Virol*. 2015;96(Pt 6):1380-8.

82. Li H, Hu B, Zhou ZQ, Guan J, Zhang ZY, Zhou GW. Hepatitis C virus infection and the risk of intrahepatic cholangiocarcinoma and extrahepatic cholangiocarcinoma: evidence from a systematic review and meta-analysis of 16 case-control studies. *World J Surg Oncol*. 2015;13:161.
83. Wang M, Wang Y, Feng X, Wang R, Zeng H, Qi J, et al. Contribution of hepatitis B virus and hepatitis C virus to liver cancer in China north areas: Experience of the Chinese National Cancer Center. *Int J Infect Dis*. 2017;65:15-21.
84. Zhang H, Zhu B, Liang J, Zeng W. HBV Infection Status and the Risk of Cholangiocarcinoma in Asia: A Meta-Analysis. *Biomed Res Int*. 2016;2016:3417976.
85. Nigri G, Romano C, Valabrega S, Aurello P, D'Angelo F, Ravaioli M, et al. Cholangiocarcinoma in HIV-positive patients: are these conditions related? *Am Surg*. 2011;77(6):e105-6.
86. Huang Y, You L, Xie W, Ning L, Lang J. Smoking and risk of cholangiocarcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(59):100570-81.
87. Chen J, He J, Deng M, Wu HY, Shi J, Mao L, et al. Clinicopathological, radiologic, and molecular study of 23 combined hepatocellular-cholangiocarcinomas with stem cell features, cholangiolocellular type. *Hum Pathol*. 2017;64:118-27.
88. Parsi MA. Obesity and cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol*. 2013;19(4):457-62.
89. Patel T, Singh P. Cholangiocarcinoma: emerging approaches to a challenging cancer. *Curr Opin Gastroenterol*. 2007;23(3):317-23.
90. Davidson BR, Gurusamy K. Is preoperative histological diagnosis necessary for cholangiocarcinoma? *HPB (Oxford)*. 2008;10(2):94-7.
91. Ho J, Curley SA. Diagnosis and Management of Intrahepatic and Extrahepatic Cholangiocarcinoma. *Cancer Treat Res*. 2016;168:121-63.
92. Oliveira IS, Kilcoyne A, Everett JM, Mino-Kenudson M, Harisinghani MG, Ganesan K. Cholangiocarcinoma: classification, diagnosis, staging, imaging features, and management. *Abdom Radiol (NY)*. 2017;42(6):1637-49.
93. Khan SA, Thomas HC, Davidson BR, Taylor-Robinson SD. Cholangiocarcinoma. *Lancet*. 2005;366(9493):1303-14.
94. Malaguarnera G, Paladina I, Giordano M, Malaguarnera M, Bertino G, Berretta M. Serum markers of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Dis Markers*. 2013;34(4):219-28.
95. Doherty B, Nambudiri VE, Palmer WC. Update on the Diagnosis and Treatment of Cholangiocarcinoma. *Curr Gastroenterol Rep*. 2017;19(1):2.
96. Yachimski P, Pratt DS. Cholangiocarcinoma: natural history, treatment, and strategies for surveillance in high-risk patients. *J Clin Gastroenterol*. 2008;42(2):178-90.
97. Blehacz B, Komuta M, Roskams T, Gores GJ. Clinical diagnosis and staging of cholangiocarcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011;8(9):512-22.
98. Braconi C, Patel T. Cholangiocarcinoma: new insights into disease pathogenesis and biology. *Infect Dis Clin North Am*. 2010;24(4):871-84, vii.

99. Akamatsu N, Sugawara Y, Hashimoto D. Surgical strategy for bile duct cancer: Advances and current limitations. *World J Clin Oncol*. 2011;2(2):94-107.
100. Kayhanian H, Smyth EC, Braconi C. Emerging molecular targets and therapy for cholangiocarcinoma. *World J Gastrointest Oncol*. 2017;9(7):268-80.
101. Simile MM, Bagella P, Vidili G, Spanu A, Manetti R, Seddaiu MA, et al. Targeted Therapies in Cholangiocarcinoma: Emerging Evidence from Clinical Trials. *Medicina (Kaunas)*. 2019;55(2).
102. Riechelmann R, Coutinho AK, Weschenfelder RF, Andrade de Paulo G, Fernandes GoS, Gifoni M, et al. Guideline for the management of bile duct cancers by the brazilian gastrointestinal tumor group. *Arq Gastroenterol*. 2016;53(1):5-9.
103. Guro H, Kim JW, Choi Y, Cho JY, Yoon YS, Han HS. Multidisciplinary management of intrahepatic cholangiocarcinoma: Current approaches. *Surg Oncol*. 2017;26(2):146-52.
104. Law LY. Dramatic response to trastuzumab and paclitaxel in a patient with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic cholangiocarcinoma. *J Clin Oncol*. 2012;30(27):e271-3.
105. Zhang Z, Oyesanya RA, Campbell DJ, Almenara JA, Dewitt JL, Sirica AE. Preclinical assessment of simultaneous targeting of epidermal growth factor receptor (ErbB1) and ErbB2 as a strategy for cholangiocarcinoma therapy. *Hepatology*. 2010;52(3):975-86.
106. Okuda K, Nakanuma Y, Miyazaki M. Cholangiocarcinoma: recent progress. Part 1: epidemiology and etiology. *J Gastroenterol Hepatol*. 2002;17(10):1049-55.
107. Cardinale V, Carpino G, Reid LM, Gaudio E, Alvaro D. Cholangiocarcinoma: a cancer in search of the right classification. *Hepatology*. 2012;56(4):1585-6; author reply 6.
108. Cardinale V, Bragazzi MC, Carpino G, Torrice A, Fraveto A, Gentile R, et al. Cholangiocarcinoma: increasing burden of classifications. *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2013;2(5):272-80.
109. Okuda K, Kubo Y, Okazaki N, Arishima T, Hashimoto M. Clinical aspects of intrahepatic bile duct carcinoma including hilar carcinoma: a study of 57 autopsy-proven cases. *Cancer*. 1977;39(1):232-46.
110. Nakanuma Y, Kakuda Y. [Pathological classification of biliary tract carcinoma]. *Nihon Rinsho*. 2015;73 Suppl 3:471-6.
111. Welzel TM, McGlynn KA, Hsing AW, O'Brien TR, Pfeiffer RM. Impact of classification of hilar cholangiocarcinomas (Klatskin tumors) on the incidence of intra- and extrahepatic cholangiocarcinoma in the United States. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98(12):873-5.
112. Vijgen S, Terris B, Rubbia-Brandt L. Pathology of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2017;6(1):22-34.
113. Esposito I, Schirmacher P. Pathological aspects of cholangiocarcinoma. *HPB (Oxford)*. 2008;10(2):83-6.
114. Yeh CN, Yeh TS, Chen TC, Jan YY, Chen MF. Gross pathological classification of peripheral cholangiocarcinoma determines the efficacy of hepatectomy. *J Gastroenterol*. 2012.

115. Meng ZW, Pan W, Hong HJ, Chen JZ, Chen YL. Macroscopic types of intrahepatic cholangiocarcinoma and the eighth edition of AJCC/UICC TNM staging system. *Oncotarget*. 2017;8(60):101165-74.
116. Henson DE, Schwartz AM, Nsouli H, Albores-Saavedra J. Carcinomas of the pancreas, gallbladder, extrahepatic bile ducts, and ampulla of vater share a field for carcinogenesis: a population-based study. *Arch Pathol Lab Med*. 2009;133(1):67-71.
117. Park SY, Roh SJ, Kim YN, Kim SZ, Park HS, Jang KY, et al. Expression of MUC1, MUC2, MUC5AC and MUC6 in cholangiocarcinoma: prognostic impact. *Oncol Rep*. 2009;22(3):649-57.
118. Aishima S, Kuroda Y, Nishihara Y, Taguchi K, Taketomi A, Maehara Y, et al. Gastric mucin phenotype defines tumour progression and prognosis of intrahepatic cholangiocarcinoma: gastric foveolar type is associated with aggressive tumour behaviour. *Histopathology*. 2006;49(1):35-44.
119. Higashi M, Yonezawa S, Ho JJ, Tanaka S, Irimura T, Kim YS, et al. Expression of MUC1 and MUC2 mucin antigens in intrahepatic bile duct tumors: its relationship with a new morphological classification of cholangiocarcinoma. *Hepatology*. 1999;30(6):1347-55.
120. Kufe DW. Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(12):874-85.
121. Boonla C, Wongkham S, Sheehan JK, Wongkham C, Bhudhisawasdi V, Tepsiri N, et al. Prognostic value of serum MUC5AC mucin in patients with cholangiocarcinoma. *Cancer*. 2003;98(7):1438-43.
122. Shibahara H, Tamada S, Higashi M, Goto M, Batra SK, Hollingsworth MA, et al. MUC4 is a novel prognostic factor of intrahepatic cholangiocarcinoma-mass forming type. *Hepatology*. 2004;39(1):220-9.
123. Li B, Tang H, Zhang A, Dong J. Prognostic Role of Mucin Antigen MUC4 for Cholangiocarcinoma: A Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016;11(6):e0157878.
124. Vandenhoute B, Buisine MP, Debailleul V, Clément B, Moniaux N, Dieu MC, et al. Mucin gene expression in biliary epithelial cells. *J Hepatol*. 1997;27(6):1057-66.
125. Lee KT, Liu TS. Altered mucin gene expression in stone-containing intrahepatic bile ducts and cholangiocarcinomas. *Dig Dis Sci*. 2001;46(10):2166-72.
126. Fava G, Lorenzini I. Molecular pathogenesis of cholangiocarcinoma. *Int J Hepatol*. 2012;2012:630543.
127. Ocaña A, Pandiella A. Targeting HER receptors in cancer. *Curr Pharm Des*. 2013;19(5):808-17.
128. Verma S, Miles D, Gianni L, Krop IE, Welslau M, Baselga J, et al. Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med*. 2012;367(19):1783-91.
129. Cervantes A, Roda D, Tarazona N, Roselló S, Pérez-Fidalgo JA. Current questions for the treatment of advanced gastric cancer. *Cancer Treat Rev*. 2013;39(1):60-7.
130. Clay MR, Iberri DJ, Bangs CD, Cherry A, Jensen KC. Clinicopathologic characteristics of HER2 FISH-ambiguous breast cancer at a single institution. *Am J Surg Pathol*. 2013;37(1):120-7.

131. Pathmanathan N, Bilous AM. HER2 testing in breast cancer: an overview of current techniques and recent developments. *Pathology*. 2012;44(7):587-95.
132. Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ, Schnitt SJ. Specificity of HercepTest in determining HER-2/neu status of breast cancers using the United States Food and Drug Administration-approved scoring system. *J Clin Oncol*. 1999;17(7):1983-7.
133. Paik S, Bryant J, Tan-Chiu E, Romond E, Hiller W, Park K, et al. Real-world performance of HER2 testing--National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project experience. *J Natl Cancer Inst*. 2002;94(11):852-4.
134. Hanna WM, Kwok K. Chromogenic in-situ hybridization: a viable alternative to fluorescence in-situ hybridization in the HER2 testing algorithm. *Mod Pathol*. 2006;19(4):481-7.
135. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*. 2013;31(31):3997-4013.
136. Hechtman JF, Polydorides AD. HER2/neu gene amplification and protein overexpression in gastric and gastroesophageal junction adenocarcinoma: a review of histopathology, diagnostic testing, and clinical implications. *Arch Pathol Lab Med*. 2012;136(6):691-7.
137. Ukita Y, Kato M, Terada T. Gene amplification and mRNA and protein overexpression of c-erbB-2 (HER-2/neu) in human intrahepatic cholangiocarcinoma as detected by fluorescence in situ hybridization, in situ hybridization, and immunohistochemistry. *J Hepatol*. 2002;36(6):780-5.
138. Terada T, Ashida K, Endo K, Horie S, Maeta H, Matsunaga Y, et al. c-erbB-2 protein is expressed in hepatolithiasis and cholangiocarcinoma. *Histopathology*. 1998;33(4):325-31.
139. Su WC, Shiesh SC, Liu HS, Chen CY, Chow NH, Lin XZ. Expression of oncogene products HER2/Neu and Ras and fibrosis-related growth factors bFGF, TGF-beta, and PDGF in bile from biliary malignancies and inflammatory disorders. *Dig Dis Sci*. 2001;46(7):1387-92.
140. Endo K, Yoon BI, Pairojkul C, Demetris AJ, Sirica AE. ERBB-2 overexpression and cyclooxygenase-2 up-regulation in human cholangiocarcinoma and risk conditions. *Hepatology*. 2002;36(2):439-50.
141. Aishima SI, Taguchi KI, Sugimachi K, Shimada M, Tsuneyoshi M. c-erbB-2 and c-Met expression relates to cholangiocarcinogenesis and progression of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Histopathology*. 2002;40(3):269-78.
142. Harder J, Waiz O, Otto F, Geissler M, Olschewski M, Weinhold B, et al. EGFR and HER2 expression in advanced biliary tract cancer. *World J Gastroenterol*. 2009;15(36):4511-7.
143. Carlson RW, Moench SJ, Hammond ME, Perez EA, Burstein HJ, Allred DC, et al. HER2 testing in breast cancer: NCCN Task Force report and recommendations. *J Natl Compr Canc Netw*. 2006;4 Suppl 3:S1-22; quiz S3-4.
144. Ajani JA, D'Amico TA, Almhanna K, Bentrem DJ, Chao J, Das P, et al. Gastric Cancer, Version 3.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2016;14(10):1286-312.

145. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet*. 2010;376(9742):687-97.
146. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, Harvey BE, McShane LM, Dowsett M. HER2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update Summary. *J Oncol Pract*. 2018;14(7):437-41.
147. Tanenbaum DG, Hall WA, Mittal P, Nickleach DC, Mikell JL, Colbert LE, et al. Cholangiocarcinoma size on magnetic resonance imaging versus pathologic specimen: Implications for radiation treatment planning. *Pract Radiat Oncol*. 2016;6(3):201-6.
148. Patel T. Cholangiocarcinoma. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2006;3(1):33-42.
149. Nakanuma Y, Miyata T, Uchida T. Latest advances in the pathological understanding of cholangiocarcinomas. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016;10(1):113-27.
150. DiVito KA, Charette LA, Rimm DL, Camp RL. Long-term preservation of antigenicity on tissue microarrays. *Lab Invest*. 2004;84(8):1071-8.
151. Kinoshita M, Kubo S, Nakanuma Y, Sato Y, Takemura S, Tanaka S, et al. Pathological spectrum of bile duct lesions from chronic bile duct injury to invasive cholangiocarcinoma corresponding to bile duct imaging findings of occupational cholangiocarcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2016;23(2):92-101.
152. Hofmann M, Stoss O, Shi D, Büttner R, van de Vijver M, Kim W, et al. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology*. 2008;52(7):797-805.
153. Rüschoff J, Hanna W, Bilous M, Hofmann M, Osamura RY, Penault-Llorca F, et al. HER2 testing in gastric cancer: a practical approach. *Mod Pathol*. 2012;25(5):637-50.
154. Shaib Y, El-Serag HB. The epidemiology of cholangiocarcinoma. *Semin Liver Dis*. 2004;24(2):115-25.
155. Bridgewater J, Galle PR, Khan SA, Llovet JM, Park JW, Patel T, et al. Guidelines for the diagnosis and management of intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol*. 2014;60(6):1268-89.
156. Mosadeghi S, Liu B, Bhuket T, Wong RJ. Sex-specific and race/ethnicity-specific disparities in cholangiocarcinoma incidence and prevalence in the USA: An updated analysis of the 2000-2011 Surveillance, Epidemiology and End Results registry. *Hepatol Res*. 2016;46(7):669-77.
157. Beal EW, Tumin D, Moris D, Zhang XF, Chakedis J, Dilhoff M, et al. Cohort contributions to trends in the incidence and mortality of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2018;7(4):270-6.
158. Walter D, Ferstl P, Waidmann O, Trojan J, Hartmann S, Schnitzbauer AA, et al. Cholangiocarcinoma in Germany: epidemiological trends and impact of misclassification. *Liver Int*. 2018.
159. Chaiteerakij R, Pan-Ngum W, Poovorawan K, Soonthornworasiri N, Treeprasertsuk S, Phaosawasdi K. Characteristics and outcomes of

- cholangiocarcinoma by region in Thailand: A nationwide study. *World J Gastroenterol*. 2017;23(39):7160-7.
160. Akita M, Sofue K, Fujikura K, Otani K, Itoh T, Ajiki T, et al. Histological and molecular characterization of intrahepatic bile duct cancers suggests an expanded definition of perihilar cholangiocarcinoma. *HPB (Oxford)*. 2019;21(2):226-34.
 161. Altekruse SF, Petrick JL, Rolin AI, Cuccinelli JE, Zou Z, Tatalovich Z, et al. Geographic variation of intrahepatic cholangiocarcinoma, extrahepatic cholangiocarcinoma, and hepatocellular carcinoma in the United States. *PLoS One*. 2015;10(3):e0120574.
 162. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*. 2019;69(1):7-34.
 163. de Jong MC, Nathan H, Sotiropoulos GC, Paul A, Alexandrescu S, Marques H, et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma: an international multi-institutional analysis of prognostic factors and lymph node assessment. *J Clin Oncol*. 2011;29(23):3140-5.
 164. Spolverato G, Bagante F, Weiss M, Alexandrescu S, Marques HP, Aldrighetti L, et al. Comparative performances of the 7th and the 8th editions of the American Joint Committee on Cancer staging systems for intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Surg Oncol*. 2017;115(6):696-703.
 165. Hu HJ, Zhou RX, Shrestha A, Tan YQ, Ma WJ, Yang Q, et al. Relationship of tumor size with pathological and prognostic factors for hilar cholangiocarcinoma. *Oncotarget*. 2017;8(62):105011-9.
 166. Jun SY, Sung YN, Lee JH, Park KM, Lee YJ, Hong SM. Validation of the eighth American Joint Committee on Cancer Staging System for Distal Bile Duct Carcinoma. *Cancer Res Treat*. 2018.
 167. Al Mahjoub A, Bouvier V, Menahem B, Bazille C, Fohlen A, Alves A, et al. Epidemiology of intrahepatic, perihilar, and distal cholangiocarcinoma in the French population. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2019.
 168. Xia J, Jiang SC, Peng HJ. Association between Liver Fluke Infection and Hepatobiliary Pathological Changes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2015;10(7):e0132673.
 169. Hai S, Kubo S, Yamamoto S, Uenishi T, Tanaka H, Shuto T, et al. Clinicopathologic characteristics of hepatitis C virus-associated intrahepatic cholangiocarcinoma. *Dig Surg*. 2005;22(6):432-9.
 170. Miros M, Kerlin P, Walker N, Harper J, Lynch S, Strong R. Predicting cholangiocarcinoma in patients with primary sclerosing cholangitis before transplantation. *Gut*. 1991;32(11):1369-73.
 171. Fevery J, Henckaerts L, Van Oirbeek R, Vermeire S, Rutgeerts P, Nevens F, et al. Malignancies and mortality in 200 patients with primary sclerosing cholangitis: a long-term single-centre study. *Liver Int*. 2012;32(2):214-22.
 172. Kaewpitoon N, Kaewpitoon SJ, Pengsaa P, Sripa B. *Opisthorchis viverrini*: the carcinogenic human liver fluke. *World J Gastroenterol*. 2008;14(5):666-74.
 173. Kaewpitoon N, Kaewpitoon SJ, Meererksom T, Chan-Aran S, Sangwalee W, Kujapun J, et al. Detection of Risk Groups for Carcinogenic Liver Fluke Infection by Verbal Screening Questionnaire Using a Mobile Application. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2018;19(7):2013-9.

174. Fillipowicz EA, Xiao S, Sower LE, Weems J, Payne DA. Detection of HCV in bile duct epithelium by laser capture microdissection (LCM). *In Vivo*. 2005;19(4):737-9.
175. Ahn CS, Hwang S, Lee YJ, Kim KH, Moon DB, Ha TY, et al. Prognostic impact of hepatitis B virus infection in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma. *ANZ J Surg*. 2018;88(3):212-7.
176. Kim HJ, Kim JS, Joo MK, Lee BJ, Kim JH, Yeon JE, et al. Hepatolithiasis and intrahepatic cholangiocarcinoma: A review. *World J Gastroenterol*. 2015;21(48):13418-31.
177. Cho MS, Kim SH, Park SW, Lim JH, Choi GH, Park JS, et al. Surgical outcomes and predicting factors of curative resection in patients with hilar cholangiocarcinoma: 10-year single-institution experience. *J Gastrointest Surg*. 2012;16(9):1672-9.
178. Yeh CN, Pang ST, Wu RC, Chen TW, Jan YY, Chen MF. Prognostic value of MUC4 for mass-forming intrahepatic cholangiocarcinoma after hepatectomy. *Oncol Rep*. 2009;21(1):49-56.
179. Yoshikawa D, Ojima H, Iwasaki M, Hiraoka N, Kosuge T, Kasai S, et al. Clinicopathological and prognostic significance of EGFR, VEGF, and HER2 expression in cholangiocarcinoma. *Br J Cancer*. 2008;98(2):418-25.
180. Shafizadeh N, Grenert JP, Sahai V, Kakar S. Epidermal growth factor receptor and HER-2/neu status by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization in adenocarcinomas of the biliary tree and gallbladder. *Hum Pathol*. 2010;41(4):485-92.
181. Galdy S, Lamarca A, McNamara MG, Hubner RA, Cella CA, Fazio N, et al. HER2/HER3 pathway in biliary tract malignancies; systematic review and meta-analysis: a potential therapeutic target? *Cancer Metastasis Rev*. 2017;36(1):141-57.
182. Yang X, Wang W, Wang C, Wang L, Yang M, Qi M, et al. Characterization of EGFR family gene aberrations in cholangiocarcinoma. *Oncol Rep*. 2014;32(2):700-8.
183. Abrahao-Machado LF, Scapulatempo-Neto C. HER2 testing in gastric cancer: An update. *World J Gastroenterol*. 2016;22(19):4619-25.
184. Sasaki M, Sato Y, Nakanuma Y. Cholangiolocellular Carcinoma With "Ductal Plate Malformation" Pattern May Be Characterized by ARID1A Genetic Alterations. *Am J Surg Pathol*. 2019;43(3):352-60.