**Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina**

CINTHYA DOS SANTOS CIRQUEIRA BORGES

***Avaliação da expressão imuno-histoquímica de proteínas
transportadoras biliares em carcinoma hepatocelular e em
colangiocarcinoma***

**São Paulo
2017**

Cinthyia dos Santos Cirqueira Borges

***Avaliação da expressão imuno-histoquímica de proteínas
transportadoras biliares em carcinoma hepatocelular
e em colangiocarcinoma***

Dissertação apresentado à Faculdade de Medicina

da Universidade de São Paulo para obtenção

do título de Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Borges, Cinthya dos Santos Cirqueira
Avaliação da expressão imuno-histoquímica de proteínas transportadoras
bilíares em carcinoma hepatocelular e em colangiocarcinoma / Cinthya dos
Santos Cirqueira Borges. -- São Paulo, 2017.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de
São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientador: Venâncio Avancini Ferreira Alves.

Descritores: 1.Carcinoma hepatocelular 2.Colangiocarcinoma
3.Neoplasias hepáticas 4.Proteínas transportadoras 5.Bile 6.Imuno-
histoquímica

USP/FM/DBD-160/17

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Borges CSC. Avaliação da expressão imuno-histoquímica de proteínas transportadoras biliares em carcinoma hepatocelular e em colangiocarcinoma. [Dissertação] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

***Aos meus pais, João Carlos e Sueli,
às minhas irmãs, Camila e Cássia,
aos meus sobrinhos, Beatriz e João Lucas
e ao meu esposo, Anderson Borges.***

AGRADECIMENTOS

O caminho é único e diferente para cada um, mas ninguém o faz sozinho...

Por isso, agradeço à Vida, a Deus e ao Universo pelas oportunidades e pelos amigos depositados em minha jornada.

Agradeço ao Professor Doutor Venâncio Avancini Ferreira Alves pela orientação neste Mestrado: conduziu-me ao saboroso e não-retornável caminho do conhecimento científico.

Agradeço a inestimável amiga Alda Wakamatsu pelas experiências profissionais e pessoais compartilhadas.

Aos amigos e colegas do LIM 14 e LIM 07, antigos e novos, presentes e que já partiram: Rodrigo Réssio, Paulo Nasser, Camila Ferreira, Melissa Rats, Denise Rodrigues, Julia Pires, Aline Assato, Vera Kim, EriKa Fuji. Foi lá onde tudo começou...

Agradeço aos amigos e colegas do Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz: Cristina Kanamura, Suely Nonogaki, Regina Catarino, Vera Lúcia Dos Santos, Dra. Sílvia Iglezias, Dra. Yara de Menezes, Sonia Pereira, Dra. Roosecelis Martines, Natália Fernandes, Lídia Midori. Alguns conheci durante o curso de aprimoramento profissional, outros mais recentemente, já no exercício da profissão. Em comum: o incentivo para a conclusão deste objetivo.

Ao grupo do ICESP: Aline Ramos, Maiara Vicente, Cristiane Centroni, Marina Pereira, Michele Tomitão, Amanda Aguiar, Dr. Evandro Sobroza de Mello e Dr. Iberê Cauduro Soares. Amigos e colegas que sempre respeitaram e apoiaram minhas escolhas...

Aos membros da Banca Examinadora de Qualificação, Drs. Adhemar Longatto, Mauro Saieg e Durvanei Maria, agradeço pelas preciosas sugestões para a conclusão da pesquisa.

Ao Dr. Aloísio Silva, à senhora Maria Lúcia Correa (LIM14 e DAP-HC), à Juliana Guerra e ao Leonardo Araújo (IAL) que através de pequenos gestos,

breves comentários e dicas preciosas contribuíram muito em momentos importantes do desenvolvimento deste trabalho.

À amiga Claudia Chang, pela amizade construída durante o exercício acadêmico e eternizada para a vida pessoal.

Ao alicerce de minha vida: minha família. Sempre terei infinita gratidão às pessoas - João Carlos, Sueli, Camila, Cássia, Beatriz, João Lucas, Rafael - que absorveram meu sonho para si e através, de carinho, compreensão e incentivo ajudaram-me a concretizar esta conquista.

Ao meu esposo, Anderson Borges, agradeço pelo amor, respeito e paciência nestes belos anos de convivência. É só o começo...

O caminho é único e diferente para cada um, mas ninguém o faz sozinho...

“O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano”

Isaac Newton

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”

Madre Teresa de Calcutá

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Diretrizes para apresentação de dissertações teses da USP. Parte IV (VANCOUVER). Elaborado por Vânia Martins de Oliveira Bueno Funaro, Maria Cláudia Pestana, Maria Cristina Cavarette Dziabas, Eliana Maria Garcia, Maria Fátima dos Santos, Maria Marta Nascimento, Suely Campos Cardoso. 3ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2016.

RESUMO

Borges CSC. Avaliação da expressão imuno-histoquímica de proteínas transportadoras biliares em carcinoma hepatocelular e em colangiocarcinoma [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

A análise das proteínas transportadoras de compostos biliares, antes restrita à fisiologia e à fisiopatologia de colestases, recentemente passou a incluir neoplasias hepato-biliares. O presente estudo teve como objetivo caracterizar a expressão das proteínas ABC de transporte biliar BSEP, MDR3, MRP2 e MRP3 em amostras retrospectivamente coletadas de 80 casos de autópsias de carcinoma hepatocelular (CHC) e 56 casos de ressecção cirúrgica de colangiocarcinoma (CC). Áreas representativas das neoplasias foram organizadas em tissue microarrays e submetidas à pesquisa imuno-histoquímica (IHQ) com o anticorpo policlonal anti-BSEP (HPA019035) e os anticorpos monoclonais anti-BSEP (F6), anti-MDR3 (P3 II-26), anti-MRP2 (M2 III-6) e anti-MRP3 (DTX-1) com amplificação de sinal mediante uso de sistema de polímeros curtos conjugados à peroxidase. A comparação entre a positividade das reações imuno-histoquímicas para cada anticorpo e as variáveis anatomopatológicas foi realizada através dos testes de qui-quadrado de Pearson ou Exato de Fisher. A positividade das reações IHQ cujos anticorpos propiciaram melhor distinção do sinal positivo vs coloração inespecífica de fundo e detecção de casos positivos e/ou melhor capacidade de discriminar as duas neoplasias hepáticas foi comparada com a positividade observada para as reações IHQ com os anticorpos anti-CEA policlonal, anti-Hep-par-1 e anti-Arginase-1. A expressão canalicular de BSEP nos CHC foi observada em 77,3% (58/75) com o anticorpo monoclonal e 75,9% (60/79) com o anticorpo policlonal. Não foi detectada associação significativa da expressão de BSEP em relação ao tamanho, número dos nódulos e grau de diferenciação de CHC, tendo apenas sido significativamente reduzida ($P < 0,05$) tal reação nos casos de padrão arquitetural mais complexo. A reatividade dos CHC para o anticorpo monoclonal anti-BSEP foi aparentemente menor que a obtida com a expressão canalicular de CEA, Hep-par-1 e Arginase-1 no CHC, mas esses valores não atingiram significância estatística. Todos os casos de colangiocarcinoma foram negativos para reações IHQ para pesquisa de BSEP, resultado significativamente diferente ($P = 0,0001$) do obtido com uso do Ac policlonal anti-CEA (padrão circunferencial) e Hep-par-1, não tendo sido demonstrada diferença significativa ($P = 0,222$) da expressão de BSEP e de Arginase-1. A expressão canalicular de MDR3 foi observada em 56,4% (44/78) dos casos de CHC, não tendo sido detectada associação significativa quanto ao tamanho e número de nódulos. Foi observada expressão significativamente menor de MDR3 nos casos de CHC de padrão mais complexo ($P = 0,009$), e nos casos de maior grau histológico ($P = 0,005$). A expressão de MDR3 em CHC foi significativamente menor que a de CEA, Hep-par-1 e Arginase-1 ($P < 0,05$). Todos

os casos de colangiocarcinoma foram negativos para a avaliação da expressão de MDR3, diferindo significativamente em relação a expressão de CEA ($P=0,001$), mas não em comparação a Hep-par-1 e Arginase-1 ($P>0,05$). As reações IHQ para detecção de MRP2 exibiram positividade canalicular em 92,3% dos casos de CHC e em 96,3% nos casos de CC. A detecção da alta expressão de MRP2 no CHC foi constante ($P>0,05$) em comparação ao tamanho, número dos nódulos, padrão arquitetural e grau histológico de diferenciação de CHC assim como, também não apresentou associação ($P>0,05$) com a localização, padrão de crescimento e grau de diferenciação do CC. A reação IHQ para MRP3 resultou positiva em 15/80 casos de CH (18,8%). A reatividade IHQ para MRP foi detectada em 24/54 (44,5%) de CC. Diferente dos transportadores descritos acima, a expressão de MRP3 foi preferencialmente basolateral. A positividade para MRP3 não variou ($P>0,05$) em relação ao número, tamanho dos nódulos, padrão arquitetural (inclusive os sólidos), e grau de diferenciação (inclusive os menos diferenciados). A proteína MRP3 esteve expressa regularmente ($P>0,05$) em todos os casos de CC, apresentando-se reduzida apenas no subtipo histológico ductular ($P=0,023$). Em conclusão, o excelente contraste de reação, a frequência razoavelmente alta de positividade de CHC e a plena negatividade de CC para BSEP levam-nos a recomendar a introdução do anticorpo monoclonal anti-BSEP no painel adotado para o diagnóstico diferencial dessas duas neoplasias. A alta expressão de MRP2 no CHC e no CC é conservada independentemente dos parâmetros anatomopatológicos avaliados. A expressão do transportador MRP3 mostrou variação dentre os subtipos histológicos de CC, aspecto que torna promissoras pesquisas futuras para avaliação mais detalhada da expressão deste marcador nos colangiocarcinomas.

Descritores: carcinoma hepatocelular; colangiocarcinoma; neoplasias hepáticas; proteínas transportadoras; bile; imuno-histoquímica

SUMMARY

Borges CSC. Evaluation of immunohistochemical expression of bile transporter proteins in hepatocellular carcinoma and in cholangiocarcinoma [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

The assessment of biliary transporters, previously restricted to the physiology and pathophysiology of cholestasis, has recently included hepato-biliary neoplasms. The present study aimed to characterize the expression of BSEP, MDR3, MRP2 and MRP3 biliary transport proteins in retrospectively collected samples from 80 cases of autopsy of hepatocellular carcinoma (HCC) and 56 cases of surgical resection of cholangiocarcinoma (CC). Representative areas of the neoplasms were organized into tissue microarrays and submitted to immunohistochemical (IHC) reaction with polyclonal antibody anti-BSEP (HPA019035) and monoclonal antibodies anti-BSEP (F6), MDR3 (P3 II-26), MRP2 (M2 III-6) and MRP3 (DTX-1). Signal amplification was achieved with a short polymer system conjugated to peroxidase. The comparison between the positivity of the immunohistochemical reactions for each antibody and the pathological variables was performed using the Pearson chi-square test or the Fisher's exact test. The performance of antibodies which provided a better distinction of the positive signal vs nonspecific background staining and yield better discrimination between the two hepatic neoplasms was compared with that achieved with the already accepted HCC markers polyclonal anti-CEA, Hep-par-1 and Arginase-1. The canalicular expression of BSEP in HCC was observed in 77.3% (58/75) with the monoclonal antibody and 75.9% (60/79) with the polyclonal antibody. BSEP expression levels were not significantly different according to tumor size, number of nodules and degree of differentiation. The frequency of positive reaction of HCC cases with the monoclonal anti-BSEP was apparently lower than that achieved with the canalicular expression of CEA, Hep-par-1 and Arginase-1, but these values did not reach statistical significance. All cases of cholangiocarcinoma were negative for IHC reactions to BSEP, which was significantly different ($P=0.0001$) from the results obtained with polyclonal anti-CEA (circumferential pattern) and Hep-par-1, but not from the results achieved with Arginase-1 ($P=0.222$). The canalicular expression of MDR3 was observed in 56.4% (44/78) of HCC cases. Among histological variables, only the finding of more complex architecture ($P=0.009$) and higher histological grade ($P=0.005$) of HCC yielded, significantly lower expression of MDR3. The expression of MDR3 in HCC was significantly lower than that of CEA, Hep-par-1 and Arginase-1 ($P<0.05$). All cases of cholangiocarcinoma were negative for the evaluation of MDR3 expression, differing significantly with that achieved with polyclonal anti-CEA ($P=0.001$) but not with that achieved with Hep-par-1 or with Arginase-1 ($P>0.05$). The IHC reactions with the MRP2 antibody exhibited canalicular positivity in 92.3% of HCC cases and 96.3% in CC cases. High expression of MRP2 in HCC was constant ($P>0.05$) despite changes in size, number of nodules, architectural pattern and histological degree of HCC differentiation, as well as no association ($P>0.05$) with the location, pattern of

growth and degree of differentiation of CC. The IHC reaction for MRP3 was positive in 15/80 cases of HCC (18.8%) and in 24/54 (44.5%) of CC. Unlike the carriers described above, the hepatocellular expression of MRP3 was preferentially basolateral. Positivity for MRP3 did not vary ($P>0.05$) in relation to number, nodule size, architectural standard (including solids), and degree of differentiation. The MRP3 protein was expressed regularly ($P>0.05$) in different presentations of CC, but significant lower frequency of positivity was found in the ductular histological subtype ($P=0.023$). In conclusion, the excellent signal-to-noise ratio, reasonably high frequency of HCC positivity and full negativity of CC to BSEP lead us to recommend the introduction of the anti-BSEP monoclonal antibody in the panel adopted for the differential diagnosis of these two neoplasms. The high expression of MRP2 in HCC and in CC is conserved independently of the pathological parameters evaluated herein. The frequency of expression of the MRP3 transporter varied among the histological subtypes of CC, which makes promising future research for a more detailed assessment of the expression of this marker in the cholangiocarcinomas.

Descriptors: carcinoma, hepatocellular; cholangiocarcinoma; liver neoplasms; carrier proteins; bile; immunohistochemistry

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Frequência da reatividade de proteínas transportadoras ABC nos 80 casos de autópsias com carcinoma hepatocelular.....117

Gráfico 2 - Frequência da reatividade de proteínas transportadoras ABC nos 56 casos de colangiocarcinoma.....117

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Regiões diferenciadas da membrana celular do hepatócito.....	32
Figura 2 - Diferenciação da membrana celular do colangiócito.....	34
Figura 3 - Proteínas transportadoras de compostos biliares da circulação entero-hepática	36
Figura 4 - Marcação de lâminas histológicas permanentes de coloração em HE e transferência para as respectivas amostras emblocadas em parafina.....	63
Figura 5 - Principais etapas da confecção do bloco de TMA.	64
Figura 6 - Padrões de expressão de BSEP: (A) linear; (B) linear e puntiforme; (C) linear e acinar; (D) acinar e puntiforme, com expressão linear focal (200X).	81
Figura 7 - Padrões de intensidade e de extensão da marcação para BSEP no fígado não-neoplásico (A) e no carcinoma hepatocelular (B-F): (B) negativo; (C) intensidade 1+ e positividade em até 10% das células (setas); (D) intensidade 2+ e positividade em até 30%; (E) intensidade 3+ e positividade em até 70%; (F) intensidade 4+ e positividade em 80% das células (200X).	82
Figura 8 - Padrões de reatividade imuno-histoquímica para a proteína MDR3 no carcinoma hepatocelular: (A) linear e acinar e (B) linear (200X).	88
Figura 9 - Padrões de imunorreatividade para MRP2 no carcinoma hepatocelular: (A) linear e puntiforme no padrão trabecular e (B) e sólido (200X).	92
Figura 10 - Padrões de definição de intensidade e positividade para MRP3 no fígado não-neoplásico (A) e no carcinoma hepatocelular (B-F): (B) negativo; (C) intensidade 1+ e positividade em até 10% das células; (D) intensidade 2+ e positividade em até 60%; (E) intensidade 3+ e positividade em até 20% (seta); (F) intensidade 4+ e positividade em 30% das células (A-E: 200X; F: 40X).	96
Figura 11 - Reação imuno-histoquímica para BSEP (policlonal e monoclonal): ausência de imunomarcação nas amostras de colangiocarcinoma (A e C, 40X; B e D, 200X).	105

Figura 12 - Reação imuno-histoquímica em amostra de colangiocarcinoma. Ausência de imunorreatividade para o antígeno MDR3 em membrana dos colangiócitos neoplásicos e tumorais (A: 100X; B:400X).	106
Figura 13 - Reação imuno-histoquímica para MRP2 em colangiocarcinoma. Imunorreatividade observada nas faces laterais e lumbais dos colangiócitos de ductos normais e neoplásicos (A e B; 200X).	107
Figura 14 - Intensidade e positividade de imunomarcção para MRP3 no fígado não-neoplásico (A) e em colangiocarcinoma (B-F): (B) negativo; (C) intensidade 1+ e positividade em até 10% das células; (D) intensidade 2+ e positividade em até 60%; (E) intensidade 3+ e positividade em até 80%; (F) intensidade 4+ e positividade em 80% das células (200X).	112
Figura 15 - Expressão de antígenos reconhecidos pelo anticorpo policlonal anti-CEA no carcinoma hepatocelular. Padrão de expressão linear e acinar de intensidade variável na membrana canalicular de hepatócitos neoplásicos nos tipos de padrão arquitetural pseudoglandular (A;200x) e sólido (B;400x).	119
Figura 16 - Expressão de antígenos reconhecidos pelo anticorpo policlonal anti-CEA no colangiocarcinoma. Padrão de expressão de intensidade variável linear na membrana luminal e citoplasma de ductos biliares neoplásicos bem diferenciado (A, 200X) e moderadamente diferenciado (B, 200X).	121
Figura 17 - Reatividade de Hep-par-1 no carcinoma hepatocelular. Aspecto granular citoplasmático de intensidade variável nos tipos de padrão arquitetural trabecular (A;200x) e pseudoglandular (B;400x).	125
Figura 18 - Reatividade de Hep-par-1 no colangiocarcinoma. Aspecto granular de intensidade moderada em células menores, provavelmente progenitoras (A, 200X) e nos colangiócitos neoplásicos bem diferenciados (B, 200X).	127
Figura 19 - Reatividade para Arginase-1 em carcinoma hepatocelular. Padrão citoplasmático e nuclear de intensidade variável no padrão arquitetural macrotrabecular/sólido graus 2 (A: 400X) e 4 (B: 200X).	129
Figura 20 - Reatividade para Arginase-1 em células progenitoras (A, 200X) e em células menores permeando colangiócitos maduros (B, 200X).	131
Figura 21 - Reação imuno-histoquímica para BSEP considerada negativa para o carcinoma hepatocelular. (A) escore 0 observada com uso do anticorpo	

monoclonal F6 e (B) escore 10 com o uso do anticorpo policlonal HPA019035 (400X).	136
---	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Padronização da variáveis da reação imuno-histoquímica relacionadas aos anticorpos do estudo.	66
Tabela 2 - Sumário dos aspectos gerais de identificação em 80 autópsias com carcinoma hepatocelular.	74
Tabela 3 - Sumário dos aspectos anatomopatológicos em 80 autópsias com carcinoma hepatocelular.	76
Tabela 4 - Distribuição da intensidade de expressão canalículo-biliar mediante o uso de diferentes anticorpos nos casos de carcinoma hepatocelular.	78
Tabela 5 - Distribuição da extensão da positividade de expressão canalículo-biliar mediante o uso de diferentes anticorpos nos casos de carcinoma hepatocelular.	78
Tabela 6 - Distribuição do escore (intensidade x extensão da positividade) de expressão canalículo-biliar mediante o uso de diferentes anticorpos nos casos de carcinoma hepatocelular.	79
Tabela 7 - Padrão predominante da expressão de membrana de BSEP com os anticorpos policlonal e monoclonal no carcinoma hepatocelular.	81
Tabela 8 - Distribuição do escore de positividade para BSEP com os anticorpos policlonal e monoclonal no carcinoma hepatocelular.	83
Tabela 9 - Associação do escore de positividade para BSEP e o número de nódulos de carcinoma hepatocelular.	84
Tabela 10 - Associação da reatividade para BSEP e o tamanho dos nódulos de carcinoma hepatocelular.	84
Tabela 11 - Associação da reatividade para BSEP e o padrão arquitetural do carcinoma hepatocelular.	85
Tabela 12 - Associação da reatividade para BSEP e o grau de diferenciação do carcinoma hepatocelular.	86
Tabela 13 - Distribuição do escore de positividade da expressão de MDR3 no carcinoma hepatocelular.	88
Tabela 14 - Associação da reatividade para MDR3 e o número de nódulos dos tumores primários de carcinoma hepatocelular.	89

Tabela 15 - Associação da reatividade para MDR3 e o tamanho dos nódulos de carcinoma hepatocelular.	89
Tabela 16 - Associação da reatividade para MDR3 e o padrão arquitetural do carcinoma hepatocelular.	90
Tabela 17 - Associação do escore de positividade, subdividida em baixa e alta, para MDR3 e o grau de diferenciação do carcinoma hepatocelular.....	91
Tabela 18 - Distribuição do escore de positividade da expressão de MRP2 no carcinoma hepatocelular.	92
Tabela 19 - Associação entre a reatividade para MRP2 e o número de nódulos do carcinoma hepatocelular.	93
Tabela 20 - Associação entre a reatividade para MRP2 e o tamanho dos nódulos do carcinoma hepatocelular.	94
Tabela 21 - Associação entre reatividade para MRP2 e o padrão arquitetural no carcinoma hepatocelular.	94
Tabela 22 - Associação do escore de positividade para MRP2 e o grau de diferenciação do carcinoma hepatocelular.....	95
Tabela 23 - Distribuição do escore de positividade da expressão de MRP3 no carcinoma hepatocelular.	97
Tabela 24 - Associação entre a reatividade para MRP3 e o número de nódulos do carcinoma hepatocelular por caso.	97
Tabela 25 - Associação da reatividade para MRP3 e o tamanho dos nódulos do carcinoma hepatocelular.	98
Tabela 26 - Associação do escore de positividade para MRP3 e o padrão arquitetural do carcinoma hepatocelular.	98
Tabela 27 - Associação entre a reatividade para MRP3 e o grau de diferenciação do carcinoma hepatocelular.	99
Tabela 28 - Sumário dos aspectos anatomopatológicos em 56 casos de colangiocarcinoma.	102
Tabela 29 - Distribuição da intensidade de expressão canalículo-biliar mediante o uso de diferentes anticorpos nos casos de colangiocarcinoma.	103
Tabela 30 - Distribuição da extensão da positividade de expressão canalículo-biliar mediante o uso de diferentes anticorpos nos casos de colangiocarcinoma.	103

Tabela 31 - Distribuição do escore (intensidade x extensão da positividade) de expressão canalículo-biliar mediante o uso de diferentes anticorpos nos casos de colangiocarcinoma.	104
Tabela 32 - Distribuição do escore de positividade da expressão de MRP2 no colangiocarcinoma.	108
Tabela 33 - Associação da reatividade para MRP2 e a topografia do colangiocarcinoma.	108
Tabela 34 - Associação da reatividade para MRP2 e o padrão de crescimento do colangiocarcinoma.	109
Tabela 35 - Associação do escore de positividade para MRP2 e o subtipo histológico do colangiocarcinoma.	110
Tabela 36 - Associação da reatividade para MRP2 e o grau de diferenciação do colangiocarcinoma.	110
Tabela 37 - Distribuição do escore de expressão de MRP3 nos colangiocarcinoma.	112
Tabela 38 - Associação da reatividade para MRP3 e a topografia do colangiocarcinoma.	113
Tabela 39 - Associação entre a reatividade para MRP3 e o padrão de crescimento do colangiocarcinoma.	114
Tabela 40 - Associação entre a reatividade para MRP3 e os subtipos histológicos do colangiocarcinoma.	114
Tabela 41 - Associação do escore dos níveis de positividade (baixo e alto) para MRP3 e os subtipos histológicos do colangiocarcinoma.....	115
Tabela 42 - Associação entre a reatividade para MRP3 e o grau de diferenciação do colangiocarcinoma.	116
Tabela 43 - Associação entre reatividade para epítomos reconhecidos pelo anticorpo anti-CEA policlonal e variáveis anatomopatológicas do carcinoma hepatocelular.....	120
Tabela 44 - Associação do escore de positividade para epítomos canaliculares reconhecidos pelo anticorpo anti-CEA e variáveis anatomopatológicas do colangiocarcinoma.	123

Tabela 45 - Associação entre reatividade para Hep-par-1 e variáveis anatomopatológicas do carcinoma hepatocelular.	126
Tabela 46 - Associação entre a reatividade para Hep-par-1 e variáveis anatomopatológicas do colangiocarcinoma.	128
Tabela 47 - Associação entre a reatividade para Arginase-1 e variáveis anatomopatológicas do carcinoma hepatocelular.	130
Tabela 48 - Associação entre a reatividade para Arginase-1 e variáveis anatomopatológicas do colangiocarcinoma.	132

LISTA DE SIGLAS

ABC:	Superfamília de proteínas Conjunto de ligação ao ATP (do inglês)
ATP:	Adenosina trinucleotídeo fosfato
BRIC2:	Colestase intra-hepática recorrente benigna do tipo 2 (do inglês)
BSA:	Albumina sérica bovina (do inglês)
BSEP:	Bomba de exportação de sais biliares (do inglês)
CAPPesq:	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CC:	Colangiocarcinoma
CHC:	Carcinoma Hepatocelular
COLS	Colaboradores
DAB:	3,3 - Tetrahidrocloreto de diaminobenzidina
DAP:	Departamento de Anatomia Patológica
DMSO:	Dimetilsufóxido
DNA:	Ácido desoxirribonucléico (do inglês)
DP:	Desvio padrão da média
FMUSP:	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HC:	Hospital das Clínicas
HE:	Coloração histológica de Hematoxilina e Eosina
H ₂ O ₂ :	Peróxido de Hidrogênio
iCC:	Colangiocarcinoma intra-hepático
IAL:	Instituto Adolfo Lutz
ICESP:	Instituto do Câncer do Estado de São Paulo
IHQ:	Imuno-histoquímica
kDa:	kiloDalton
LIM-14:	Laboratório de Investigação Médica 14

M:	Unidade de concentração molar
MDR1:	Proteína 1 resistente à múltiplas drogas (do inglês)
MDR3:	Proteína 3 resistente à múltiplas drogas (do inglês)
mRNA:	Ácido ribonucleico mensageiro (do inglês)
MRP2:	Proteína 2 associada à resistência a múltiplas drogas (do inglês)
MRP3:	Proteína 3 associada à resistência a múltiplas drogas (do inglês)
MTA1:	“Manual Tissue Arrayer 1”
µc:	Micrômetro
µM:	Micromolar
mg:	Miligrama
mM:	Milimolar
NaN ₃ :	Azida sódica
°C:	Graus Celsius
P:	Nível de significância estatística
PBS:	Solução salina tamponada com fosfatos (do inglês)
PFIC2:	Colestase intra-hepática familiar progressiva do tipo 2 (do inglês)
PgP:	Glicoproteína P
pH:	Potencial hidrogeniônico
TMA:	Micromatriz tecidual (do inglês)
VS:	versus
VHB:	Vírus da Hepatite B
VHC:	Vírus da Hepatite C

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RESUMO

1 – INTRODUÇÃO.....	28
1.1 - Anatomia, Embriologia e Histologia do Fígado e Vias Biliares.....	29
1.2 - Proteínas transportadoras biliares.....	36
1.2.1 - BSEP - Bomba de Exportação de Sais Biliares.....	38
1.2.2 - Proteína 3 Resistente a Múltiplas Drogas (MDR3)	39
1.2.3 - MRP2 - Proteína 2 associada à resistência a múltiplas drogas.....	40
1.2.4 - MRP3 - Proteína 3 Associada à Resistência a Múltiplas Drogas.....	41
1.3 - Aspectos gerais do carcinoma hepatocelular e do colangiocarcinoma.....	42
1.4 - Aspectos diagnósticos dos adenocarcinomas primários do fígado.....	45
1.4.1 - Aspectos morfológicos.....	45
1.4.1.1 - Carcinoma hepatocelular.....	45
1.4.1.2 - Colangiocarcinoma.....	47
1.4.2 - Aspectos moleculares.....	48

1.4.3 - Evidências preliminares de detecção de transportadores biliares em neoplasias hepáticas.....	53
2 – OBJETIVOS.....	56
2.1 - Objetivo geral.....	57
2.2 - Objetivos específicos.....	57
3 – CASUÍSTICA E MÉTODO.....	58
3.1 - Amostras.....	59
3.2 - Avaliação das variáveis anatomopatológicas.....	60
3.2.1 - Carcinoma hepatocelular.....	60
3.2.2 - Colangiocarcinoma.....	61
3.3 - Técnica histológica convencional.....	61
3.4 - Tissue microarray (TMA)	62
3.5 - Ensaio imuno-histoquímico.....	65
3.5.1 - Anticorpos primários.....	65
3.5.2 - Reações Imuno-histoquímicas.....	66
3.5.3 - Controles positivos e negativos.....	68
3.5.4 - Registro das fotomicrografias.....	69
3.6 - Avaliação da reatividade imuno-histoquímica.....	69
3.6.1 - Intensidade.....	69
3.6.2 - Estimativa da porcentagem de células positivas.....	70
3.6.3 - Sistema de Pontuação e Definição de Positividade.....	70

3.6.4 - Padrão de expressão imuno-histoquímica de BSEP.....	71
3.6.5 - Avaliação do desempenho dos marcadores.....	71
3.6.6 - Avaliação da positividade e as variáveis anatomopatológicas.....	72
3.7 - Avaliação estatística.....	72
3.8 - Ética em Pesquisa.....	72
4 – RESULTADOS.....	73
4.1 - Carcinoma hepatocelular.....	74
4.1.1 - Aspectos gerais de identificação dos pacientes.....	74
4.1.2 - Aspectos anatomopatológicos.....	75
4.1.3 - Distribuição do padrão de reatividade imuno-histoquímica das proteínas transportadoras biliares.....	77
4.1.3.1 - BSEP - Bomba de Exportação de Ácidos Biliares.....	80
4.1.3.1.2 - Associação da reatividade para BSEP com variáveis anatomopatológicas.....	83
4.1.3.2 - MDR3 - Proteína 3 Resistente a Múltiplas Drogas.....	87
4.1.3.2.2 - Associação da reatividade para MDR3 com variáveis anatomopatológicas.....	89
4.1.3.3 - MRP2 - Proteína 2 Associada à Resistência a Múltiplas Drogas.....	91
4.1.3.3.1 - Associação da reatividade para MRP2 com variáveis anatomopatológicas.....	93
4.1.3.4 - MRP3 - Proteína 3 Associada à Resistência à Múltiplas Drogas.....	95
4.1.3.4.1 - Associação da reatividade para MRP3 com variáveis anatomopatológicas.....	97

4.2 - Colangiocarcinoma.....	100
4.2.1 - Aspectos gerais de identificação dos pacientes.....	100
4.2.2 - Aspectos anatomopatológicos.....	100
4.2.3 - Distribuição do padrão de reatividade imuno-histoquímica das proteínas transportadoras biliares.....	103
4.2.3.1 - BSEP - Bomba de Exportação de Ácidos Biliares.....	105
4.2.3.2 - MDR3 - Proteína 3 Resistente a Múltiplas Drogas.....	106
4.2.3.3 - MRP2 - Proteína 2 Associada à Resistência a Múltiplas Drogas.....	107
4.2.3.3.1 - Associação da reatividade para MRP2 com variáveis anatomopatológicas.....	108
4.2.3.4 - MRP3 - Proteína 3 Associada à Resistência à Múltiplas Drogas.....	111
4.2.3.4.1 - Associação da reatividade para MRP3 com variáveis anatomopatológicas.....	113
4.2.3.5 - Comparação da reatividade imuno-histoquímica para os diversos transportadores biliares no CHC e no CC.....	116
4.3 - Outros marcadores diagnósticos de neoplasia hepática.....	118
4.3.1 - CEA - Antígeno carcinoembriônico (anticorpo policlonal A0115)	118
4.3.2 - Antígeno Específico do Hepatócito - Hep-par-1.....	124
4.3.4 - Arginase - 1.....	129
4.4 - Comparação do desempenho dos anticorpos anti-transportadores biliares BSEP e MDR3 com o de outros marcadores diagnósticos de neoplasia hepática.....	133
4.4.1 - Anti-BSEP policlonal e Anti-BSEP monoclonal	134

4.4.2 - Anti-BSEP monoclonal e Anti- MDR3.....	136
4.4.3 - Anti-BSEP monoclonal e anti-CEA policlonal.....	137
4.4.4 - Anti-BSEP monoclonal e anti-Hep-par-1.....	138
4.4.5 - Anti-BSEP monoclonal e anti-Arginase-1.....	139
4.4.6 - Anti- MDR3 e Anti-CEA policlonal.....	140
4.4.7 - Anti- MDR3 e anti-Hep-par-1.....	141
4.4.8 - Anti-MDR3 e anti-Arginase-1.....	142
5 – DISCUSSÃO.....	144
5.1 - BSEP - Bomba de Exportação de Ácidos Biliares.....	145
5.2 - MDR3 - Proteína 3 Resistente a Múltiplas Drogas.....	152
5.3 - MRP2 - Proteína 2 Associada à Resistência a Múltiplas Drogas.....	153
5.4 - MRP3 - Proteína 3 Associada à Resistência à Múltiplas Drogas.....	156
6 – CONCLUSÕES.....	159
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	162
ANEXOS.....	180
Anexo A - Avaliação anatomopatológica dos 80 casos de autópsia de carcinoma hepatocelular.....	181
Anexo B - Avaliação anatomopatológica dos 56 casos de colangiocarcinoma.....	182
APÊNDICE.....	183
Apêndice A – Avaliação (maior valor do escore) das reações imuno-histoquímicas com os anticorpos BSEP (monoclonal e policlonal), MDR3, MRP2, MRP3, CEA	

policlonal, Hep-Par-1 e Arginase-1 nos 80 casos de autópsia de carcinoma hepatocelular.....184

Apêndice B – Avaliação (maior valor do escore) das reações imuno-histoquímicas com os anticorpos BSEP (monoclonal e policlonal), MDR3, MRP2, MRP3, CEA policlonal, Hep-Par-1 e Arginase-1 nos 56 casos de colangiocarcinoma.....185

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Anatomia, Embriologia e Histologia do Fígado e Vias Biliares

O fígado é a maior glândula do corpo humano.⁽¹⁾ Pesando entre 1400 a 1600g, corresponde em média, a 2,5% do peso total de um adulto. Está localizado na cavidade abdominal, ocupando as regiões do hipocôndrio direito, epigástrico e pequena porção do hipocôndrio esquerdo. Mantém assim, contato com o diafragma, estômago, duodeno, intestino grosso, vesícula biliar, glândula suprarrenal e rim direito.^(2,3)

Sob o ponto de vista anátomo-morfológico, o fígado possui o formato de uma cunha com a superfície lisa e vermelho-acastanhada. Ela é dividida em duas faces (diafragmática e visceral) e limitada por duas bordas (anterior e posterior). O órgão é revestido pelo peritônio e pela Cápsula de Glisson, que lhe confere fixação e resistência. Possui quatro lobos (direito, esquerdo, caudado e quadrado) que são divididos pelos ligamentos falciforme, coronário e triangular.⁽⁴⁾

É um órgão altamente vascularizado e recebe suprimento sanguíneo de origem dupla. Cerca de 75% do sangue procedente do trato intestinal e baço chegam até o fígado pela veia porta e, um volume menor (25%) vem do coração pelas artérias hepáticas direita e esquerda. Após percorrer todo o órgão, através de ramificações vasculares, o sangue contendo os elementos processados pelas unidades funcionais do fígado é recolhido pelas veias centrolobulares e deixa o órgão através de ramificações que formam as veias hepáticas direita e esquerda conduzindo o seu conteúdo na veia cava inferior.⁽¹⁾

No hilo hepático encontra-se a porta hepatis, região onde se localizam a veia porta e a artéria hepática que conduzem o sangue para o interior do fígado e do qual saem os ductos biliares. Estes conduzem a bile para a vesícula biliar onde é armazenada e liberada para o duodeno de forma intermitente para emulsificação lipídica com consequente facilitação da absorção intestinal.⁽¹⁾

Embriologicamente, o fígado surge como um divertículo evaginado a partir da linhagem endodérmica do intestino anterior durante a 3ª e 4ª semana de gestação. Nos embriões de 5 mm, ele se diferencia na porção cranial (pars hepática) e porção caudal (pars cystic).^(3,5)

As células da pars hepática organizam-se em ácinos e cordões que crescem ao redor da rede capilar desenvolvida dentro do septo transversal formando os primitivos sinusóides.⁽⁵⁾

As células mesenquimais derivadas do septo transversal recobrem a cápsula e também dispõem entre a parede do endotélio dos sinusóides e dos cordões hepáticos para formar os elementos estromais do fígado (tecido fibroso, hematopoiético e células de Kupffer).⁽³⁾

Concomitantemente, as células da pars cystica desenvolvem-se nos primórdios da vesícula biliar, ducto cístico e ducto biliar comum a partir do estreitamento da conexão entre o intestino anterior (duodeno) e o divertículo hepático. Inicialmente, os ductos extra-hepáticos são obstruídos por células epiteliais, que posteriormente, degeneram-se causando a vacuolização dos ductos.⁽⁵⁾

Estudos, através de técnicas imuno-histoquímicas, reforçam a teoria de que os ductos intra-hepáticos se originam de células hepatocitárias precursoras (hepatoblastos) que se transformam em células ductais biliares.^(6,7) Elas se alinham ao redor dos ramos da veia porta para constituir uma única camada circular denominada placa ductal a qual gradualmente desenvolve-se para formar o sistema anastomosante de ductos biliares no trato portal.^(3,5,8) Os canalículos biliares crescem a partir de embriões de 10 mm entre os hepatócitos imaturos.⁽³⁾

No desenvolvimento do sistema biliar humano, portanto, a origem dos ductos intra-hepáticos difere da origem dos ductos-extra-hepáticos.⁽⁷⁾ Atualmente, estudos demonstram que, enquanto a linhagem celular de colangiócitos da árvore biliar intra-hepática é derivada dos hepatoblastos

(também precursoras dos hepatócitos), os colangiócitos da árvore biliar extra-hepática são derivados de células endodérmicas e compartilham uma origem comum com pâncreas e duodeno.⁽⁹⁾

Do ponto de vista estrutural, o fígado está organizado em lóbulos hexagonais clássicos nos quais centralmente localizam-se as veias centrais e perifericamente as veias portais. Do ponto de vista metabólico, o órgão está organizado em áreas triangulares denominadas ácinos de Rappaport, cujas nas extremidades da base estão as ramificações da artéria hepática e da veia porta e, no ápice a ramificação da veia central. A entrada do fluxo sanguíneo pelas áreas portais e periportais configuram diferentes regiões do ácino (zonas 1, 2 e 3) em relação à oxigenação, à maior quantidade de enzimas presentes, e à capacidade de regeneração.^(1,3,4)

A tríade portal é constituída de ramos da artéria hepática, da veia hepática e do ducto biliar nas regiões angulares do lóbulo hepático denominadas de espaço-porta. Nestas regiões também podem ser observados vasos linfáticos, cujo fluxo assim como o biliar é oposto ao sanguíneo e, pequenas quantidades de linfócitos, histiócitos e mastócitos.⁽⁴⁾

Os hepatócitos estão organizados em trabéculas, placas parenquimatosas de monocamadas no indivíduo adulto. São células polarizadas poligonais, de tamanho variando de 20 a 30um, com núcleos redondos, centralizados e diplóides. O citoplasma é abundante, eosinofílico e granuloso, rico em retículo endoplasmático rugoso, que pode conter mínimas quantidades de ferro e raros corpos apoptóticos. Possuem a membrana celular bem diferenciada em duas faces: a basolateral e apical. Estes dois domínios possuem diferentes funções, composições químicas, moleculares e antigênicas.⁽³⁾

A face basolateral, apresentando as regiões sinusoidal, lateral e juncional, corresponde a 75% da extensão da membrana celular⁽⁴⁾ e separa as placas de hepatócitos por espaços denominados sinusóides que contêm as células de revestimento sinusoidal. As microvilosidades dos hepatócitos facilitam as trocas

de material entre a célula e o plasma nos espaços perissinusoidais (espaço de Disse) que estão em contato com os sinusóides por onde flui o sangue arterial e venoso portal. ⁽³⁾ Nos sinusóides também estão presentes as células macrofágicas de Kupffer responsáveis pela fagocitose de 99% das bactérias e remoção de restos celulares e eritrócitos mortos do sangue venoso.⁽¹⁾

A face apical do hepatócito (apresentando a região canalicular) representa 25% da extensão da membrana.⁽³⁾ A aposição de porções de membranas plasmáticas de hepatócitos vizinhos forma espaços intercelulares complexos, com aproximadamente 1µm de diâmetro, denominados canálculos biliares que contêm microvilos e microfilamentos envolvidos no fluxo biliar⁽⁴⁾ (Figura 1). Os canálculos se anastomosam e quando alcançam a periferia do lóbulo se fundem para constituírem colangiólos (dúctulos) que conduzirão a bile a partir dos canais de Hering para túbulos cada vez maiores até os ductos hepáticos esquerdo e direito do sistema de ductos biliares intra-hepático.^(1,5)

Figura 1- Regiões diferenciadas da membrana celular do hepatócito.

Fonte: Fraile, 2014 ⁽¹⁰⁾ (Modificado).

Em relação ao sistema biliar, os ductos biliares são divididos anatomicamente e fisiologicamente em intra-hepáticos e extra-hepáticos.

Os ductos biliares intra-hepáticos são classificados quanto ao diâmetro em dúctulos ($<15\mu\text{m}$), ductos interlobulares ($15\text{-}100\mu\text{m}$), ductos septais ($100\mu\text{m}\text{-}300\mu\text{m}$), áreas ductais ($300\mu\text{m}\text{-}400\mu\text{m}$), ductos segmentais ($400\mu\text{m}\text{-}800\mu\text{m}$) e ductos hepáticos ($>800\mu\text{m}$). E os ductos biliares extra-hepáticos são constituídos pelo ducto hepático comum, ducto cístico, vesícula biliar ducto colédoco e ducto biliar comum.⁽¹¹⁾

Os colangiócitos dos ductos biliares menores são achatados e cubóides (com alinhamento circunferencial de 4 a 5 células) e se tornam progressivamente maiores e colunares nos ductos biliares mais largos (formado por até 40 colangiócitos).⁽⁹⁾

Estruturalmente, os colangiócitos possuem uma membrana plasmática polarizada dividida em apical (luminal) e basolateral. A membrana das células contém microvilosidades, junções ocludentes e comunicantes que permitem o aumento da superfície celular, a união e comunicação entre as células respectivamente. A relação núcleo-citoplasma é maior nos colangiócitos menores e menos especializados e, menor nos colangiócitos maiores, nos quais há abundância de organelas citoplasmáticas e presença de um cílio primário que atua como sensor químico e mecânico no interior do lúmen ductular (Figura 2).⁽¹¹⁾

Figura 2 - Diferenciação da membrana celular do colangiócito.

Fonte: Concepción, 2013⁽¹²⁾ (Modificado).

Do ponto de vista fisiológico, aproximadamente 1450 ml de sangue fluem por minuto para o interior do fígado representando 29% do débito cardíaco total em repouso. Isto permite ao fígado desempenhar inúmeras funções que podem ser agrupadas em vasculares para armazenamento, metabólicas e secretoras e excretoras.⁽¹³⁾

O fígado atua como reservatório de sangue quando há volume sanguíneo em excesso. Atua ativamente no metabolismo de carboidratos armazenando glicogênio e promove a gliconeogênese para a manutenção de níveis normais de glicemia.⁽¹³⁾

Além disso, realiza funções específicas no metabolismo de lipídios que incluem formação de lipoproteínas e síntese de grandes quantidades de colesterol e fosfolipídios, além da conversão de carboidratos e proteínas em gordura. Quanto ao metabolismo proteico, o fígado desempenha dentre algumas funções, a desaminação dos aminoácidos, a formação da ureia para a remoção da amônia dos líquidos corpóreos (ciclo da ureia) e a formação de 90% de todas as proteínas plasmáticas, incluindo todas as proteínas não-essenciais.⁽¹⁾

O fígado também tem propensão para armazenar vitaminas A, D, E, K (lipossolúveis, principalmente nas células de Ito presentes nos espaços perissinusoidais) B12, ácido fólico e ferro (sob a forma de apoferritina).^(1,13,14)

Imunologicamente, através das células de Kupffer, o fígado participa na remoção de microrganismos e eritrócitos senescentes. Além disso, realiza a degradação de hormônios e desintoxicação de drogas e toxinas como barbitúricos e antibióticos através de processos de oxidação, mutilação, acetilação e conjugação.^(1,14)

A principal função do fígado relacionada ao trato digestório é a formação e secreção da bile, líquido denso, variavelmente viscoso, composto, principalmente por água, sais biliares, bilirrubina glicuronada, fosfolipídios, lecitina, colesterol, eletrólitos plasmáticos e IgA. A bile possui funções essenciais: emulsificação de grandes partículas gordurosas que facilitam a atuação das lipases pancreáticas, transporte e absorção de produtos terminais da gordura digerida através da mucosa intestinal. Também atua como única via de excreção de vários solutos não excretados pela urina (parcialmente insolúveis em água) como a bilirrubina, excesso de colesterol e xenobióticos.^(3,13)

Em geral, os compostos formadores da bile são captados por hepatócitos através da corrente sanguínea, entrando pela membrana da face sinusoidal dos hepatócitos. No interior das células, o transporte para os canalículos se dá por meio de vesículas contendo os ácidos associados a proteínas biliares.

Em seguida, após fluir periféricamente pelos septos interlobulares (ductos intra-hepáticos), a bile é conduzida por dutos continuamente maiores até alcançar o duto hepático e o duto colédoco (sistema extra-hepático) pelo qual deságua diretamente no duodeno ou é desviada pelo duto cístico para a vesícula biliar.⁽¹⁾

Grande parte dos sais biliares é absorvida pelo intestino delgado (principalmente, de forma ativa pelo íleo), chegando ao fígado pela circulação portal. Ela é endocitada pelos hepatócitos e transportada para os canalículos

biliares e, em seguida, retorna ao duodeno no intestino delgado. Esta recirculação dos sais biliares é conhecida como circulação entero-hepática e permite a reutilização de cerca de 95% dos sais biliares, sendo o restante excretado pelas fezes.^(1,15) A perda de uma fração pequena (0,5g) é compensada pela *síntese de novo* dos sais biliares a partir do colesterol.⁽¹⁶⁾

Neste contexto, a função do hepatócito é secretar a bile para o interior do canalículo enquanto o colangiócito modifica a bile captada através da absorção de água e eletrólitos antes do momento de enviar a bile ao intestino delgado.⁽¹⁷⁾

A manutenção da homeostase da circulação entero-hepática é essencial, pois ela está intrinsicamente envolvida em vários processos fisiológicos.^(15,18,19)

1.2 - Proteínas transportadoras biliares

Figura 3 - Proteínas transportadoras de compostos biliares da circulação entero-hepática

Fonte: Roma, 2008⁽²⁰⁾; Thomas, 2008⁽²²⁾; Hylemon, et al, 2009⁽²¹⁾ (Modificado)

Em condições fisiológicas, o transporte de ácidos biliares para o interior dos hepatócitos é comandado por proteínas presentes na membrana basolateral da célula.⁽¹⁵⁾

O efluxo dos sais biliares pela membrana basolateral do hepatócito não é comum e normalmente ocorre em baixos níveis, entretanto, pode ser induzido sob condições de colestase⁽²³⁾ na tentativa de compensar, em parte, o desequilíbrio na via de secreção pelo canal biliar.⁽²⁴⁾

O transporte de compostos endógenos (que incluem ácidos biliares) no interior dos hepatócitos ainda não é bem compreendido, mas possivelmente se dá por difusão de componentes hidrofílicos ou por vesículas contendo componentes hidrofóbicos.⁽²³⁾

A transferência desses compostos para o interior dos canálculos biliares ocorre através do auxílio de proteínas transportadoras especializadas localizadas na membrana apical. Em mamíferos, estas proteínas pertencem, à superfamília ABC (ATP Binding Cassette – Conjunto de ligação ao ATP) que utilizam a hidrólise de moléculas de ATP para promover alterações conformacionais nestes transportadores e assim permitir a passagem dos componentes pela membrana. (Figura 3).^(25–29)

Estruturalmente, as proteínas deste grupo possuem, basicamente, 4 domínios: dois domínios de ligação ao nucleotídeo e dois domínios transmembrânicos. Os domínios de ligação ao nucleotídeo irão ligar e hidrolisar o ATP enquanto os domínios transmembrânicos que possuem muitas fitas de α —hélice reconhecerão o substrato e promoverão seu deslocamento através da membrana celular.⁽³⁰⁾

Em elegante revisão, Vasiliou e cols relataram a existência de 49 proteínas transportadoras da superfamília ABC, divididas em 7 subfamílias: ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF e ABCG. ⁽³⁰⁾ Doze transportadores já foram melhor estudados em alterações da homeostase e doenças humanas.^(26,28)

No presente estudo, procurou-se avaliar algumas das principais proteínas transportadoras responsáveis pela extrusão de compostos endógenos e exógenos: *Bomba de Exportação de Sais Biliares (BSEP)*, *Proteína 3 Resistente a Múltiplas Drogas (MDR3)*, *MRP-2 - Proteína 2 associada à resistência a múltiplas drogas* e *Proteína 3 associada à Resistência às Drogas (MRP-3)*.

1.2.1 - BSEP - Bomba de Exportação de Sais Biliares

Na membrana canalicular dos hepatócitos, a principal proteína humana transportadora de sais biliares é a BSEP (Bomba de Exportação de Sais Biliares). Ela possui 70% de homologia sequencial com o primeiro transportador identificado relacionado ao fenômeno de resistência a multidrogas, P-gp (MDR1).⁽³¹⁾

BSEP é um polipeptídeo transmembrânico de 1321 aminoácidos e massa molecular de aproximadamente 160 kDa.⁽³²⁾

É o décimo primeiro membro caracterizado da subfamília ABCB e codificado pelo gene ABCB11 localizado no cromossomo 2 (2q24-31).⁽³³⁾ A presença de níveis de ácido ribonucleico mensageiro é detectada desde o período fetal e com expressão crescente até a vida adulta.⁽³⁴⁾

Está unicamente presente no fígado e é responsável pelo transporte de ácidos biliares conjugados monovalentes, possuindo alta afinidade pelos compostos taurocolato, glicolato, tauroquenodeoxicolato e tauroursodeoxicolato.^(15,35–39)

O transporte de ácidos biliares por BSEP é o principal determinante da formação e fluxo da bile. A expressão desta proteína é regulada em diferentes níveis (transcrição gênica e processos pós-transcricionais). Os sais biliares funcionam como ligantes para o Receptor Farnesóide X (RFX, ou Receptor de

Ácido Biliar, RAB). E, ao unir-se com o Receptor Retinóide X forma um heterodímero e migra para o núcleo sinalizando a necessidade de transcrição de BSEP. A proteína transportadora também pode ser regulada por fosforilação e recuperação endocítica.⁽⁴⁰⁾

Mutações do gene ABCB11 estão estritamente relacionadas ao subtipo de colestase intra-hepática familiar do tipo 2 (PFIC-2), caracterizada pela ausência da proteína na membrana canalicular e baixa concentração de sais biliares ou mesmo caracterizada por fenótipos intermediários como a colestase intra-hepática benigna recorrente (BRIC-2), a colestase intra-hepática gestacional (ICP) e a colestase medicamentosa.^(15,16,23,41,42)

1.2.2 - Proteína 3 Resistente a Múltiplas Drogas (MDR3)

A Proteína 3 Resistente a múltiplas drogas (MDR3) é expressa na membrana apical de hepatócitos normais, contudo, níveis mínimos de RNA mensageiro são detectados em órgãos do sistema gastrointestinal, urinário, tegumentar, imunológico e sanguíneo, além de presentes na glândula adrenal, testículos e coração.⁽⁴³⁾

A proteína MDR3 possui 1279 aminoácidos. Classificada como o quarto membro da subfamília ABCB (MDR), é codificada pelo gene humano ABCB4, localizado no cromossomo 7 (7q21).⁽⁴⁴⁾

O transportador MDR3 é responsável pela excreção de fosfolipídios para o interior do canalículo biliar.^(23,45,46) O fosfolipídio biliar, então, formará micelas complexas contendo sais biliares e colesterol que reduzirão o efeito citotóxico dos sais biliares na membrana das células da árvore biliar.⁽⁴⁷⁾

Alterações mutacionais no gene ABCB4 em crianças estão relacionadas a colestase intra-hepática familiar progressiva do tipo 3 (PFIC-3). Em adultos, a

literatura associa diversas doenças hepáticas como cirrose biliar ductopênica, colestase intra-hepática gestacional e colestase induzida por drogas.⁽⁴⁸⁾

Recentes estudos também procuram avaliar a relação da inflamação crônica biliar e replicação constante (turnover) de colangiócitos provocada pela litogenicidade e cristalização do colesterol com o aumento da suscetibilidade ao desenvolvimento do colangiocarcinoma.⁽⁴⁹⁻⁵²⁾

1.2.3 - MRP2 - Proteína 2 associada à resistência a múltiplas drogas

A Proteína 2 Associada à Resistência a Múltiplas Drogas (MRP2) é um transportador multiespecífico de ânions orgânicos (c-MOAT) expresso predominantemente na membrana do canalículo biliar de hepatócitos, de células epiteliais da vesícula biliar e da membrana apical dos túbulos proximais de rins humanos normais, de carcinoma de células claras renais e células da barreira hemato-encefálica.^(23,35,53) Há também registro da expressão variada na membrana e citoplasma de células humanas do trato gastrointestinal.⁽⁵⁴⁾

O transportador possui 1545 aminoácidos e peso molecular de 190 kDa.⁽⁵⁵⁾ É a segunda proteína identificada da subfamília de treze elementos ABCC (MRP/CFTR) e codificada pelo gene ABCC2 localizado no cromossomo humano 10 (10q24).^(56,57)

MRP2 é responsável pela excreção de ampla variedade de ânions orgânicos bivalentes relacionados ao metabolismo da bilirrubina, como conjugados com glutatonas, glucoronatos e sulfatos. Também possui afinidade para transportar leucotrienos, conjugados de sais biliares e do metabolismo do estradiol.^(23,35,53)

Durante o transporte de conjugados de glutatona, este transportador pode também exportar xenobióticos lipofílicos neutros ou catiônicos que estão

relacionados à resistência terapêutica como drogas, carcinógenos e toxinas, principalmente quando há presença da superexpressão do gene.⁽⁵³⁾

Atualmente, estão identificadas mais de 20 mutações hereditárias do gene MRP2 que resultam na ausência da proteína funcionalmente ativa e conduzem à síndrome de Dubin-Johnson caracterizada por uma moderada hiperbilirrubinemia conjugada crônica.^(58,59)

1.2.4 - MRP3 - Proteína 3 Associada à Resistência a Múltiplas Drogas

Colangiócitos de ductos biliares intra-hepáticos grandes e médios possuem várias moléculas transportadoras na membrana plasmática capazes de absorver a bile primária que foi exportada no canal biliar pelos hepatócitos.⁽²³⁾ A mistura rica em bicarbonato absorvida é então liberada no interior de plexos capilares intraductais através de transportadores ativos presentes na membrana basolateral dos colangiócitos.⁽⁶⁰⁾

A Proteína 3 Associada a Resistência a Múltiplas Drogas (MRP3) está presente, em condições fisiológicas, na membrana basolateral dos hepatócitos e colangiócitos, células da vesícula biliar e do ducto pancreático, além de presente na glândula suprarrenal, rim, placenta, estômago e cólon.^(34,61-63)

A proteína pertence à subfamília ABCC (MRP/CFTR) e é constituída de 1527 aminoácidos e com peso molecular de aproximadamente 170 kDa. Ela é codificada pelo gene ABCC3 localizado no cromossomo 17 (17q21).⁽⁶⁴⁾

Sua principal função está relacionada ao transporte de compostos orgânicos e sais biliares conjugados bivalentes (glicuronados e sulfatados) nos hepatócitos e enterócitos. Além disso, dados da literatura científica demonstram que, sob condições colestáticas, MRP3 pode atuar como alternativa de extrusão dos compostos biliares através da membrana basolateral de hepatócitos na

Síndrome de Dubin-Johnson na qual há a diminuição ou completa ausência de expressão de MRP2.^(59,65–67)

Apesar de possuir baixa afinidade por ânions anfipáticos e por isso, características limitadas relacionadas à resistência a fármacos, ^(37,68) MRP3 demonstra estar relacionado ao fenômeno de resistência ao metotrexato, vincristina, teniposídeo e ectoposídeo.^(61,69)

A regulação da expressão de MRP3, como para BSEP é realizada pelo Receptor Farnesóide X e através de mecanismos semelhantes pelo Receptor Pregnano X.⁽⁷⁰⁾

1.3 – Aspectos gerais do carcinoma hepatocelular e do colangiocarcinoma

As neoplasias do fígado compõem um grupo de doenças responsáveis por alta mortalidade, com irregular distribuição geográfica. O carcinoma hepatocelular (CHC) é a neoplasia maligna primária do fígado mais comum entre os adultos , enquanto o colangiocarcinoma contabiliza apenas cerca de 3% de todas as neoplasias gastrointestinais.⁽³⁾

O carcinoma hepatocelular é diagnosticado em mais de 500 mil novos casos por ano no mundo. Sua taxa de incidência varia geograficamente de acordo com a prevalência de diferentes fatores de risco para algumas doenças relacionadas.⁽⁷¹⁾ Possui altas taxas de incidência em regiões endêmicas do vírus da hepatite B (VHB) como no sudeste da Ásia e sul da África e, na América do Norte, sul da Europa e Japão onde houve grande quantidade de indivíduos infectados pelo vírus da hepatite C (VHC) entre os anos de 1920 a 1970.⁽⁷²⁾ Na América Latina, a incidência de CHC é crescente, predizendo um aumento nas taxas de morbidade e mortalidade.⁽⁷¹⁾ No Brasil, a Bahia e o Espírito Santo os estados que apresentam maior incidência da neoplasia.⁽⁷³⁾

Além da forte associação entre a presença dos vírus das hepatites B e C, outros fatores de risco estão relacionados à incidência do CHC. A presença de cirrose alcoólica, doença hepática gordurosa não-alcoólica, ingestão de aflatoxina em alimentos contaminados, presença de hemocromatose hereditária, hepatite autoimune, doença de Wilson, diabetes e deficiência de alfa-antitripsina também contribuem com maior ou menor relevância para o CHC.^(3,71,72,74)

A cirrose está presente em 80% dos pacientes com CHC, predominantemente em homens e com pico de desenvolvimento aos 70 anos.^(72,75)

Carrilho e colaboradores⁽⁷⁶⁾ desenvolveram um trabalho de atualização dos dados epidemiológicos brasileiros para o CHC. Eles demonstraram que 98% dos pacientes incluídos no estudo apresentavam fígado cirrótico e mais da metade (54%) eram portadores do vírus da hepatite C. Estes dados sugerem, como em vários países, uma possível relação no aumento na incidência do tumor e as crescentes taxas de prevalência da infecção por VHC.

O colangiocarcinoma (CC) é uma neoplasia relativamente pouco frequente, mas de alta agressividade, podendo acometer qualquer região do epitélio da árvore biliar. São classificados em três tipos que diferem quanto à localização, epidemiologia, origem, etiologia, patogênese e tratamento. Apresenta mediana de sobrevida de 24 meses para os pacientes após o diagnóstico. Apenas a ressecção cirúrgica curativa para os casos com estadiamento pré-operatório precoce se mostra como a melhor opção.⁽⁷⁷⁾

O colangiocarcinoma intra-hepático (CCI) é um tumor originário do epitélio dos ductos biliares que surge no interior do fígado, sendo bem menos frequente do que o CHC. Compreende 10 a 20% dos tumores primários do fígado ⁽³⁾ e possui incidência maior no sexo masculino (1: 1,2 - 1,5), a partir dos 50 anos de idade.⁽⁷²⁾ O prognóstico costuma ser ruim e com taxas de incidência e mortalidade iguais a sua detecção.

Semelhantemente ao CHC, as taxas de incidência do CC diferem bastante globalmente. Por exemplo, a Tailândia apresenta alta taxa de incidência de CC (113 homens/100 mil habitantes) enquanto na Austrália, a taxa é bem pequena (0.2 homens/100 mil habitantes). Entretanto, Cardinale e colaboradores⁽⁷⁸⁾ alertam para um aumento crescente mundial na incidência e mortalidade para o CC intra-hepático associado à infecção pelo vírus da hepatite C.

Os fatores de riscos sistematizados para o desenvolvimento do colangiocarcinoma indicam o predomínio da colangite esclerosante primária no ocidente e hepatolítase e a infecção por parasitas (*Opisthorchis viverrini* e *Clonorchis sinensis*) no sudoeste asiático.⁽⁷⁹⁾ Fatores potencialmente relacionados incluem doença inflamatória do intestino, infecção pelos vírus das hepatites B e C, cirrose, diabetes, obesidade, álcool, tabagismo e presença de polimorfismos genéticos.^(80,81)

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, o colangiocarcinoma perihilar (CCP) (anteriormente, identificado como tumor de Klatskin) define-se como uma neoplasia que se desenvolve na confluência dos ductos biliares hepáticos esquerdo e direito ou próximo à sua junção (hilo hepático). É separado do CCI pelos ductos de segunda ordem e constituem os colangiocarcinomas mais comuns, correspondendo a 80-90% dos casos. Desenvolvem-se, frequentemente, na ausência de fatores de riscos e, quando presentes, podem ser associados a condições que levam a processos inflamatórios nos ductos biliares.⁽⁸¹⁻⁸³⁾

O colangiocarcinoma distal (CCD) desenvolve-se ao longo do ducto biliar comum entre o ducto cístico e a ampola de Vater (porém bem distinto dos carcinomas ampulares) e separado do CCP na inserção do ducto císticos. Clinicamente assemelha-se aos adenocarcinomas pancreáticos, mas fisiopatologicamente são distintos.⁽⁸²⁾ Pacientes com colangite esclerosante primária apresentam o risco aumentado em 1500x de desenvolver CCD.⁽⁸⁴⁾

1.4 – Aspectos diagnósticos dos adenocarcinomas primários do fígado

1.4.1 - Aspectos morfológicos

Macroscopicamente, o CHC e o CC causam aumento do volume do fígado e podem apresentar massa tumoral unifocal, nódulos multifocais ou um tumor difusamente infiltrativo.⁽³⁾

1.4.1.1 - Carcinoma hepatocelular

A Classificação de Eggel, conforme revista por Ishak e colaboradores⁽⁸⁵⁾, é ainda hoje bastante utilizada e adequada para lesões avançadas. Identifica 3 padrões distintos: nodular (um ou mais nódulos típicos), maciço (massa tumoral única, dominante e irregular) e difuso (pequenos e múltiplos nódulos indistintos).

Microscopicamente, o CHC é bastante heterogêneo e quase não apresenta estroma. Frequentemente (50% dos tumores) a bile é vista nos espaços canaliculares ou no lúmen e entre as células tumorais e os canálculos⁽³⁾. As células tumorais podem se assemelhar a células hepáticas normais, porém menores, dispostas em trabéculas ou ácinos. O citoplasma é poligonal, granular e eosinofílico com graus crescentes de basofilia relacionados ao aumento da malignidade. O núcleo é hipercromático, e pode apresentar diferentes tamanhos.⁽⁸⁶⁾ Os CHC podem variar de lesões bem diferenciadas (origem hepatocitária reconhecida) às injúrias indiferenciadas e completamente anaplásicas, distinguindo-se os principais padrões arquiteturais: trabecular, acinar (pseudoglangular), compacto (sólido/macrotrabecular). As variantes histológicas principais são: células claras, esquirroso e sarcomatóide, além da variante fibrolamelar que apresenta aspectos clínicos e prognósticos distintos.⁽³⁾

A Classificação de Edmondson e Steiner⁽⁸⁷⁾ para a avaliação do grau de diferenciação do CHC é amplamente utilizada, identificando 4 níveis crescentes de indiferenciação (anaplasia).

O Grau I corresponde a tumores bem diferenciados e com trabeculação mais delicada, além do aumento da relação núcleo/citoplasma. O Grau II reconhece uma diferenciação moderada e a manutenção da estrutura trabecular, embora com crescimento médio e aparecimento de arranjos pseudoglandulares das traves hepáticas. A relação núcleo/citoplasma é semelhante ao do hepatócito normal com a presença de nucléolos evidentes. Aumento da atipia nuclear, presença de células gigantes com o espessamento das trabéculas tornando o aspecto do tumor pouco diferenciado e mais sólido caracterizam o Grau III. O CHC indiferenciado corresponde ao Grau IV. Neste nível há dificuldade de reconhecer a linhagem hepatocitária da neoplasia de padrão sólido e presença de células pouco coesas e bizarras.^(87,88)

A disseminação do CHC se dá pelo próprio crescimento do tumor e pelo desenvolvimento de nódulos satélites. A via hematogênica é o principal meio de metastatização, com ênfase para o interior da veia porta.^(3,89)

Os CHCs, quando crescem intra-ductalmente, podem produzir sintomas clínicos como a icterícia obstrutiva e conduzir a um diagnóstico equivocado de colangiocarcinoma cujo prognóstico é menos otimista do que o CHC intra-hepático.⁽⁹⁰⁾

Além disso, alguns carcinomas hepatocelulares lembram hepatócitos ou produzem bile identificável. Entretanto, formações pseudoglandulares com células claras alteradas e pobre diferenciação podem dificultar o diagnóstico preciso. Entre os tumores que precisam ser diferenciados estão colangiocarcinomas que podem ser mimetizados pela variante esclerosante do carcinoma hepatocelular.⁽⁹¹⁾

1.4.1.2 – Colangiocarcinoma

O diagnóstico do colangiocarcinoma também envolve a análise de diferentes exames laboratoriais, radiológicos, endoscópicos e histopatológicos.

Do ponto de vista morfológico, o colangiocarcinoma é fortemente desmoplásico, com estroma colagenoso, denso, organizado em túbulos e glândulas cribriformes ou eventualmente em arranjos papilares.⁽³⁾ As células tumorais do CC se assemelham ao epitélio de ductos biliares e os tumores bem diferenciados (mais frequentes) apresentam células cuboidais a colunares com razoável quantidade de grânulos claros. O citoplasma é eosinofílico e o núcleo pequeno e menos proeminente.^(3,86)

Em relação ao padrão de crescimento, o colangiocarcinoma intra-hepático pode ser subclassificado em formador de massa, periductal infiltrativo, intraductal e uma variação contendo elementos dos dois primeiros, sendo que o padrão formador de massa associado ao periductal infiltrativo possui maior probabilidade de recorrência após ressecção cirúrgica.^(92,93) Histologicamente, Nakanuma e colaboradores⁽⁹⁴⁾ sugerem 4 subgrupos: ductal, ductular, intraductal e variantes raras.

Os colangiocarcinoma ocorrem com maior frequência em fígados não-cirróticos diferentemente dos tumores CHC.⁽⁹⁵⁾ Compostos mucinosos podem estar presentes dentro das células ou no lúmen, mas sem bile. O tumor pode crescer ao redor dos sinusóides e espalhar pelo fígado através dos vasos sanguíneos e linfáticos.^(3,86)

O padrão de crescimento do colangiocarcinoma perihilar mais comum é o periductal infiltrativo e como não demonstram lesão tumoral em massa, o diagnóstico por imagem é dificultado e a biópsia percutânea não é recomendada pelo alto risco de disseminação do tumor. Histologicamente apresenta-se como um tumor moderado a bem diferenciado, com abundante estroma fibroso e

produtor de mucina.⁽⁸⁶⁾ A citologia convencional (apesar de baixa sensibilidade) e a hibridização in situ fluorescente são as técnicas mais utilizadas para o diagnóstico.⁽⁸²⁾

À semelhança macroscópica do CCP, as lesões em massa são menos frequentes no colangiocarcinoma distal. Lesões precursoras compreendem as neoplasias papilíferas intraductais (produtora de mucina) e intraepiteliais biliares. O diagnóstico é baseado na presença de citologia positiva e detecção de polissomia pela hibridização in situ fluorescente.⁽⁷⁷⁾

1.4.2 - Aspectos moleculares

O desenvolvimento de ampla variedade de anticorpos, principalmente os monoclonais, de técnicas de recuperação antigênica e sistemas de detecção mais sensíveis contribuíram significativamente para a evolução da imuno-histoquímica.⁽⁹⁶⁾ Ela pode ser utilizada em diferentes situações nas pesquisas no diagnóstico patológico como: a elucidação do tecido de origem de uma neoplasia indiferenciada; a determinação do órgão de origem de uma neoplasia diferenciada; a pesquisa de fatores prognósticos, terapêuticos e índices proliferativos de algumas neoplasias; a detecção de células metastáticas e a identificação de estruturas, organismos e materiais secretados pelas células.⁽⁹⁷⁾

A correlação clínico-histopatológica é sempre obrigatória e decisiva para a conclusão diagnóstica. E, o perfil imuno-histoquímico da lesão hepática pode ser importante para o diagnóstico final quando os aspectos histopatológicos não são suficientes para distinguir, por exemplo, lesões nodulares benignas de reações hepatocitária, CHC bem diferenciados de lesões nodulares hepatocelulares benignas, CHC pouco diferenciados de CC e carcinomas metastáticos ou para a determinação da linhagem celular de tumores malignos ou sítios primários de neoplasias indiferenciadas.⁽⁹⁸⁾

Há décadas, diversos estudos procuram estabelecer um perfil imuno-histoquímico útil para o diagnóstico diferencial entre tumores primários (principalmente carcinoma hepatocelular e colangiocarcinoma intra-hepático) e tumores metastáticos do fígado.^(99–102)

Marcadores de células epiteliais como as citoqueratinas são amplamente utilizados para demonstrar as condições do sistema biliar intra-hepático em um contexto neoplásico. Citoqueratinas (CK) são proteínas pertencentes ao grupo dos filamentos intermediários e estão presentes no citoesqueleto celular da ampla maioria das células epiteliais. Durante a transformação e o desenvolvimento tumoral o padrão de especificidade do filamento intermediário permanece conservado. Desta forma, elas podem auxiliar na identificação e classificação do tumor, principalmente os carcinomas indiferenciados.^(103,104) E assim, o diagnóstico diferencial entre o carcinoma hepatocelular e o colangiocarcinoma pode ser auxiliado através de reações imuno-histoquímicas para estas proteínas.

Citoqueratinas de baixo peso molecular (exemplo: CAM 5.2) são bastante expressas no carcinoma hepatocelular celular enquanto, a maioria dos colangiocarcinomas e carcinomas metastáticos expressam citoqueratinas de alto peso molecular como a AE1.⁽¹⁰⁵⁾

Tradicionalmente, os anticorpos CD10 e CEA continuam sendo os marcadores imuno-histoquímicos bastante presentes dentro de um painel diagnóstico que auxilie a diferenciação entre CHC, CC e adenocarcinomas metastáticos. Principalmente quando estes tumores apresentam um grau de indiferenciação elevado ou quando a amostra é proveniente de biópsia por agulha.

A metaloproteinase de superfície celular CD10 (neprilisina ou CALLA – antígeno comum da leucemia linfoblástica aguda) é uma endopeptidase dependente de zinco que está expressa também em tecidos hepáticos normais e neoplásicos. Este marcador costuma ser utilizado para diferenciar CHC de outros tumores porque apresenta um padrão canalicular que é específico para CHC e tecidos hepáticos não-neoplásicos. É raramente detectada em adenocarcinomas

metastáticos e totalmente negativo em colangiocarcinomas. Apesar de possuir alta especificidade para CHC, Al-Munhannadi⁽¹⁰⁶⁾ e colaboradores alertam para a baixa sensibilidade (47,8%) deste marcador ressaltando a sua utilidade limitada.^(102,107)

Em 1965, Gold e Freedman, publicaram os primeiros dados sobre o antígeno carcinoembriônico (CEA). Esta molécula é uma glicoproteína amplamente utilizada como marcador epitelial de diagnóstico e prognóstico clínico de tumores do trato gastrointestinal⁽¹⁰⁸⁾ que está presente em diversos tipos de tecidos normais e neoplásicos.⁽¹⁰⁹⁾ O anticorpo policlonal para esta proteína reage cruzadamente com a glicoproteína biliar (BGP-1) presente no canalículo biliar e epitélio ductal. Em CHC bem diferenciados, a expressão de CEA apresenta um característico padrão canalicular considerado patognomônico para o diagnóstico diferencial com o colangiocarcinomas e os adenocarcinomas metastáticos que apresentam padrão citoplasmático difuso.^(105,110)

Embora, dados da literatura relatem que a sensibilidade para este marcador esteja entre 60 e 90% dos CHC's, outros trabalhos mencionam que a negatividade para pesquisa IHQ com CEA policlonal pode chegar a 50% dos casos observados não excluindo, desta forma, o diagnóstico de CHC, principalmente nos casos mais indiferenciados.^(98,106,111,112) Além disso, Morrison e colaboradores⁽¹¹³⁾ ressaltam que a marcação muito intensa do canalículo pode mimetizar um padrão imunorreativo de membrana, enquanto a coloração fraca ou luminal glândulas degeneradas de CC e adenocarcinomas metastáticos mais indiferenciados pode ser confundida com padrão canalicular.

Um painel de anticorpos marcadores de citoqueratinas frequentemente utilizado para buscar a origem do tumor primário é a tríade CK7, CK19 e CK20. CHC são geralmente negativos para estes marcadores (exceção da variante fibrolamelar, que expressa abundante citoqueratina 7) sendo contrário o perfil apresentado pelo colangiocarcinoma.⁽¹¹¹⁾ As citoqueratinas 7 e 19 são marcadores biliares e, entretanto, regiões de CC com diferenciação hepatocelular podem ser

expressá-las, sugerindo que este tumor seja derivado da transformação neoplásica de células progenitoras.^(114,115)

Arginase-1, Glipican-3 e Hep-Par-1 são atuais marcadores diagnósticos mais promissores em colaborar para a diferenciação de tumores hepáticos, como carcinomas hepatocelulares, colangiocarcinomas e adenocarcinomas metastáticos⁽¹¹⁶⁾, principalmente em amostras provenientes de biópsias por agulha fina.^(117,118)

Arginase-1 é uma metaloenzima que catalisa a hidrólise do aminoácido L-arginina em L-ornitina e ureia.⁽¹¹⁹⁾ A isoforma 1 está presente no citoplasma dos hepatócitos normais e neoplásicos humanos, estando indiretamente associada ao crescimento, proliferação tumoral e a mecanismo de escape ao sistema imune.⁽¹²⁰⁾

A detecção de Arginase-1 demonstrou sensibilidade de 96% e especificidade 99,6% para CHC e, portanto, sendo atualmente considerado um dos marcadores mais sensíveis para o diagnóstico de neoplasias epiteliais pouco diferenciadas no fígado.⁽¹²¹⁾ Alguns autores, entretanto, relataram detecção imuno-histoquímica da Arginase-1 em metástases hepáticas de origem pancreática e, em 50% dos colangiocarcinoma intra-hepáticos (do subtipo formador de massa), devendo ser analisado com cautela no diagnóstico diferencial entre estes tumores e o CHC pouco diferenciado.^(122,123)

Glipican-3 é um membro da família das proteoglicanas ancorado à superfície da célula e relacionado possivelmente ao controle da proliferação, crescimento e migração celular. Está presente em menor grau em alguns tumores (melanoma, carcinoma ovariano de células claras, tumores do saco vitelino, neuroblastoma, hepatoblastoma, tumor de Wilms e outros), mas no CHC pode ser encontrado em grandes concentrações no soro e altamente expresso no tumor, de padrão variável de imunocoloração (de membrana, citoplasmático e canalicular) no qual está relacionado a um pobre prognóstico.^(124,125)

A pesquisa IHQ de Glipican-3 é negativa no colangiocarcinoma, em tumores benignos e em tecidos não neoplásicos, podendo ser mais útil no

diagnóstico como marcador precoce da hepatocarcinogênese. Contudo, Glipican-3 pode ser negativo em alguns CHC bem diferenciados.^(126,127)

Hep Par-1 é um que reage com um antígeno presente na membrana mitocondrial dos hepatócitos adultos e fetais e de células neoplásicas de contexto hepatocitário. contendo epitopo resistente a fixação em formol e inclusão em parafina marcado pelo anticorpo monoclonal OCH1E5 , identificado à imuno-histoquímica por apresentar padrão granular intenso e distinto no citoplasma.⁽¹²⁸⁾

Chan e Yeh⁽¹²⁹⁾ revisaram diversos trabalhos e concluíram que este anticorpo apresenta alta sensibilidade (entre 86% e 96%) para a detecção do CHC. Entretanto, Hep-Par-1 mostrou ser menos sensível para a variante esclerosante e para CHC menos diferenciados (graus 3 e 4).^(130,131) Além disso, alguns estudos relatam níveis de especificidade não muito alto, marcando alguns casos de colangiocarcinoma, carcinoma neuroendócrino e em vários casos (40%) de adenocarcinoma gástrico.⁽¹³²⁾, neoplasias muito frequentemente apresentadas como metástases no fígado.⁽¹²⁹⁾

Os marcadores mencionados possuem características relativamente adequadas que, atualmente, permitem distinguir os tumores primários e secundários do fígado, e por isso são utilizados em conjunto entre si e com outros anticorpos, formando painéis bastante úteis na diferenciação dos tumores hepáticos fixados em formol e incluídos em parafina. Entretanto, a sensibilidade e especificidade destes marcadores podem ser influenciadas por muitas variáveis como, por exemplo, apresentarem diferentes concentrações nos tecidos (neoplásicos ou não), não serem capazes de detectar seus respectivos antígenos (epitopos) em todas as situações ou de reagirem de forma cruzada com outras proteínas.

Assim, cada vez mais, são necessários pesquisa, desenvolvimento e aplicação de novos marcadores mais confiáveis que permitam contribuir significativamente para o diagnóstico imuno-histoquímico de neoplasias menos diferenciados ou para suas variantes mimetizantes.

1.4.3 – Evidências preliminares de detecção de transportadores biliares em neoplasias hepáticas

A partir do conhecimento da fisiologia biliar e da fisiopatologia das colestases surgiram evidências (através da análise de expressão gênica e proteica) da associação das proteínas transportadoras hepatobiliares à hepatocarcinogênese.

Halilbasic e colaboradores⁽³⁷⁾ revisaram estudos experimentais que mostraram a associação de ácidos biliares e estímulos inflamatórios no desenvolvimento do carcinoma hepatocelular em ratos com ausência do gene receptor farnesóide X ou do gene Mrd2 (ABCC4/MDR3 em humanos), verificando que o tratamento destes animais com colestiramina reduziu os efeitos inflamatórios e consequentemente a frequência do CHC.

Outro aspecto relevante são os relatos de evidências clínicas de que a deficiência grave de BSEP pode aumentar o risco de desenvolvimento do carcinoma hepatocelular^(133,134) e do colangiocarcinoma.⁽³²⁾

As proteínas hepáticas transportadoras estão também relacionadas diretamente à resposta ao tratamento dos tumores do fígado. A terapêutica adotada para o carcinoma hepatocelular é limitada pela resistência à quimioterapia, a qual é relacionada às Proteínas Resistentes a Multidrogas (MDR's e MRP's) porque a capacidade de excretar o quimioterápico depende da expressão destas proteínas.⁽¹³⁵⁾ Recentemente, Tomonari e colaboradores⁽¹³⁶⁾ comprovaram que linhagens celulares de CHC resistentes ao inibidor de tiroquinase Sorafenib utilizado para o tratamento de CHC avançados exibem superexpressão do transportador MRP3.

Em relação ao tratamento dos pacientes com colangiocarcinomas, não foi detectada a expressão de MRP2 nas amostras avaliadas. Desta forma, o resultado sugerido pelos pesquisadores pode indicar que o mecanismo de

resistência aos quimioterápicos é independente da expressão desta proteína. Entretanto, a superexpressão observada da proteína MRP-3 pode estar relacionada diretamente ao grau histológico e a resposta ao tratamento.⁽⁶⁹⁾

Em relação ao diagnóstico do CHC, para obter mais informações que possam auxiliar a diferenciação entre o adenoma hepatocelular, hiperplasia nodular focal e carcinoma hepatocelular moderadamente ou bem diferenciado, Borgh et colaboradores⁽¹³⁷⁾ analisaram a expressão proteica por imuno-histoquímica e por reação da polimerase em cadeia em tempo real de alguns transportadores canaliculares. Eles demonstraram que os CHC's não cirróticos perdem praticamente toda a expressão de MDR1, MDR3 e BSEP, contrastando com a manutenção da positividade no adenoma e na hiperplasia. Tal evidência preliminar pode sugerir a utilidade de estudos clínico-patológicos adicionais na tentativa de validar a aplicação destes marcadores no diagnóstico diferencial entre estas entidades em amostras de biópsias hepáticas.

Lagana e colaboradores⁽¹³⁸⁾, (2015) sugeriram a inclusão do anticorpo anti-BSEP no painel imuno-histoquímico na prática diagnóstica de neoplasias malignas acometendo o fígado. A expressão de BSEP foi investigada em CHC, CC e neoplasias metastáticas no fígado. Os resultados indicaram que a sensibilidade alcançou 90% (ligeiramente inferior à obtida com a arginase-1) enquanto a especificidade para CHC foi de 100% (superior à obtida com a arginase-1), além de excluir a necessidade de interpretação do padrão de expressão, diferentemente da exigência analítica das reações imuno-histoquímicas com o anticorpo policlonal anti-CEA.⁽¹³⁸⁾

De outra parte, Nguyen e cols, também em 2015⁽¹³⁹⁾, aplicando BSEP em um painel de marcadores imuno-histoquímicos para avaliação diagnóstica de CHC, demonstraram que Hep-Par-1 e Arginase-1 foram mais sensíveis para o diagnóstico do carcinoma hepatocelular bem e pouco diferenciados, respectivamente. Diferentemente do relatado por Lagana e cols⁽¹³⁸⁾, Nguyen e cols⁽¹³⁹⁾ consideram que a inclusão de BSEP na avaliação não contribuiu para o diagnóstico de CHC pouco diferenciados.⁽¹³⁹⁾ Tal divergência nesses resultados

preliminares demonstra a necessidade de estudos mais detalhados quanto ao perfil de imuno-expressão das proteínas transportadoras biliares em neoplasias hepáticas.

Fujikura e colaboradores, 2016 avaliando a expressão combinada de BSEP e MDR3 em carcinomas hepatocelulares, colangiocarcinomas intra-hepáticos e carcinomas hepatóides, relataram que, embora a sensibilidade dos dois marcadores fora considerada ligeiramente inferior a Arginase-1, a especificidade apresentou-se marcadamente superior, reforçando a alta especificidade de BSEP e MDR3 para o CHC.⁽¹⁴⁰⁾

Como vimos, mesmo nos dias atuais, o diagnóstico diferencial entre as duas grandes linhas de neoplasias malignas epiteliais do fígado e de vias biliares ainda mostra aspectos a ser explorados, especialmente nas formas histologicamente menos diferenciadas. Os resultados promissores, ainda que incipientes, relacionados à pesquisa de expressão proteica de transportadores de ácidos biliares em tumores hepáticos tornam necessários estudos adicionais para ampliar a caracterização da expressão destas proteínas, sobretudo nas neoplasias malignas primárias mais frequentes do fígado.

2 - OBJETIVOS

2.1 – Objetivo geral

Caracterizar a expressão imuno-histoquímica de proteínas de transporte biliar no carcinoma hepatocelular e no colangiocarcinoma com intuito de contribuir para o diagnóstico diferencial em diversas apresentações destas neoplasias, com ênfase às formas menos diferenciadas desses dois principais padrões de adenocarcinomas primários do fígado.

2.2 – Objetivos específicos

1 - Caracterizar a frequência e os padrões de expressão imuno-histoquímica das proteínas de transporte biliar BSEP, MDR3, MRP2 e MRP3 em amostras de carcinoma hepatocelular e de colangiocarcinoma, pesquisando eventuais diferenças nos padrões de marcação para as duas neoplasias.

2 - Relacionar a frequência da positividade imuno-histoquímica observada com os parâmetros anatomopatológicos relacionados ao número e tamanho dos nódulos, padrão arquitetural predominante e grau de diferenciação do carcinoma hepatocelular

3 - Relacionar a frequência dos padrões de expressão imuno-histoquímica observados com parâmetros anatomopatológicos relacionados à localização, padrão macroscópico de crescimento, subtipo histológico e grau de diferenciação do colangiocarcinoma

4 – Comparar a positividade de reações imuno-histoquímicas com anticorpos de transporte canalículo-biliar de melhor desempenho e os anticorpos anti-CEA policlonal, anti-Hep-par-1 e anti-Arginase-1 em casos de carcinoma hepatocelular e colangiocarcinoma

3 - CASUÍSTICA E MÉTODO

3.1 - Amostras

O universo do presente estudo é centrado no conjunto de:

- a) 80 casos sequenciais de autópsia de carcinoma hepatocelular avançado de pacientes atendidos no HC-FMUSP entre 2003 e 2009.

Critérios de inclusão:

- Pacientes adultos (18 anos ou mais) com CHC presente à autópsia como tumores únicos ou múltiplos, seja no fígado original como tumor primário e/ou recidiva; ou em fígado transplantado como recidiva; ou em outros órgãos como metástase à distância;
- Representação histológica suficiente e disponível (pelo menos um fragmento da necropsia disponível em bloco de parafina)

Critérios de exclusão:

- Ausência de neoplasia remanescente à autópsia (tumor primário previamente ressecado ou submetido a transplante); tumores hepáticos secundários (metástases extra-hepáticas de outras neoplasias), colangiocarcinomas, tumores mistos ou outras neoplasias primárias do fígado
- Amostras necróticas (por tratamento prévio ou não), com áreas viáveis insuficientes ou com artefatos de autólise ou fixação

Esta casuística foi submetida anteriormente à pesquisa de expressão de EGFR e outros marcadores imuno-histoquímicos pelo médico patologista Aloísio Souza Felipe da Silva, em sua tese de Doutorado⁽¹⁴¹⁾ defendida no Departamento de Patologia da FMUSP em 2013, sob orientação do Prof. Venancio A F Alves. Naquele trabalho, Dr. Aloísio S. F. Silva realizou as revisões histopatológicas nos carcinomas hepatocelulares utilizadas para o presente estudo.

- b) 56 casos sequenciais de colangiocarcinoma de pacientes atendidos no HC-FMUSP entre 1992 e 2011.

Critérios de inclusão:

- Colangiocarcinoma confirmado pela reavaliação diagnóstica

Critérios de exclusão:

- Histórico de adenocarcinoma no fígado com evidências de tumor em outros órgãos
- Presença de componente histológico clássico de carcinoma hepatocelular
- Representação histológica insuficiente (ausência de fragmento neoplásico em bloco de parafina para realização do exame imuno-histoquímico)

Esta casuística foi anteriormente submetida à pesquisa de expressão de mucinas relacionadas à topografia do colangiocarcinoma apresentada no XXVIII International Congress of the Academy of Pathology (São Paulo, Brazil) em 2010⁽¹⁴²⁾ pelos médicos patologistas Eziel Cavalcanti Rocha e Lidiane Vieira Marins, orientados pelo Dr. Evandro Sobroza de Mello, que realizaram as revisões histopatológicas nos colangiocarcinomas utilizadas para o presente estudo.

3.2 - Avaliação das variáveis anatomopatológicas

3.2.1 - Carcinoma hepatocelular

As variáveis anatomopatológicas de CHC consideradas para este estudo foram:

- a) Número de nódulos: um, dois, três, 4 ou múltiplos

- b) Tamanho da maior lesão (em centímetros)
- c) Grau histológico: I a IV de Edmondson-Steiner
- d) Variantes histológicas: células claras, esquirroso ou sarcomatóide
- e) Padrão arquitetural predominante: trabecular, acinar/pseudoglandular, sólido/macrotrabecular ou misto
- f) Cirrose (associação ou não com fígado neoplásico)

3.2.2 – Colangiocarcinoma

As variáveis anatomopatológicas de CC consideradas para este estudo foram:

- a) Topografia (intra-hepático, hilar e extra-hepático)
- b) Tamanho do tumor (em centímetros)
- c) Padrão macroscópico (formador de massa, infiltrativo periductal e intraductal)
- d) Subtipo histológico (ductal, ductular com malformação de placa e ductular de células intermediárias)
- e) Grau de diferenciação (bem diferenciado, moderadamente, pouco diferenciado e indiferenciado)

3.3 - Técnica histológica convencional

A partir dos blocos de parafina, foram obtidos novos cortes histológicos de 3um de espessura e submetidos à coloração de Hematoxilina-Eosina (HE), conforme descrição a seguir:

- Desparafinização em xilol à 60°C e em temperatura ambiente por 10 minutos cada;
- Alcoolização em 3 passagens de etanol absoluto;
- Hidratação em passagens de álcool 95% e álcool 80%;
- Hidratação em água corrente e água destilada;
- Coloração em solução de Hematoxilina de Harris por 3 minutos;
- Lavagem em água corrente e destilada;
- Alcalinização para “azulamento” com passagem em hidróxido de amônio 0,5%;
- Lavagem em água corrente e destilada;
- Alcoolização em passagens de álcool 50%, álcool 80% e álcool 95%;
- Coloração em solução de Eosina amarela por 2 minutos;
- Desidratação em passagens em álcool 95% e absoluto;
- Diafanização em 4 passagens de xilol
- Montagem da lâmina permanente com meio de montagem sintético Entellan (Merck, 1.07961, Alemanha).

3.4 - Tissue microarray (TMA)

As lâminas permanentes de HE foram utilizadas para a seleção de áreas representativas dos tumores primários.

Estas foram marcadas, pelos médicos patologistas já citados, com pontos através de caneta hidrográfica de tinta não-lavável. As lâminas foram pareadas com

seus respectivos blocos e a marcação foi então transferida para as amostras (figura 4).

Figura 4 - *Marcação de lâminas histológicas permanentes de coloração em HE e transferência para as respectivas amostras emblocadas em parafina.*

Fonte: LIM14 – HC/FMUSP

Após a seleção das amostras e a determinação da quantidade de áreas de interesses de cada bloco, foi elaborada uma planilha-mapa, baseada no sistema cartesiano de coordenadas de linhas e colunas, para orientação da exata posição de cada cilindro de amostra no novo bloco de parafina.

Sob metodologia descrita por Konnonen e colaboradores (1998)⁽¹⁴³⁾ e utilização de equipamento MTA 1 (Manual Tissue Arrayer, Beecher Instruments, EUA) disponível no LIM-14 – HC/ FMUSP, transferiu-se cilindros de amostras, através de agulhas de 1mm de diâmetro, dos blocos previamente marcados para um único bloco de parafina receptor obedecendo a sequência determinada pela planilha-mapa e espaçamento de 0,3mm (figura 5).

Figura 5 - Principais etapas da confecção do bloco de TMA.

Fonte: LIM14 – HC/FMUSP

No total, foram construídos, pela própria pós-graduanda, 4 blocos de TMA de amostras de carcinoma hepatocelular (sendo, 2 blocos de reserva) e dois blocos de TMA de amostras de colangiocarcinoma (1 de reserva).

Para cada bloco de TMA foi realizada sessão única de microtomia, na qual foram obtidos, em média, 50 a 70 cortes histológicos. Estes foram coletados em lâminas silanizadas que foram embebidas em parafina e mantidas congeladas a temperatura de -20°C para preservação da antigenicidade (DiVito et al, 2004)⁽¹⁴⁴⁾.

Previamente, as lâminas de número 11, 26 e 41 foram coradas em HE para avaliação de intervalos de cortes contendo o maior número de amostras representativas de cada tumor e nas quais foram selecionadas para a realização das reações imuno-histoquímicas.

3.5 - Ensaios imuno-histoquímicos

3.5.1 - Anticorpos primários

As reações imuno-histoquímicas foram realizadas pela pós-graduanda no LIM14 - Patologia Hepática – FMUSP e no Laboratório de Imuno-histoquímica do Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz.

A padronização das condições ideais de ensaio para cada anticorpo primário utilizado no estudo procurou avaliar as melhores combinações das variáveis envolvidas como título dos anticorpos primários, recuperação antigênica e sistema de detecção.

O pré-tratamento dos tecidos parafinizados foi realizado em solução de ácido cítrico (pH6) ou de Tris-EDTA (pH9). Os anticorpos primários comerciais foram produzidos em camundongo (monoclonal) ou coelho (policlonal) e a detecção da ligação antígeno-anticorpo foi realizada através do kit comercial Sistema de Detecção de Polímero Novolink Novocastra (Leica Biosystems, Newcastle, UK, código do produto RE-7260-CE). Os detalhes das condições padronizadas são expostos na Tabela 1.

Tabela 1 - Padronização da variáveis da reação imuno-histoquímica relacionadas aos anticorpos do estudo.

Antígeno (SIGLA)	Anticorpo	Fabricante	Código	Título	Recuperação Antigênica
Bomba de Exportação de Sais Biliares (BSEP)	Policlonal	Sigma-Aldrich	HPA 019035	4000	Panela a vapor; pH6
Bomba de Exportação de Sais Biliares (BSEP)	Monoclonal F6	Santa Cruz	Sc-74500	400	Panela a vapor; pH6
Proteína 3 de Resistência a Múltiplas Drogas (MDR3)	Monoclonal P3II-26	Alexis Biochemicals	ALX-801-028	1200	Panela a vapor; pH 9
Proteína 2 Associada À Resistencia a Múltiplas Drogas (MRP2)	Monoclonal M2 III-6	Abcam	Ab3373	600	Panela a vapor; pH 9
Proteína 3 Associada À Resistencia a Múltiplas Drogas (MRP3)	Monoclonal DTX1	Abcam	AB49479	400	Panela a vapor; pH 9
Antígeno Carcinoembrionário (CEA)	Policlonal	Agilent (Dako)	A0115	100.000	Panela a vapor; pH6
Antígeno Específico do Hepatócito (Hep-par1)	Monoclonal OCH1E5	Biocare	CM166C	400	Panela a vapor; pH6
Arginase-1	Policlonal	Sigma-Aldrich	HPA 003595	1000	Panela a vapor; pH6

3.5.2 – Reações Imuno-histoquímicas

As reações imuno-histoquímicas foram procedidas conforme protocolo padronizado. Os cortes histológicos das lâminas selecionadas foram submetidos a:

- Desparafinização em xilol a 60°C e temperatura ambiente por 20 minutos cada;

- Alcoolização em 3 passagens de etanol absoluto por 30 segundos cada;
- Hidratação em passagens de álcool 95% e álcool 80% por 30 segundos cada;
- Hidratação em água corrente e água destilada;
- Recuperação Antigênica através da incubação em solução de ácido cítrico 10 mM (Merck, Alemanha) pH6 ou solução de Tris-EDTA 1Mm (Merck, Alemanha) em panela a vapor a 90°C por 40 minutos e temperatura ambiente por 20 minutos.
- Hidratação em água corrente e água destilada;
- Bloqueio da atividade da peroxidase endógena através da incubação em solução volume a volume de peróxido de hidrogênio a 6% e metanol a 37°C por 30 minutos.
- Hidratação em água corrente e água destilada;
- Lavagem com solução salina tamponada com fosfatos mono e diidratados (PBS) (Merck, Alemanha) 10 mM em pH 7,4 por 10 minutos;
- Incubação com o respectivo anticorpo primário diluído em solução tampão PBS 10 mM contendo albumina bovina sérica a 1% (BSA - Sigma-Aldrich, A9647, EUA) e azida sódica (NaN_3 - Sigma-Aldrich, S2002, EUA) a 0,1% no título previamente padronizado a 37°C por 30 minutos e a 4°C por 18 horas em câmara úmida.
- Lavagem com solução salina tamponada com fosfatos mono e diidratados (PBS) (Merck, Alemanha) 10 mM em pH 7,4 por 10 minutos;
- Incubação com bloqueador pós-primário (Post Primary Block, Novolink Max Polymer Detection System, Newcastle, Reino Unido) a 37°C por 30 minutos;
- Lavagem com solução salina tamponada com fosfatos mono e diidratados (PBS) (Merck, Alemanha) 10 mM em pH 7,4 com 2 trocas de 10 minutos cada;

- Incubação com polímero curto conjugado à enzima peroxidase de rábano silvestre (Polymer, Novolink Max Polymer Detection System, Newcastle, Reino Unido) a 37 °C por 30 minutos;
- Lavagem com solução salina tamponada com fosfatos mono e diidratados (PBS) (Merck, Alemanha) 10 mM em pH 7,4 com 2 trocas de 10 minutos cada;
- Incubação com solução de substrato cromogênico de 3,3 tetrahidroclorato de diaminobenzidina (DAB – Sigma, D5637, EUA), 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO – Dinâmica), 2ml de peróxido de hidrogênio 6% e 100ml de tampão PBS à 37°C por 5 minutos;
- Lavagem em água corrente e água destilada por 10 minutos;
- Contra-coloração em solução de Hematoxilina de Harris por 10 segundos;
- Lavagem em água corrente e água destilada por 10 minutos;
- Alcalinização para “azulamento” com passagem em hidróxido de amônio 0,5%;
- Lavagem em água corrente e água destilada por 10 minutos;
- Desidratação em passagens em álcool 95% e absoluto;
- Diafanização em 4 passagens de xilol;
- Montagem da lâmina permanente com meio de montagem sintético Entellan (Merck, 1.07961, Alemanha).

3.5.3 - Controles positivos e negativos

Os controles utilizados para a padronização dos ensaios imuno-histoquímicos e em paralelo para as reações realizadas para todas as proteínas estudadas foram amostra de fígado não tumoral, que fisiologicamente expressam estes marcadores.

As condições de ensaio dos anticorpos foram idênticas ao protocolo previamente descrito, exceto para o controle negativo, o qual foi obtido mediante a omissão da etapa de incubação com o anticorpo primário.

3.5.4 - Registro das fotomicrografias

As imagens referentes à avaliação das reações imuno-histoquímicas foram obtidas, através dos Sistemas “NIS Elements Software, versão 4.0 (Nikon, Japão)” e “Image Pro Plus, versão 7.01 (Media Cybernetics, EUA)” do Laboratório de Investigação Médica LIM-14 do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

As lâminas de TMA foram também digitalizadas no escâner de lâminas histológicas Mirax (Zeiss, Alemanha) do Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto do Câncer de São Paulo (ICESP-HC-FMUSP).

3.6 - Avaliação da reatividade imuno-histoquímica

Todas as reações imuno-histoquímicas foram inicialmente analisadas pela pós-graduanda e validadas em análise conjunta em microscópio de dupla observação com o orientador.

3.6.1 - Intensidade

A estimativa de intensidade da reação foi realizada baseou-se na utilização das diferentes resoluções do microscópio para auxiliar a detecção das células positivas. Sendo assim, as classes foram determinadas:

0 = negativa;

1+ = reatividade apenas identificada com aumento de 400x;

2+ = reatividade bem definida com aumento de 200x;

3+= reatividade bem definida a partir de 100x;

4+ = reatividade identificada desde o menor aumento (40 x)

3.6.2 - Estimativa da porcentagem de células positivas

Para cada disco de tecido (spot) analisado, a marcação imuno-histoquímica foi inicialmente avaliada de forma semiquantitativa de 0 a 100% de células de interesse positivas marcadas em incrementos de 10 (0, acima de 1 até 10%=10%, acima de 11 e até 20%=20%, acima de 21 e até 30%,=30%, acima de 31 e até 40%=40%, acima de 41 e até 50= 50%, acima de 51 e até 60%=60%, acima de 61 e até 70%=70%, acima de 71 e até 80%=80%, acima de 81 e até 90%=90%, acima de 91 e até 100%=100%), totalizando 11 classes possíveis para estimar a quantidade de distribuição de positividade no tecido.

3.6.3 - Sistema de Pontuação e Definição de Positividade

Os casos do presente estudo foram avaliados através do resultado da pontuação obtida pela avaliação conjunta da intensidade da reação e estimativa de porcentagem de células positivas para cada marcador.

O valor de intensidade (0,1+,2+,3+ e 4+) de cada spot do caso foi multiplicado pelo valor da frequência de células positivas (0 a 100%) de cada spot do caso, gerando um escore entre 0 e 400. E, foi considerado para o estudo o maior valor de escore obtido entre todos os spots de cada caso.

Os casos com escore 0 (ausência total de intensidade e de frequência de células imunomarcadas) e 10 (1×10 = intensidade 1+ e até 10% das células neoplásicas) foram agrupados para a composição do grupo negativo.

Os casos que apresentaram escores de 20 ou mais (2×10 ou 1×20 ou mais) pontos foram considerados positivos. E, foram classificados, através da mediana, em níveis de positividade baixa e alta. Na ocorrência de associação significativa do escore de positividade e das variáveis anatomopatológicas analisadas, foi também investigada a associação com os níveis de positividade (baixa e alta).

3.6.4 - Padrão de expressão imuno-histoquímica de BSEP

Baseado em registros publicados no banco de dados do portal The Human Protein Atlas⁽³⁹⁾ e Lagana et al.⁽¹³⁸⁾, a expressão de BSEP na membrana canalicular sob a forma linear e puntiforme foi considerada verdadeiramente positiva, além imunoexpressão linear da membrana sob a forma acinar.

3.6.5 – Avaliação do desempenho dos marcadores

A positividade das reações imuno-histoquímicas para os marcadores ABC de transporte biliar que apresentaram melhor distinção da positividade vs coloração inespecífica de fundo, detecção de casos positivos e/ou discriminação dos casos menos diferenciados do carcinoma hepatocelular e do colangiocarcinoma foi comparada com a positividade observada para as reações IHQ com os anticorpos anti-CEA policlonal, anti-Hep-par-1 e anti-Arginase.

O número de casos com resultados (positivo ou negativo) concordantes e discordantes também foi descrito.

3.6.6 – Avaliação da positividade e as variáveis anatomopatológicas

A distribuição da positividade em relação às variáveis anatomopatológicas foi realizada de forma descritiva, através da determinação da frequência absoluta e relativa de cada variável avaliada.

3.7 - Avaliação estatística

A análise estatística foi realizada com auxílio dos softwares Minitab (v.17.0) e Graphpad Prism (v.7.0).

A comparação entre a positividade observada das reações imuno-histoquímica para cada anticorpo e as variáveis anatomopatológicas foi realizada através dos testes de qui-quadrado de Pearson ou Exato de Fisher, estabelecendo-se $P < 0,05$ como nível de significância estatística.

3.8 - Ética em Pesquisa

Este estudo obteve aprovação como projeto de pesquisa pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob o protocolo de pesquisa 368.063. Em se tratando de estudo retrospectivo de necropsias e de ressecções cirúrgicas, sem interferência em conduta e sem impacto na evolução dos pacientes, a CAPPesq dispensou a aplicação do Termo de Consentimento Informado.

4 - RESULTADOS

4.1 - Carcinoma hepatocelular

4.1.1 - Aspectos gerais de identificação dos pacientes

A Tabela 2 apresenta as características gerais de identificação dos casos de carcinoma hepatocelular em amostras de tumor primário no fígado.

Tabela 2 - Sumário dos aspectos gerais de identificação em 80 autópsias com carcinoma hepatocelular.

Características		n = 80 (%)
Sexo	Masculino	62 (78,5)
	Feminino	18 (22,5)
Idade (anos)	Média	58,1±10,9
	Mínimo – Máximo	28-82
	Mediana	59,5
Fator Etiológico	Infecção por VHC	27 (33,7)
	Etilismo	11 (13,8)
	Infecção por VHB	09 (11,2)
	Combinação dos fatores acima	15 (18,8)
	Hemocromatose	02 (2,5)
	Criptogênico	10 (12,5)
	Dados indisponíveis	06 (7,5)

Dos 80 casos de carcinoma hepatocelular aqui estudados, 62 (78,5%) estavam presentes em pacientes do sexo masculino e 18 (22,5%) em pacientes do sexo feminino.

A idade dos pacientes variou entre 28 e 82 anos sendo a média de 58,1±10,9 (média ± D.P.) anos e mediana representada por 59,5 anos.

O estudo apresentou com principal causa isolada para o desenvolvimento do CHC a infecção pelo VHC em 33,7% (27/80) dos casos seguido pelo etilismo em 13,8% (11/80) e infecção pelo VHB em 11,2% (9/80) dos casos. Em 15/80 (18,8%) casos, foram detectadas diversas combinações entre esses fatores: VHC+ etilismo; VHB + etilismo e coinfecção por VHC e VHB. Foram identificados também, 2 (2,5%) casos de CHC ocorrendo em cirrose por hemocromatose. Em 10 (12,5%) casos, as pesquisas etiológicas não levaram à identificação da causa (criptogênicos) e outros 6 (7,5%) casos não tinham dados disponibilizados.

4.1.2 - Aspectos anatomopatológicos

Os dados anatomopatológicos dos carcinomas hepatocelulares estão resumidos na Tabela 3.

Tabela 3 - *Sumário dos aspectos anatomopatológicos em 80 autópsias com carcinoma hepatocelular.*

Características		n	%
Número de nódulos	1	24	30,0
	2	04	5,0
	3	01	1,0
	4 ou mais	43	54,0
	Não informado	08	10,0
Tamanho do tumor (cm)	Média $\pm$ D.P.	5,4 $\pm$ 4,1	
	Mediana	4,1	
	Mínimo – Máximo	0,8 – 18,0	
Padrão histológico predominante ou variante	Trabecular	36	45,0
	Acinar/pseudoglandular	09	11,0
	Sólido/macrotrabecular	24	30,0
	Misto	09	11,0
	Células claras	02	3,0
Grau de diferenciação (Edmondson-Steiner)	Grau I + II	22	27,5
	Grau III	47	58,8
	Grau IV	11	13,7

O exame anatomopatológico identificou cirrose em 72 (90%) casos. Invasão vascular foi detectada em 15 (19%) casos.

O exame anatomopatológico revelou que 43 (54%) dos casos apresentavam 4 ou mais nódulos tumorais, 1 (1%) caso com 3 nódulos, 4 (5%) casos com 2 nódulos e 24 (30%) casos com único nódulo tumoral.

O tamanho do maior nódulo tumoral pode ser identificado no resultado do laudo original do exame macroscópico em 59 (73,8%) casos e variou entre 0,8 e 18,0 cm com média de 5,4 $\pm$ 4,1 (média $\pm$ D.P.) e mediana de 4,1 cm.

Dos 80 casos analisados, o padrão arquitetural predominante foi o trabecular em 36 (45%) casos, seguido de 24 casos (30%) de padrão

sólido/macrotrabecular, 9 (11%) de padrão acinar/pseudoglandular e 9 (11%) de padrão misto. Dois casos (3%) apresentaram a variante de células claras.

A utilização da Graduação de Edmondson-Steiner para a série de carcinoma hepatocelular deste estudo apontou 1 caso (1,2%) grau I, 21 (26,3%) grau II, 47 (58,8%) grau III e 11 (13,7%) grau IV. O agrupamento dos casos grau I e grau II resultou então, em 22 (27,5%) casos. Com vistas à análise estatística, foi realizado agrupamento dos casos grau I e grau II (22 casos) para serem comparados com o agrupamento dos casos grau III e grau IV (58 casos).

4.1.3 - Distribuição do padrão de reatividade imuno-histoquímica das proteínas transportadoras biliares

As Tabelas 4, 5 e 6 apresentam a distribuição da intensidade, da extensão (frequência de células positivas) e do escore resultante da multiplicação destes parâmetros relacionados à expressão canalículo-biliar das proteínas transportadoras ABC. A reatividade em intensidade mínima (1+) na faixa de extensão mínima (até 10% das células), resultando escore 10, foi considerada “negativa”, juntamente com os casos de escore 0.

Tabela 4 - Distribuição da intensidade de expressão canalículo-biliar mediante o uso de diferentes anticorpos nos casos de carcinoma hepatocelular.

Intensidade	BSEP monoclonal (F6) n (%)	BSEP policlonal HPA 019035 n (%)	MDR3 n (%)	MRP2 n (%)	MRP3 n (%)
0	17 (22,7)	12 (15,1)	30 (38,5)	04 (5,1)	57 (71,2)
1+	0 (0,0)	08 (10,1)	05 (6,4)	03 (3,9)	09 (11,2)
2+	21 (28,0)	20 (25,4)	18 (23,0)	15 (19,2)	10 (12,5)
3+	21 (28,0)	24 (30,4)	21 (27,0)	40 (51,3)	03 (3,8)
4+	16 (21,3)	15 (19,0)	04 (5,1)	16 (20,5)	01 (1,3)
Total	75 (100,0)	79 (100,0)	78 (100,0)	78 (100,0)	80 (100,0)

Tabela 5 - Distribuição da extensão da positividade de expressão canalículo-biliar mediante o uso de diferentes anticorpos nos casos de carcinoma hepatocelular.

	BSEP monoclonal (F6) n (%)	BSEP policlonal HPA 019035 n (%)	MDR3 n (%)	MRP2 n (%)	MRP3 n (%)
0	17 (22,7)	12 (15,2)	30 (38,5)	04 (5,1)	57 (71,3)
≤10%	0 (0,0)	14 (17,7)	04 (5,1)	02 (2,6)	8 (10,0)
>10% e ≤ 20%	18 (24,0)	12 (15,2)	07 (9,0)	05 (6,4)	03 (3,8)
>20% e ≤ 30%	10 (13,3)	05 (6,3)	07 (9,0)	11 (4,1)	05 (6,3)
>30% e ≤ 40%	13 (17,3)	05 (6,3)	12 (15,4)	20 (25,6)	02 (2,5)
>40% e ≤ 50%	04 (5,3)	05 (6,3)	02 (2,6)	07 (9,0)	02 (2,5)
>50% e ≤ 60%	05 (6,7)	07 (8,9)	10 (12,8)	8 (10,3)	01 (1,3)
>60% e ≤ 70%	05 (6,7)	06 (7,6)	04 (5,1)	13 (16,7)	01 (1,3)
>70% e ≤ 80%	02 (2,7)	13 (16,5)	02 (2,6)	07 (9,0)	01 (1,3)
>80% e ≤ 90%	01 (1,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	01 (1,3)	0 (0,0)
>90% e ≤ 100%	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Total	75 (100,0)	79 (100,0)	78 (100,0)	78 (100,0)	80 (100,0)

Tabela 6 - Distribuição do escore (intensidade x extensão da positividade) de expressão canalículo-biliar mediante o uso de diferentes anticorpos nos casos de carcinoma hepatocelular.

Escore	BSEP monoclonal (F6) n (%)	BSEP policlonal HPA 019035 n (%)	MDR3 n (%)	MRP2 n (%)	MRP3 n (%)
0	17 (22,7)	12 (15,2)	30 (38,5)	04 (5,1)	57 (71,3)
10	0 (0,0)	07 (8,9)	04 (5,1)	02 (2,6)	08 (10,0)
20	0 (0,0)	05 (6,3)	0 (0,0)	01 (1,3)	0 (0,0)
30	0 (0,0)	02 (2,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	01 (1,3)
40	15 (20,0)	06 (7,6)	07 (9,0)	03 (3,8)	02 (2,5)
50	0 (0,00)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
60	08 (10,7)	08 (10,1)	07 (9,0)	05 (6,4)	04 (5,0)
70	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
80	01 (1,3)	02 (2,5)	05 (6,4)	07 (9,0)	03 (3,8)
90	04 (5,3)	03 (3,8)	01 (1,3)	06 (7,7)	0 (0,0)
100	0 (0,0)	03 (3,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	01 (1,3)
120	11 (14,7)	05 (6,3)	07 (9,0)	13 (16,7)	01 (1,3)
140	0 (0,0)	01 (1,3)	01 (1,3)	0 (0,0)	0 (0,0)
150	02 (2,7)	02 (2,5)	02 (2,6)	04 (5,1)	01 (1,3)
160	02 (2,7)	01 (1,3)	0 (0,0)	02 (2,6)	0 (0,0)
180	02 (2,7)	04 (5,1)	08 (10,3)	05 (6,4)	0 (0,0)
200	02 (2,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	03 (3,8)	0 (0,0)
210	0 (0,0)	03 (3,8)	02 (2,6)	07 (9,0)	01 (1,3)
240	03 (4,0)	02 (2,5)	01 (1,3)	07 (9,0)	01 (1,3)
270	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
280	05 (6,7)	02 (2,5)	01 (1,3)	06 (7,7)	0 (0,0)
300	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
320	02 (2,7)	11 (13,9)	02 (2,6)	02 (2,6)	0 (0,0)
360	01 (1,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	01 (1,3)	0 (0,0)
400	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Total	75 (100,0)	79 (100,0)	78 (100,0)	78 (100,0)	80 (100,0)

Os casos considerados positivos (≥ 20), foram subdivididos em grupos com níveis de positividade baixa e alta conforme a mediana dos escores de expressão imuno-histoquímica para cada proteína transportadora ABC: 160 para BSEP monoclonal, 130 para BSEP policlonal, 145 para MDR3, 160 para MRP2, 100 para MRP3 e 150 para CEA policlonal.

4.1.3.1 - BSEP – Bomba de Exportação de Ácidos Biliares

A reação imuno-histoquímica para o antígeno BSEP foi avaliada mediante a utilização de dois anticorpos (policlonal e monoclonal).

A reação foi considerada válida para análise de 75 casos para BSEP monoclonal (clone F6) e 79 casos para o BSEP policlonal (HPA019035).

A ausência de área avaliável por exiguidade das amostras pós-processamento das lâminas do TMA não permitiu a análise de 1 (1,2%) caso para a reação com anti-BSEP policlonal e 5 (6,2%) casos para anti-BSEP monoclonal dos 80 iniciais do estudo.

A reação para BSEP com o uso do anticorpo monoclonal F6 mostrou-se positiva em 58 (77,3%) dos 75 casos de CHC e a reação com anticorpo policlonal anti-BSEP resultou positiva em 60 (75,9%) dos 79 casos avaliados.

Os padrões de expressão de BSEP foram similares tanto quando utilizado o anticorpo monoclonal F6 como quando utilizado o anticorpo policlonal HPA 019035. Os padrões de expressão observados na membrana celular dos hepatócitos foram: linear, acinar e puntiforme (Tabela 7 e Figura 6).

Tabela 7 - Padrão predominante da expressão de membrana de BSEP com os anticorpos policlonal e monoclonal no carcinoma hepatocelular.

	BSEP monoclonal F6		BSEP policlonal HPA 019035	
	n	%	n	%
Total	79	100	75	100
Padrão de Expressão				
Negativo	17	22,7	19	24,0
Linear	3	4,0	3	3,8
Linear e Acinar	9	12,0	9	11,4
Linear e Puntiforme	43	57,3	45	57,0
Acinar	0	0,0	0	0,0
Acinar e Puntiforme	3	4,0	3	3,8
Puntiforme	0	0,0	0	0,0

Mais de um padrão de expressão foi detectado em 80% (48/60) e 79,3% (46/58) dos casos positivos para as reações IHQ com anti-BSEP policlonal (HPA 019035) e monoclonal (F6), respectivamente. Um único padrão de expressão (linear) foi detectado em apenas 3 casos CHC, tanto com uso do anticorpo policlonal como do monoclonal.

Figura 6 - Padrões de expressão de BSEP: (A) linear; (B) linear e puntiforme; (C) linear e acinar; (D) acinar e puntiforme, com expressão linear focal (200X).

A Figura 7 apresenta diferentes níveis de intensidade e de extensão da positividade para a expressão do BSEP no fígado não neoplásico e no carcinoma hepatocelular.

Figura 7 - Padrões de intensidade e de extensão da marcação para BSEP no fígado não-neoplásico (A) e no carcinoma hepatocelular (B-F): (B) negativo; (C) intensidade 1+ e positividade em até 10% das células (setas); (D) intensidade 2+ e positividade em até 30%; (E) intensidade 3+ e positividade em até 70%; (F) intensidade 4+ e positividade em 80% das células (200X).

Tabela 8 - Distribuição do escore de positividade para BSEP com os anticorpos policlonal e monoclonal no carcinoma hepatocelular.

Anticorpo	Negativo n (%)	Positivo Baixo n (%)	Positivo Alto n (%)	Total n (%)
BSEP monoclonal F6	17 (22,7)	43 (57,3)	15 (20,0)	75 (100,0)
BSEP policlonal HPA019035	19 (24,1)	34 (43,0)	26 (32,9)	79 (100,0)

A semiquantificação das positivities para BSEP levou em consideração o conjunto de padrões linear, acinar e canalicular, não sendo valorizada a reatividade exclusiva para o padrão puntiforme. Dezesete casos mostraram-se negativos (17/25=22,7%) e 77,3% (58/75) de casos positivos com uso do anticorpo anti-BSEP monoclonal. O escore para reatividade imuno-histoquímica com o anticorpo anti-BSEP policlonal demonstrou 24,1% (19/79) de casos negativos e 75,9% (60/79) de casos positivos (Tabela 8).

4.1.3.1.2 - Associação da reatividade para BSEP com variáveis anatomopatológicas

A frequência dos casos negativos e positivos relacionados ao número de nódulos de CHC é apresentada na Tabela 9.

Tabela 9 - Associação do escore de positividade para BSEP e o número de nódulos de carcinoma hepatocelular.

Número de nódulos	BSEP monoclonal F6				BSEP policlonal HPA 019035			
	Negativo	Positivo	Total	P	Negativo	Positivo	Total	P
	n=15	n=54 n (%)	n=69		n=17	n=55 n (%)	n=72	
1	6 (25,0)	18 (75,0)	24 (100,0)	0,760	6 (25,0)	18 (75,0)	24 (100,0)	1,000
Mais de 1	9 (20,0)	36 (80,0)	45 (100,0)		11 (23,0)	37 (77,0)	48 (100,0)	

Não houve variação significativa entre a expressão da proteína BSEP, avaliado por ambos os anticorpos, e o número de nódulos de CHC por paciente.

A Tabela 10 apresenta a reatividade imuno-histoquímica da proteína BSEP conforme o tamanho do maior nódulo.

Tabela 10 - Associação da reatividade para BSEP e o tamanho dos nódulos de carcinoma hepatocelular.

Tamanho do tumor	BSEP monoclonal F6				BSEP policlonal HPA 019035			
	Negativo	Positivo	Total	P	Negativo	Positivo	Total	P
	n=12	n=43 n (%)	n=55		n=14	n=45 n (%)	n=59	
Menor que 2,0 cm	4 (33,3)	8 (66,7)	12 (100,0)	0,440	4 (26,7)	11 (73,3)	15 (100,0)	0,432
Entre 2,1cm e 5,0 cm	3 (14,3)	18 (85,7)	21 (100,0)		3 (14,3)	18 (85,7)	21 (100,0)	
Maior que 5,0 cm	5 (22,7)	17 (77,3)	22 (100,0)		7 (30,4)	16 (69,6)	23 (100,0)	

A análise da expressão da proteína BSEP, avaliada por ambos os anticorpos, não demonstrou associação significativa com o tamanho do tumor ($P>0,05$).

A frequência da positividade dos casos de CHC para a proteína BSEP em relação ao padrão arquitetural é apresentada na Tabela 11.

Tabela 11 - Associação da reatividade para BSEP e o padrão arquitetural do carcinoma hepatocelular.

Padrão Arquitetural	BSEP monoclonal (F6)			P	BSEP policlonal HPA 019035			P
	Negativo	Positivo	Total		Negativo	Positivo	Total	
	n=15	n=58	n=73		n=18	n=59	n=77	
	n (%)				n (%)			
Trabecular	6 (17,1)	29 (82,9)	35 (100,0)	0,079	6 (16,2)	31 (83,8)	37 (100,0)	0,033
Acinar/ Pseudoglandular	1 (11,1)	8 (88,9)	9 (100,0)		2 (22,2)	7 (77,8)	9 (100,0)	
Sólido/ Macrotrabecular	8 (38,1)	13 (61,9)	21 (100,0)		10 (43,5)	13 (55,5)	23 (100,0)	
Misto	0 (0,0)	8 (100,0)	8 (100,0)		0 (0,0)	8 (100,0)	8 (100,0)	

A reatividade imuno-histoquímica para BSEP apresentou variação significativa entre os diferentes padrões arquiteturais, mediante uso do anticorpo policlonal, havendo tendência neste mesmo sentido de perda de expressão nos padrões arquiteturais mais complexos quando do uso do anti-BSEP policlonal (Tabela 11). A análise mais detalhada, confrontando os casos de CHC de padrão sólido com os demais padrões, demonstrou expressão de BSEP significativamente menor nos casos que apresentavam o padrão mais complexo

tanto com uso do anticorpo monoclonal anti-BSEP ($P=0,019$) como com uso do anticorpo policlonal anti-BSEP ($P=0,016$).

A reação imuno-histoquímica para os dois casos de CHC variante de células claras foi negativa com o uso de anti-BSEP policlonal e apresentou 1 caso negativo e 1 caso com positividade baixa (escore=20) com uso de anti-BSEP monoclonal F6.

A frequência da expressão de BSEP conforme os graus de diferenciação de CHC é exibida na Tabela 12.

Tabela 12 - Associação da reatividade para BSEP e o grau de diferenciação do carcinoma hepatocelular.

Grau de diferenciação	BSEP monoclonal (F6)			P^*	BSEP policlonal HPA 019035			P^{**}
	Negativo	Positivo	Total		Negativo	Positivo	Total	
	n=17	n=58	n=75		n=19	n=60	n=79	
	n (%)				n (%)			
I	0 (0,0)	1 (4,5)	22 (100,0)	0,364	0 (0,0)	1 (4,5)	22 (100,0)	0,077
II	3 (13,6)	18 (81,9)			2 (9,1)	19 (86,4)		
III	9 (17,0)	34 (64,2)	53 (100,0)		11 (19,2)	35 (61,4)	57 (100,0)	
IV	5 (9,4)	5 (9,4)			6 (10,7)	5 (8,7)		

* (I + II) vs (III+IV) para BSEP monoclonal F6; ** (I + II) vs (III+IV) para BSEP policlonal HPA 019035.

A reação imuno-histoquímica com o anticorpo anti-BSEP monoclonal resultou positiva em 19 (86,4%) casos de CHC graus histológicos I e II e,

negativa em 14 (26,4%) casos e positiva em 39 (73,6%) casos de CHC graus histológicos III e IV, não havendo significância estatística em tal diferença.

A reação imuno-histoquímica com o anticorpo anti-BSEP policlonal nos casos de CHC graus histológicos I e II mostrou-se positiva em 20 casos (90,9%), enquanto 40 casos (70,1%) dentre os CHC graus histológicos III e IV mostraram-se positivos. Esta aparente menor expressão de BSEP nos CHC menos diferenciados não atingiu nível de significância estatística, visto que o valor de P foi 0,077.

4.1.3.2 - MDR3 - Proteína 3 Resistente a Múltiplas Drogas

A reação imuno-histoquímica para a proteína MDR3 foi avaliada mediante a utilização do anticorpo monoclonal P3 II-26.

A reação foi considerada válida para análise de 78 (97,5%) casos. A ausência de área avaliável por exiguidade das amostras pós-processamento das lâminas do TMA não permitiu a análise de 2 (2,5%) casos.

O anticorpo demonstrou reconhecer o epitopo presente na membrana dos hepatócitos em padrões de imunorreatividade linear e acinar (Figura 8), enquanto os sinais de aspecto granuliforme refinado ou grosseiro não foram considerados.

Figura 8 - Padrões de reatividade imuno-histoquímica para a proteína MDR3 no carcinoma hepatocelular: (A) linear e acinar e (B) linear (200X).

A frequência de casos de CHC negativos e positivos (subdivida em nível baixo e alto) para a detecção da proteína MDR3 é apresentada na Tabela 13.

Tabela 13 - Distribuição do escore de positividade da expressão de MDR3 no carcinoma hepatocelular.

Negativo (0 e 10 pontos)	Positivo baixo (entre 20 e 145 pontos)	Positivo alto (acima de 145 pontos)	Total
n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
34 (43,6)	30 (38,5)	14 (17,9)	78 (100,0)

Os dados mostram que a pesquisa imuno-histoquímica da proteína MDR3 resultou negativa em 34 (43,6%) casos e positiva em 44 (56,4%) casos dos 78 avaliados. Entre os positivos, 30 casos apresentaram escores “baixos” (20-145 pontos) e 14 apresentaram escores “altos”.

4.1.3.2.2 - Associação da reatividade para MDR3 com variáveis anatomopatológicas

A frequência dos casos negativos e positivos relacionados ao número de nódulos de CHC é apresentada na Tabela 14.

Tabela 14 - Associação da reatividade para MDR3 e o número de nódulos dos tumores primários de carcinoma hepatocelular.

Nº de tumores	Negativo n=29	Positivo n=41	Total n=70	P
	n (%)			
1	8 (33,3)	16 (66,7)	24 (100,0)	0,444
mais de 1	21 (45,7)	25 (54,3)	46 (100,0)	

A positividade da expressão de MDR3 não demonstrou associação estatisticamente significativa com o número de nódulos de CHC por caso ($P>0,05$).

A Tabela 15 apresenta a relação entre a reatividade para proteína MDR3 e o tamanho do maior nódulo de cada caso.

Tabela 15 - Associação da reatividade para MDR3 e o tamanho dos nódulos de carcinoma hepatocelular.

Tamanho do tumor	Negativo n=22	Positivo n=36	Total n=58	P
	n (%)			
≤ 2,0 cm	5 (35,7)	9 (64,3)	14 (100,0)	0,785
>2,0cm e ≤5,0 cm	7 (33,3)	14 (66,7)	21 (100,0)	
> 5,1 cm	10 (43,5)	13 (56,5)	23 (100,0)	

Não foi observada variação significativa ($P>0,05$) entre a positividade para a expressão do antígeno MDR3 e o tamanho do nódulo.

A frequência da positividade dos casos de CHC para a proteína MDR3 em relação ao padrão arquitetural é apresentada na Tabela 16.

Tabela 16 - Associação da reatividade para MDR3 e o padrão arquitetural do carcinoma hepatocelular.

Padrão Arquitetural	Negativo n=33	Positivo n=43	Total n=76	P
	n (%)			
Trabecular	13 (35,1)	24 (64,9)	37 (100,0)	0,050
Acinar/Pseudoglandular	3 (33,3)	6 (66,7)	9 (100,0)	
Sólido/Macrotrabecular	15 (68,2)	7 (31,8)	22 (100,0)	
Misto	2 (25)	6 (75)	8 (100,0)	

A análise estatística apresentou tendência a associação dos perfis de reatividade para MDR3 com os padrões arquiteturais de CHC ($P=0,05$). Quando os casos de CHC de padrão sólido foram comparados com o conjunto dos demais padrões ($18/54=33,3\%$ negativos e $36/54=66,7\%$ positivos), constatou-se redução significativa ($P=0,009$) da expressão de MDR3 nos casos de padrão sólido, considerado o padrão mais complexo, associado a menor diferenciação no plano arquitetural.

A reação imuno-histoquímica para os dois casos de CHC variante de células claras demonstrou 1 (50,0%) caso negativo e 1 (50,0%) caso com positividade baixa (escore=40).

A relação entre a reatividade para MDR3 e os graus de diferenciação dos casos de CHC é exibida na Tabela 17.

Tabela 17 - Associação do escore de positividade, subdividida em baixa e alta, para MDR3 e o grau de diferenciação do carcinoma hepatocelular.

Grau de diferenciação	Negativo	Positivo baixo (≤ 145)	Positivo alto (> 145)	Total	P
	n = 34 n (%)	n = 44 n (%)		n = 78 n (%)	
I + II	4 (18,2)	9 (40,9)	9 (40,9)	22 (100,0)	0,048
III + IV	30 (53,6)	21 (37,5)	5 (8,9)	56 (100,0)	

A Tabela 17 demonstra que a expressão de MDR3 foi significativamente inferior nos casos de CHC mais anaplásicos (III e IV) ($26/56=46,4\%$) quando comparados com os CHC melhor diferenciados (I e II) ($18/22=81,8\%$). Nota-se também que, mesmo quando positivos, os casos mais anaplásicos apresentaram escores mais baixos.

4.1.3.3 - MRP2 – Proteína 2 Associada à Resistência a Múltiplas Drogas

A reação imuno-histoquímica para o antígeno MRP2 foi avaliada mediante a utilização do anticorpo monoclonal M2 III-6.

A reação foi válida em 78 (97,5%) casos. A ausência de área avaliável por exiguidade das amostras pós-processamento das lâminas do TMA não permitiu a análise de 2 (2,5%) casos.

O anticorpo reconheceu epitopo presente na membrana lateral dos hepatócitos normais e neoplásicos, por vezes assumindo padrão circunferencial, com intensidade variável. Os padrões de expressão linear, acinar (pseudoacinar) e puntiforme foram detectados frequentemente nas amostras avaliadas (Figura

9). Também foi detectada positividade na face luminal dos ductos biliares normais e proliferados (reação ductular) com intensidade variável.

Foi observada, também, a reatividade para MRP2 em áreas necróticas, mas tal padrão não foi especialmente abordado no presente estudo.

Figura 9 - Padrões de imunorreatividade para MRP2 no carcinoma hepatocelular: (A) linear e puntiforme no padrão trabecular e (B) e sólido (200X).

A frequência do escore de positividade da reação imuno-histoquímica para a proteína MRP2 é apresentada na Tabela 18.

Tabela 18 - Distribuição do escore de positividade da expressão de MRP2 no carcinoma hepatocelular.

Negativo (0 e 10 pontos)	Positivo baixo (entre 20 e 160 pontos)	Positivo alto (acima de 160 pontos)	Total
n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
6 (7,7)	41 (52,5)	31 (39,8)	78 (100,0)

A reação para proteína MRP2 mostrou-se positiva em 92,3% (72/78) dos casos de CHC, sendo que valores considerados altos foram encontrados em 39,8% (31/78) casos.

4.1.3.3.1 - Associação da reatividade para MRP2 com variáveis anatomopatológicas

A relação entre a reatividade para MRP2 e o número de nódulos de CHC por caso é apresentada na Tabela 19.

Tabela 19 - Associação entre a reatividade para MRP2 e o número de nódulos do carcinoma hepatocelular.

Nº de tumores	Negativo n=6	Positivo n=64	Total n=70	P
	n (%)			
1	4 (16,7)	20 (83,3)	24 (100,0)	0,171
>1	2 (4,3)	44 (95,7)	46 (100,0)	

Não foi observada relação estatisticamente significativa ($P>0,05$) entre a expressão da proteína MRP2 e a quantidade de nódulos de CHC por caso.

A Tabela 20 apresenta a relação entre a reatividade para proteína MRP2 e o tamanho do maior nódulo de cada caso de CHC.

Tabela 20 - Associação entre a reatividade para MRP2 e o tamanho dos nódulos do carcinoma hepatocelular.

Tamanho do tumor	Negativo n=4	Positivo n=53	Total n=57	P
	n (%)			
≤ 2 cm	0 (0,0)	13 (100,0)	13 (100,0)	0,552
>2,1cm e ≤5,0 cm	2 (9,5)	19 (90,5)	21 (100,0)	
> 5,1 cm	2 (8,7)	21 (91,3)	23 (100,0)	

Não foi observada associação significativa ($P>0,05$) entre a positividade para a expressão do antígeno MRP2 e o tamanho do tumor de CHC.

A frequência da positividade dos casos de CHC para a proteína MRP2 em relação ao padrão arquitetural é apresentada na Tabela 21.

Tabela 21 - Associação entre reatividade para MRP2 e o padrão arquitetural no carcinoma hepatocelular.

Padrão Arquitetural	Negativo n= 5	Positivo n= 71	Total n= 76	P
	n (%)			
Trabecular	4 (11,1)	32 (88,9)	36 (100,0)	0,453
Acinar/Pseudoglandular	0 (0,0)	9 (100,0)	9 (100,0)	
Sólido/Macrotrabecular	1 (4,3)	22 (95,7)	23 (100,0)	
Misto	0 (0,0)	8 (100,0)	8 (100,0)	

Não houve relação significativa entre a positividade da proteína MRP2 e os diferentes padrões arquiteturais, nem mesmo ao confrontar o número de casos de CHC de padrão sólido com os demais padrões.

A reação imuno-histoquímica para os dois casos de CHC variante de células claras demonstrou 1 (50,0%) caso negativo e 1 (50,0%) com positividade baixa (escore=40) com uso do anticorpo anti-MRP2.

A comparação entre a reatividade imuno-histoquímica para MRP2 e os graus de diferenciação dos casos de CHC é exibida na Tabela 22.

Tabela 22 - Associação do escore de positividade para MRP2 e o grau de diferenciação do carcinoma hepatocelular.

Grau de diferenciação	Negativo n=6	Positivo n=72	Total n=78	P*
		n (%)		
I	0 (0,0)	1 (4,5)	22 (100,0)	0,176
II	0 (0,0)	21 (95,5)		
III	5 (8,9)	40 (71,5)	56 (100,0)	
IV	1 (1,8)	10 (17,8)		

P* = (I + II) vs (III+IV).

A reação imuno-histoquímica para MRP2 exibiu positividade em todos os 22 (100,0%) casos bem diferenciados enquanto 50 (89,3%) casos foram positivos entre os graus III e IV, não havendo variação estatística entre os grupos.

4.1.3.4 - MRP3 – Proteína 3 Associada à Resistência à Múltiplas Drogas

A reação imuno-histoquímica para o antígeno MPR3 foi avaliada mediante a utilização de anticorpo monoclonal DTX-1.

A reação foi validada nos 80 (100%) casos de CHC. O anticorpo reconheceu epitopo presente na membrana lateral dos hepatócitos normais e neoplásicos com intensidade variável. Os padrões de expressão linear e acinar foram detectados face basolateral dos hepatócitos normais e neoplásicos nas amostras avaliadas. Também foi identificada imunorreatividade para o anticorpo na face luminal dos ductos biliares normais e proliferados (reação ductular) com intensidade variável (Figura 10).

Figura 10 - Padrões de definição de intensidade e positividade para MRP3 no fígado não-neoplásico (A) e no carcinoma hepatocelular (B-F): (B) negativo; (C) intensidade 1+ e positividade em até 10% das células; (D) intensidade 2+ e positividade em até 60%; (E) intensidade 3+ e positividade em até 20% (seta); (F) intensidade 4+ e positividade em 30% das células (A-E: 200X; F: 40X).

A frequência do escore de positividade da reação imuno-histoquímica para a proteína MRP3 é apresentada na Tabela 23.

Tabela 23 - Distribuição do escore de positividade da expressão de MRP3 no carcinoma hepatocelular.

Negativo (0 e 10 pontos)	Positivo baixo (entre 20 e 100 pontos)	Positivo alto (acima de 100 pontos)	Total
n (%)			
65 (81,2)	11 (13,8)	4 (5,0)	80 (100,0)

O anticorpo anti-MRP3 apresentou imunorreatividade em apenas 15 (18,8%) dos casos, e 73,3% (11/15) destes apresentaram escores de positividade baixos (entre 20 e 100 pontos).

4.1.3.4.1 - Associação da reatividade para MRP3 com variáveis anatomopatológicas

A comparação entre a reatividade para MRP3 e o número de nódulos de CHC por caso é apresentado na Tabela 24.

Tabela 24 - Associação entre a reatividade para MRP3 e o número de nódulos do carcinoma hepatocelular por caso.

Nº de tumores	Negativo n=57	Positivo n=15	Total n=72	P
n (%)				
1	16 (66,7)	8 (33,3)	24 (100,0)	0,121
>1	41 (85,4)	7 (14,6)	48 (100,0)	

Não houve qualquer relação significativa entre a reatividade para MRP3 e o número de nódulos de CHC por caso ($P>0,05$).

A Tabela 25 compara a reatividade para proteína MRP3 e o tamanho do maior nódulo de CHC de cada caso.

Tabela 25 - Associação da reatividade para MRP3 e o tamanho dos nódulos do carcinoma hepatocelular.

Tamanho do tumor	Negativo n=46	Positivo n=13	Total n=59	P
	n (%)			
≤ 2 cm	12 (80,0)	3 (20,0)	15 (100,0)	0,999
>2,1cm e ≤5,0 cm	16 (76,2)	5 (23,8)	21 (100,0)	
> 5,1 cm	18 (78,3)	5 (21,7)	23 (100,0)	

Não foi observada variação significativa ($P>0,05$) entre a positividade para a expressão de MRP3 e o tamanho do tumor de CHC.

A frequência da positividade dos casos de CHC para a proteína MRP3 em relação ao padrão arquitetural é apresentada na Tabela 26.

Tabela 26 - Associação do escore de positividade para MRP3 e o padrão arquitetural do carcinoma hepatocelular.

Padrão Arquitetural	Negativo n= 63	Positivo n= 15	Total n=78	P
	n (%)			
Trabecular	30 (81,1)	7 (18,9)	37 (100,0)	0,079
Acinar/Pseudoglandular	7 (77,8)	2 (22,2)	9 (100,0)	
Sólido/Macrotrabecular	22 (91,7)	2 (8,3)	24 (100,0)	
Misto	4 (50,0)	4 (50,0)	8 (100,0)	

Não houve variação significativa entre o escore de positividade da proteína MRP3 e os diferentes padrões arquiteturais. Assim como, não houve

diferença estatística significativa ao confrontar o número de casos de CHC de padrão sólido aos demais padrões ($P=0,129$).

A reação imuno-histoquímica para os dois casos de CHC variante de células claras foi negativa com o uso do anticorpo anti-MRP3.

Tabela 27 – Associação entre a reatividade para MRP3 e o grau de diferenciação do carcinoma hepatocelular.

Grau de diferenciação	Negativo n=65	Positivo n=15	Total n=80	P*
		n (%)		
I	1 (4,5)	0 (0,0)	22 (100,0)	0,334
II	15 (68,2)	6 (27,3)		
III	39 (67,3)	8 (13,8)	58 (100,0)	
IV	10 (17,2)	1 (1,7)		

P* = (I + II) vs (III+IV).

A análise da Tabela 27 mostra que a imunorreatividade para MRP3 é baixa em todos os casos de CHC, independentemente ($P>0,05$) do grau de diferenciação histológica.

4.2 - Colangiocarcinoma

4.2.1 - Aspectos gerais de identificação dos pacientes

As amostras de colangiocarcinoma que compõem este estudo correspondem a 56 casos. O laudo anatomopatológico de 52 casos (92,9%) apresentava a informação sobre o sexo dos pacientes sendo 19 (36,5%) pacientes do sexo feminino e 33 (63,5%) do sexo masculino.

A idade média em 47 pacientes identificados no exame foi de $56 \pm 13,2$ (média $\pm$ D.P.) e mediana de 57 anos. A idade mínima foi de 23 anos e a máxima de 86 anos.

4.2.2 - Aspectos anatomopatológicos

A informação referida nos laudos dos exames anatomopatológicos revelou que as neoplasias de ductos biliares deste estudo correspondiam topograficamente a 19,7% (11/56) de casos de colangiocarcinoma intra-hepático, 32,1% (18/56) casos de colangiocarcinoma extra-hepático e 48,2% (27/56) casos de colangiocarcinoma hilar.

O tamanho do tumor, independentemente da localização anatômica, pode ser identificado em 49 (83,9%) casos e variou entre 1,5 e 23 cm com média de $10,7 \pm 6,3$ (média $\pm$ D.P.) e mediana de 12,0 cm.

O padrão macroscópico de crescimento das amostras de colangiocarcinomas inseridas neste estudo esteve distribuída em 20 (35,7%) casos do tipo formador de massa, 35 (62,5%) casos do tipo infiltrativo periductal e 1 (1,8%) caso do tipo intraductal. Os padrões macroscópicos do tipo formador

de massa foram comparados estatisticamente com os tipos infiltrativo periductal e intraductal.

A observação dos dados permitiu identificar presença de invasão vascular em 22,9% (11/48) dos casos, invasão perineural em 62,3% (33/53) dos casos e metástases em 17% (9/53) deles.

O registro do exame microscópico demonstrou que dos 56 casos do estudo, 43 (76,8%) casos foram classificados histologicamente como ductal, 4 (7,1%) casos do tipo ductular malformação de placa ductal e 9 (16,1%) casos do tipo ductular de células intermediárias. Para análise estatística, os subtipos histológicos do tipo ductular (malformação de placa e de células intermediárias) foram agrupados, totalizando 13 casos e comparados com o subtipo histológico ductal.

A distribuição do grau de diferenciação dos casos demonstrou que 33 (58,9%) casos foram classificados como bem diferenciados, 19 (33,9%) casos moderadamente diferenciados, 3 (5,4%) casos pouco diferenciados e 1 caso (1,8%) indiferenciado. Com vistas à análise estatística, foi realizado o agrupamento dos casos moderadamente diferenciados, pouco diferenciados e indiferenciados (23 casos) e comparados com os casos bem diferenciados (33 casos).

Os dados referentes às informações anatomopatológicas das neoplasias de vias biliares e o agrupamento dos casos para fins estatísticos estão sumarizados na Tabela 28.

Tabela 28 - Sumário dos aspectos anatomopatológicos em 56 casos de colangiocarcinoma.

Características		n (%)	
		Casos separados	Agrupamento dos casos
Topografia		n=56	n=56
	Intra-hepático periférico	11 (19,7)	11 (19,7)
	Intra-hepático hilar	27 (48,2)	45 (80,3)
	Extra-hepático	18 (32,1)	
Tamanho do tumor (cm)		n=49	
	Média ±D.P.	10,7±6,3	
	Mediana	12	
	Mínimo – Máximo	1,5-23	
Medidas do tumor (cm)		n=49	
	< 12,0 cm	23	
	≥12,0 cm	26	
Padrão macroscópico		n=56	n=56
	Formador de massa	20 (35,7)	20 (35,4)
	Infiltrativo periductal	35 (62,5)	36 (64,2)
	Intraductal	1 (1,8)	
Subtipo histológico		n=56	n=56
	Ductal	43 (76,8)	43 (76,8)
	Ductular malformação de placa	4 (7,1)	
	Ductular de células intermediárias	9 (16,1)	13 (23,2)
Grau de diferenciação		n=56	n=56
	Bem diferenciado	33 (58,9)	33 (58,9)
	Moderadamente diferenciado	19 (33,9)	
	Pouco diferenciado	3 (5,4)	23 (41,1)
	Indiferenciado	1 (1,8)	

4.2.3 - Distribuição do padrão de reatividade imuno-histoquímica das proteínas transportadoras biliares

As Tabelas 29, 30 e 31 apresentam a distribuição da intensidade, da extensão (frequência de células positivas) e do escore resultante da multiplicação destes parâmetros relacionados à expressão canalículo-biliar das proteínas transportadoras ABC. A reatividade em intensidade mínima (1+) na faixa de extensão mínima (até 10% das células), resultando escore 10, foi considerada “negativa”, juntamente com os casos de escore 0.

Tabela 29 - Distribuição da intensidade de expressão canalículo-biliar mediante o uso de diferentes anticorpos nos casos de colangiocarcinoma.

	BSEP monoclonal F6 n(%)	BSEP policlonal HPA019035 n(%)	MDR3 n(%)	MRP2 n(%)	MRP3 n(%)
0	55 (100,0)	55 (100,0)	54 (100,0)	1 (1,9)	19 (35,2)
1+	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	5 (9,3)	12 (22,2)
2+	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	21 (38,9)	12 (22,2)
3+	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	15 (27,8)	10 (18,5)
4+	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	12 (22,2)	1 (1,9)
Total	55 (100,0)	55 (100,0)	54 (100,0)	54 (100,0)	54 (100,0)

Tabela 30 - Distribuição da extensão da positividade de expressão canalículo-biliar mediante o uso de diferentes anticorpos nos casos de colangiocarcinoma.

	BSEP monoclonal F6 n(%)	BSEP policlonal HPA019035 n(%)	MDR3 n(%)	MRP2 n(%)	MRP3 n(%)
0	55 (100,0)	55 (100,0)	54 (100,0)	1 (1,9)	19 (35,2)
≤10%	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,9)	11 (20,4)
≥10% e ≤ 20%	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	5 (9,3)	5 (9,3)
≥20% e ≤ 30%	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	8 (14,8)	5 (9,3)
≥30% e ≤ 40%	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (7,4)	4 (7,4)
≥40% e ≤ 50%	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	9 (16,7)	2 (3,7)
≥50% e ≤ 60%	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	13 (24,1)	1 (1,9)
≥60% e ≤ 70%	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	9 (16,7)	5 (9,3)
≥70% e ≤ 80%	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (3,7)	2 (3,7)
≥80% e ≤ 90%	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (3,7)	0 (0,0)
≥90% e ≤ 100%	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Total	55 (100,0)	55 (100,0)	54 (100,0)	54 (100,0)	54 (100,0)

Tabela 31 - Distribuição do escore (intensidade x extensão da positividade) de expressão canalículo-biliar mediante o uso de diferentes anticorpos nos casos de colangiocarcinoma.

	BSEP monoclonal F6 n(%)	BSEP policlonal HPA019035 n(%)	MDR3 n(%)	MRP2 n(%)	MRP3 n(%)
0	55 (100,0)	55 (100,0)	54 (100,0)	1 (1,9)	19 (35,2)
10	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,9)	11 (20,4)
20	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (5,6)	1 (1,9)
30	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,9)	0 (0,0)
40	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (3,7)	3 (5,6)
50	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
60	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	6 (11,1)	5 (9,3)
70	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
80	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (3,7)	3 (5,6)
90	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,9)
100	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	6 (11,1)	0 (0,0)
120	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	8 (14,8)	2 (3,7)
140	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,9)
150	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (5,6)	2 (3,7)
160	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
180	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	5 (9,3)	0 (0,0)
200	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
210	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	5 (9,3)	4 (7,4)
240	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (7,4)	1 (1,9)
270	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
280	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (7,4)	0 (0,0)
300	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
320	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,9)	1 (1,9)
360	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (3,7)	0 (0,0)
400	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Total	55 (100,0)	55 (100,0)	54 (100,0)	54 (100,0)	54 (100,0)

A mediana dos casos considerados positivos (≥ 20) para agrupá-los em níveis de positividade (baixo e alto) para cada anticorpo apresentou os seguintes resultados: 0 para BSEP monoclonal, BSEP policlonal e MDR3, 135 para MRP2, 120 para MRP3 e 155 para CEA policlonal.

4.2.3.1 - BSEP – Bomba de Exportação de Ácidos Biliares

A análise da reação imuno-histoquímica foi avaliada em 55 (98,2%) casos para o ambos os anticorpos (BSEP monoclonal F6 e policlonal HPA019035).

A ausência de área avaliável por exiguidade das amostras pós-processamento das lâminas do TMA não permitiu a análise de 1 (1,8%) caso dos 56 iniciais do estudo.

A reação imuno-histoquímica para pesquisa do antígeno BSEP mediante o uso dos anticorpos BSEP monoclonal F6 e policlonal HPA019035 foi considerada negativa em todos (100%) os casos avaliados (Figura 11).

Figura 11 - Reação imuno-histoquímica para BSEP (policlonal e monoclonal): ausência de imunomarcacão nas amostras de colangiocarcinoma (A e C, 40X; B e D, 200X).

4.2.3.2 - MDR3 - Proteína 3 Resistente a Múltiplas Drogas

A reação imuno-histoquímica para o antígeno MDR3 foi avaliada mediante a utilização do anticorpo monoclonal P3 II-26. Foi considerada válida para análise de 54 (96,4%) casos. A ausência de área avaliável por exiguidade das amostras pós-processamento das lâminas do TMA não permitiu a análise de 2 (3,6%) casos.

Não foi observada imunorreatividade de MDR3 na membrana nos colangiócitos normais ou nos neoplásicos. Casos ocasionais mostraram uma coloração inespecífica de intensidade fraca no citoplasma das células normais e neoplásicas, a qual foi desconsiderada. Portanto, a pesquisa do antígeno nas amostras de colangiocarcinoma foi considerada negativa em todos (100%) os casos avaliados (Figura 12).

Figura 12 - Reação imuno-histoquímica em amostra de colangiocarcinoma. Ausência de imunorreatividade para o antígeno MDR3 em membrana dos colangiócitos neoplásicos e tumorais (A: 100X; B:400X).

4.2.3.3 - MRP2 – Proteína 2 Associada à Resistência a Múltiplas Drogas

A reação imuno-histoquímica para o antígeno MRP2 foi avaliada mediante a utilização do anticorpo monoclonal M2 III-6.

A reação foi válida em 54 (96,4%) casos. A ausência de área avaliável por exiguidade das amostras pós-processamento das lâminas do TMA não permitiu a análise de 2 (3,6%) casos.

A imunorreatividade para MRP2 foi observada nas membranas lateral e luminal dos ductos normais, proliferados (reação ductular) e neoplásicos. O padrão de expressão exibiu marcação linear uniforme e, algumas vezes, granuliforme com intensidade e distribuição variando de moderada a intensa (Figura 13).

Foi observada também, a presença de reatividade imuno-histoquímica para MRP2 em feixes nervosos que permeavam os ductos. Tal reatividade não foi analisada neste estudo, que tem por alvo as células epiteliais.

Figura 13 - Reação imuno-histoquímica para MRP2 em colangiocarcinoma. Imunorreatividade observada nas faces laterais e lumbais dos colangiócitos de ductos normais e neoplásicos (A e B; 200X).

A frequência de casos de CC negativos e positivos (subdivida em nível baixo e alto) para a detecção da proteína MRP2 é apresentada na Tabela 32.

Tabela 32 - Distribuição do escore de positividade da expressão de MRP2 no colangiocarcinoma.

Negativo (0 e 10 pontos)	Positivo baixo (entre 20 e 135 pontos)	Positivo alto (acima de 135 pontos)	Total
n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
2 (3,7)	28 (51,8)	24 (44,5)	54 (100,0)

A pesquisa imuno-histoquímica da proteína MRP2 resultou negativa em apenas 2 (3,7%) casos e positiva em 52/54 casos (96,3%), dos quais 28 apresentaram escores “baixos” (20-135 pontos) e 24 apresentaram escores “altos” (>135 pontos).

4.2.3.3.1 - Associação da reatividade para MRP2 com variáveis anatomopatológicas

A Tabela 33 apresenta os resultados observados da pesquisa imuno-histoquímica para MRP2 e a localização dos casos de colangiocarcinoma.

Tabela 33 - Associação da reatividade para MRP2 e a topografia do colangiocarcinoma.

Topografia	Negativo n=2	Positivo n=52	Total n=54	P*
	n (%)			
Intra-hepático periférico	1 (9,1)	10 (90,9)	11 (100,0)	0,369
Intra-hepático hilar	1 (5,9)	16 (94,1)	17 (100,0)	
Extra-hepático	0 (0,0)	26 (100,0)	26 (100,0)	

P= (intra-hepático periférico) vs (intra-hepático hilar + extra-hepático)*

A reação imuno-histoquímica para MRP2 mostrou-se positiva em 10 (90,9%) casos de colangiocarcinomas com localização intra-hepática periférica e em 42/43 (97,7%) casos de colangiocarcinomas hilares e extra-hepáticos, não tendo sido detectada variação estatística significativa entre a reatividade para MRP2 e a distribuição topográfica dos colangiocarcinoma.

A Tabela 34 exhibe a relação entre a reatividade para a proteína MRP2 e o padrão de crescimento dos colangiocarcinomas.

Tabela 34 - Associação da reatividade para MRP2 e o padrão de crescimento do colangiocarcinoma.

Padrão de crescimento	Negativo n=2	Positivo n=52	Total n=54	P*
	n (%)			
Formador de massa	1 (5,0)	19 (95,0)	20 (100,0)	
Infiltrativo periductal	1 (3,0)	32 (97,0)	33 (100,0)	1,000
Intraductal	0 (0,0)	1 (100,0)	1 (100,0)	

P= (formador de massa) vs (infiltrativo peri-ductal + intra-ductal)*

A pesquisa para MRP2 resultou positiva em 19 (95,0%) casos de padrão de crescimento do tipo formador de massa e em 33/34 (97,0%) casos de padrão de crescimento infiltrativo peri-ductal e intra-ductal. Tais achados não detectam diferenças significativas de reatividade para MRP2 e o padrão de crescimento dos casos de colangiocarcinoma.

Tabela 35 - Associação do escore de positividade para MRP2 e o subtipo histológico do colangiocarcinoma.

Subtipo histológico	Negativo n=2	Positivo n=52	Total n=54	P*
	n (%)			
Ductal	1 (2,5)	40 (97,5)	41 (100,0)	0,427
Ductular com malformação De placa	0 (0,0)	4 (100,0)	4 (100,0)	
Ductular de células intermediárias	1 (11,1)	8 (88,9)	9 (100,0)	

P*= (ductal) vs ductular (malformação de placa + células intermediárias)

A reação imuno-histoquímica para MRP2 mostrou-se positiva em 40 (97,5%) casos do subtipo histológico ductal e em 12/13 (92,3%) casos dos subtipos agrupados ductular com malformação de placa e de células intermediárias (Tabela 41).

Não houve diferença estatística entre o escore de positividade para MRP2 e os subtipos histológicos de colangiocarcinoma, verificando-se que a expressão da proteína MRP2 permaneceu elevada nos diferentes subtipos histológicos.

Tabela 36 - Associação da reatividade para MRP2 e o grau de diferenciação do colangiocarcinoma.

Grau de diferenciação	Negativo n=2	Positivo n=52	Total n=54	P*
	n (%)			
Bem diferenciado	0 (0,0)	31 (100,0)	31 (100,0)	0,176
Moderadamente diferenciado	0 (0,0)	19 (100,0)	19 (100,0)	
Pouco diferenciado	1 (33,3)	2 (66,7)	3 (100,0)	
Indiferenciado	1 (100,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	

P*= (bem diferenciados) vs menos diferenciados (moderadamente + pouco + indiferenciado)

A reação imuno-histoquímica para MRP2 resultou positiva nos 31 (100%) casos de colangiocarcinomas bem diferenciados e em 21 (91,3%) casos menos diferenciados, não tendo sido constatada diferença significativa entre os grupos individualizados. Entretanto, a análise dos agregados de casos bem e moderadamente diferenciados revelou expressão de MRP2 em todos os 50 casos enquanto apenas 2 dos 4 casos pouco ou indiferenciados mostraram-se reativos para MRP2, correspondendo a uma redução significativa ($P=0,00042$) da expressão da proteína transportadora nos casos de colangiocarcinoma menos diferenciados.

4.2.3.4 - MRP3 – Proteína 3 Associada à Resistência à Múltiplas Drogas

A reação imuno-histoquímica para a proteína MPR3 foi efetuada com uso do anticorpo monoclonal (DTX-1).

A reação foi válida em 54 (96,4%) casos. A ausência de área avaliável por exiguidade das amostras pós-processamento das lâminas do TMA não permitiu a análise de 2 (3,6%) casos.

O anticorpo reconheceu epitopo presente na membrana lateral dos colangiócitos normais e neoplásicos com intensidade variável. Também foi identificada imunorreatividade para o anticorpo na face luminal dos ductos biliares normais e proliferados (reação ductular) com intensidade variável (Figura 14).

Figura 14 - Intensidade e positividade de imunomarcção para MRP3 no fígado não-neoplásico (A) e em colangiocarcinoma (B-F): (B) negativo; (C) intensidade 1+ e positividade em até 10% das células; (D) intensidade 2+ e positividade em até 60%; (E) intensidade 3+ e positividade em até 80%; (F) intensidade 4+ e positividade em 80% das células (200X).

A frequência de casos de CC negativos e positivos (subdivida em nível baixo e alto) para a detecção da proteína MRP3 é apresentada na Tabela 37.

Tabela 37 - Distribuição do escore de expressão de MRP3 nos colangiocarcinoma.

Negativo (0 e 10 pontos)	Positivo baixo (entre 20 e 120 pontos)	Positivo alto (acima de 120 pontos)	Total
n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
30 (55,5)	15 (27,8)	9 (16,7)	54 (100,0)

Dos 54 casos avaliados, a pesquisa imuno-histoquímica da proteína MRP3 resultou negativa em 30 (55,5%) casos e positiva em 24 casos (44,5%) de colangiocarcinoma, dos quais 15 apresentaram escores “baixos” (20-120 pontos) e 9 apresentaram escores “altos”.

4.2.3.4.1 - Associação da reatividade para MRP3 com variáveis anatomopatológicas

A Tabela 38 apresenta os resultados observados da pesquisa imuno-histoquímica para MRP3 e a localização dos casos de colangiocarcinoma.

Tabela 38 - Associação da reatividade para MRP3 e a topografia do colangiocarcinoma.

Topografia	Negativo n=30	Positivo n=24 n (%)	Total n=54	P*
Intra-hepático periférico	8 (72,8)	3 (27,2)	11 (100,0)	0,310
Intra-hepático hilar	9 (53,0)	8 (47,0)	17 (100,0)	
Extra-hepático	13 (50,0)	13 (50,0)	26 (100,0)	

P*= (intra-hepático periférico) vs (intra-hepático hilar + extra-hepático)

A reação imuno-histoquímica para MRP3 identificou 3 (27,2%) casos positivos entre os colangiocarcinomas com localização intra-hepática periférica e 21/43 (48,8%) casos positivos agrupados entre os colangiocarcinomas hilares e extra-hepáticos.

Não foi observada variação estatística significativa entre a reatividade para MRP3 e a topografia do colangiocarcinoma.

Tabela 39 – Associação entre a reatividade para MRP3 e o padrão de crescimento do colangiocarcinoma.

Padrão de crescimento	Negativo n=30	Positivo n=24	Total n=54	P*
	n (%)			
Formador de massa	14 (70,0)	6 (30,0)	20 (100,0)	0,156
Infiltrativo periductal	15 (45,5)	18 (55,5)	33 (100,0)	
Intraductal	1 (100,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	

P= (formador de massa) vs (infiltrativo periductal + intraductal)*

Os dados apresentados na Tabela 39 demonstraram reatividade para MRP3 em 6 (30,0%) casos com crescimento de padrão formador de massa e em 18/34 (53,0%) casos no agrupado de padrão de crescimento infiltrativo periductal e intraductal.

Não foi observada variação estatística significativa entre o escore de positividade para MRP3 e o padrão de crescimento dos casos de colangiocarcinoma, ainda que observado o triplo de casos positivos de padrão infiltrativo periductal e intraductal em relação aos casos de padrão formador de massa ($P>0,05$).

Tabela 40 - Associação entre a reatividade para MRP3 e os subtipos histológicos do colangiocarcinoma.

Subtipo histológico	Negativo n=30	Positivo n=24	Total n=54	P*
	n (%)			
Ductal	19 (46,3)	22 (53,6)	41 (100,0)	0,023
Ductular com malformação de placa	3 (75,0)	1 (25,0)	4 (100,0)	
Ductular de células intermediárias	8 (88,9)	1 (11,1)	9 (100,0)	

P= (ductal) vs ductular (malformação de placa + células intermediárias)*

A avaliação da reação imuno-histoquímica para MRP3 mostrou positividade em 22 (53,6%) casos apresentando subtipo histológico ductal e em 2/13 (15,4%) casos apresentando subtipos agrupados ductular com malformação de placa e de células intermediárias (Tabela 40).

Tabela 41 - Associação do escore dos níveis de positividade (baixo e alto) para MRP3 e os subtipos histológicos do colangiocarcinoma.

Subtipo histológico	Negativo	Positivo baixo (≤ 120)	Positivo alto (> 120)	Total	P
	n = 30 n (%)	n = 24 n (%)		n = 54 n (%)	
Ductal	19 (46,3)	14 (34,1)	8 (19,6)	41 (100,0)	0,051
Ductular com malformação De placa	3 (75,0)	0 (0,0)	1 (25,0)	4 (100,0)	
Ductular de células intermediárias	8 (88,9)	1 (11,1)	0 (0,0)	9 (100,0)	

A análise da reatividade para MRP3 por tipo histológico demonstrou menor expressão de MRP3 nos casos de subtipo histológico ductular (malformação de placa e de células intermediárias) ($P=0,023$).

A Tabela 42 apresenta a relação entre a reatividade para MRP3 e os graus de diferenciação do colangiocarcinoma.

Tabela 42 - Associação entre a reatividade para MRP3 e o grau de diferenciação do colangiocarcinoma.

Grau de diferenciação	Negativo n=30	Positivo n=24	Total n=54	P*
	n (%)			
Bem diferenciado	14 (45,2)	17 (54,8)	31 (100,0)	0,099
Moderadamente diferenciado	12 (63,1)	7 (36,9)	19 (100,0)	
Pouco diferenciado	3 (100,0)	0 (0,0)	3 (100,0)	
Indiferenciado	1 (100,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	

P* = (bem diferenciados) vs menos diferenciados (moderadamente + pouco + indiferenciado).

A reação imuno-histoquímica para MRP3 resultou positiva em 17 (54,8%) casos de colangiocarcinoma bem diferenciado e em 7 (30,4%) casos com menor grau de diferenciação (moderados, poucos e indiferenciados), não atingindo significância estatística, o mesmo ocorrendo quando os casos de colangiocarcinoma bem e moderadamente diferenciados foram comparados aos casos pouco e indiferenciados. (P=0,120).

4.2.3.5 - Comparação da reatividade imuno-histoquímica para os diversos transportadores biliares no CHC e no CC

Os resultados da reatividade canalículo-biliar no carcinoma hepatocelular e no colangiocarcinoma, mediante a utilização dos anticorpos para proteínas transportadoras ABC estão resumidos nos Gráficos 1 e 2.

Gráfico 1 - Frequência da reatividade de proteínas transportadoras ABC nos 80 casos de autópsias com carcinoma hepatocelular.

Gráfico 2 – Frequência da reatividade de proteínas transportadoras ABC nos 56 casos de colangiocarcinoma.

4.3 - Outros marcadores diagnósticos de neoplasia hepática

4.3.1 - CEA - Antígeno carcinoembriônico (anticorpo policlonal A0115)

A expressão de proteínas canalículo-biliares também foi avaliada através de reação imuno-histoquímica mediante a utilização do anticorpo anti-CEA policlonal A0115.

Para o carcinoma hepatocelular, a reação mostrou-se válida em 76 (95%) casos. A ausência de área avaliável por exiguidade das amostras pós-processamento das lâminas do TMA não permitiu a análise de 4 (5,0%) casos.

O anticorpo policlonal anti-CEA demonstrou reconhecer epitopos presentes na face lateral dos hepatócitos (região apical) normais, e neoplásicos, assim como, na face luminal das estruturas pseudoacinar do tumor e na face luminal dos ductos proliferados (Figura 15).

A imunorreatividade granular no citoplasma de neutrófilos, anteriormente reconhecida como direcionada para antígeno de reação cruzada não específico (non specific cross-reacting antigen – NCA) foi observada, contudo, não considerada para a avaliação da positividade da reação imuno-histoquímica.

Figura 15 - Expressão de antígenos reconhecidos pelo anticorpo policlonal anti-CEA no carcinoma hepatocelular. Padrão de expressão linear e acinar de intensidade variável na membrana canalicular de hepatócitos neoplásicos nos tipos de padrão arquitetural pseudoglandular (A;200x) e sólido (B;400x).

Epitopos reconhecidos pelo anticorpo anti-CEA policlonal foram identificados em 85,5% (65/76) dos casos analisados, 43,4% (33/65) com “escores baixos” (entre 20 e 150) e 42,1% (32/65) apresentando “escores altos” (acima de 150 pontos). A reação imuno-histoquímica resultou negativa em 14,5% (11/76) casos de CHC.

As variáveis quantidade, tamanho, padrão arquitetural e grau de diferenciação do CHC também foram associadas ao escore de positividade para o anticorpo policlonal anti-CEA (Tabela 43).

Tabela 43 - Associação entre reatividade para epítomos reconhecidos pelo anticorpo anti-CEA policlonal e variáveis anatomopatológicas do carcinoma hepatocelular

Variável anatomopatológica	Negativo	Positivo	Total	P
	n (%)			
Número de tumores				
1	4 (17,4)	19 (82,6)	23 (100,0)	1,000
> 1	7 (14,9)	40 (85,1)	47 (100,0)	
Tamanho do tumor				
≤ 2,0cm	1 (7,1)	13 (92,9)	14 (100,0)	0,888
>2,1cm e ≤5,0 cm	3 (14,3)	18 (85,7)	21 (100,0)	
> 5,1 cm	3 (13,6)	19 (86,4)	22 (100,0)	
Padrão arquitetural				
Trabecular	7 (18,9)	30 (81,1)	37 (100,0)	0,455
Pseudoglandular	0 (0,0)	9 (100,0)	9 (100,0)	
Sólido	2 (10,0)	18 (90,0)	20 (100,0)	
Misto	1 (12,5)	7 (87,5)	8 (100,0)	
Grau de diferenciação				
I	0 (0,0)	1 (100,0)	1 (100,0)	0,160*
II	1 (4,8)	20 (95,2)	21 (100,0)	
III	9 (20,0)	36 (80,0)	45 (100,0)	
IV	1 (11,2)	8 (88,8)	9 (100,0)	

*P= (I + II) vs (III+IV)

Não houve variação significativa entre a frequência de positividade observado com o uso de anti-CEA policlonal e os diferentes padrões arquiteturais. Também não foi observada diferença significativa (P=0,719) quando a positividade dos casos de padrão sólido (10%; 2/20 negativos e 90%; 18/20) foi comparada ao total de casos para os demais padrões (14,8%; 8/54 negativos e 85,2%; 46/54 positivos). Este conjunto de dados confirma que a imunorreatividade para CEA no CHC mostrou-se elevada (86,5%=64/74) independentemente (P>0,05) do padrão arquitetural e do grau histológico.

A reação imuno-histoquímica para os dois casos de CHC variante de células claras demonstrou 1 (50,0%) caso negativo e 1 (50,0%) com positividade alta (escore=180) com uso do anticorpo anti-CEA policlonal.

Para os casos de colangiocarcinoma, a reação foi válida em 54 (96,4%) casos. A ausência de área avaliável por exiguidade das amostras pós-processamento das lâminas do TMA não permitiu a análise de 2 (3,6%) casos.

A avaliação da reação imuno-histoquímica para o colangiocarcinoma revelou marcação de intensidade e distribuição variável tanto na membrana lateral dos colangiócitos como também na membrana voltada para o lúmen ductular (padrão circunferencial) e também no citoplasma de colangiócitos, distribuição intracelular diferente do encontrado nos hepatócitos normais e nos CHC, (Figura 16).

Figura 16 - *Expressão de antígenos reconhecidos pelo anticorpo policlonal anti-CEA no colangiocarcinoma. Padrão de expressão de intensidade variável linear na membrana luminal e citoplasma de ductos biliares neoplásicos bem diferenciado (A, 200X) e moderadamente diferenciado (B, 200X).*

A pesquisa imuno-histoquímica de epítomos reconhecidos pelo anticorpo policlonal anti-CEA resultou negativa em apenas 3 (5,5%) casos. Entre os 51 (94,5%) casos positivos, 21 (39%) apresentaram escores “baixos” (20-155 pontos) e 30 (55%) apresentaram escores “altos” (>155 pontos).

As variáveis de localização (topografia), padrão macroscópico de crescimento, tipo histológico e grau de diferenciação do CC foram associadas à reatividade para antígenos canaliculares reconhecidos pelo anticorpo policlonal anti-CEA (A0115) e estão apresentadas na Tabela 44.

Tabela 44 - Associação do escore de positividade para epítomos canaliculares reconhecidos pelo anticorpo anti-CEA e variáveis anatomopatológicas do colangiocarcinoma.

Variável Anatomopatológica	Negativo	Positivo n (%)	Total	P
Topografia				
Intra-hepático periférico	1 (9,1)	10 (90,9)	11 (100,0)	0,502*
Intra-hepático hilar	0 (0,0)	17 (100,0)	17 (100,0)	
Extra-hepático	2 (7,7)	24 (92,3)	26 (100,0)	
Padrão de crescimento				
Formador de massa	3 (15,0)	17 (85,0)	20 (100,0)	0,046* *
Infiltrativo periductal	0 (0,0)	33 (100,0)	33 (100,0)	
Intraductal	0 (0,0)	1 (100,0)	1 (100,0)	
Subtipo histológico				
ductal	1 (2,5)	40 (97,5)	41 (100,0)	0,140#
Ductular malformação de placa	0 (0,0)	4 (100,0)	4 (100,0)	
Ductular células intermediárias	2 (22,2)	7 (77,8)	9 (100,0)	
Grau de diferenciação				
Bem diferenciado	0 (0,0)	31 (100,0)	31 (100,0)	0,071# #
Moderadamente diferenciado	3 (15,8)	16 (84,2)	19 (100,0)	
Pouco diferenciado	0 (0,0)	3 (100,0)	3 (100,0)	
Indiferenciado	0 (0,0)	1 (100,0)	1 (100,0)	

P* = (intra-hepático periférico) vs (intra-hepático hilar + extra-hepático)

P** = (formador de massa) vs (infiltrativo peri-ductal + intra-ductal)

P# = (ductal) vs ductular (malformação de placa + células intermediárias)

P### = (bem diferenciados) vs menos diferenciados (moderadamente + pouco + indiferenciado).

A reação imuno-histoquímica com o anticorpo policlonal anti-CEA mostrou-se positiva em 10 (90,9%) casos entre os colangiocarcinomas com localização intra-hepática periférica e em 41/43 (95,3%) casos entre os

colangiocarcinomas intra-hepático hilar e extra-hepáticos agrupados, sem diferenças significantes ($P>0,05$).

Em relação ao padrão de crescimento, a reação com epítopos canaliculares detectados pelo anticorpo anti-CEA policlonal resultou positiva em 17 (85,0%) casos de padrão formador de massa enquanto, todos os 34 (100,0%) casos de padrão de crescimento infiltrativo ductal e intraductal foram positivos, diferença esta que atingiu nível de significância ($P=0,046$).

A análise dos subtipos histológicos de CC revelou positividade para CEA em 40 (97,5%) casos de padrão ductal e em 11/13 (84,6%) casos de subtipos agrupados ductular com malformação de placa e de células intermediárias. Tais diferenças não atingiram significância estatística.

A reação imuno-histoquímica com o anticorpo anti-CEA policlonal resultou positiva em todos os 31 (100,0%) casos de CC bem diferenciados e em 20 (86,9%) casos positivos entre os CC com menor grau de diferenciação (moderados, poucos e indiferenciados).

A avaliação estatística não revelou diferença significativa entre a positividade observada para os 31 casos bem diferenciados e a análise conjunta dos 23 casos menor grau de diferenciação. Também, não foi observada variação relevante ($P=1,000$) da positividade para epítopos canaliculares com anti-CEA nos casos (3 negativos e 47 positivos) bem e moderadamente diferenciados em relação aos casos (4 positivos) mais anaplásicos (pouco e indiferenciados).

4.3.2 - Antígeno Específico do Hepatócito - Hep-par-1

A reação imuno-histoquímica para o antígeno Hep-par-1 no carcinoma hepatocelular mediante a utilização do anticorpo monoclonal OCH1E5 foi considerada válida para análise em 76 (95,0%) casos.

O padrão de expressão granular do Hep-par-1 com intensidade variável foi observado no citoplasma de hepatócitos normais e neoplásicos (Figura 17).

Figura 17 – Reatividade de Hep-par-1 no carcinoma hepatocelular. Aspecto granular citoplasmático de intensidade variável nos tipos de padrão arquitetural trabecular (A;200x) e pseudoglandular (B;400x).

A pesquisa imuno-histoquímica do antígeno Hep-par-1 no carcinoma hepatocelular resultou positiva em 65 (85,5%) casos, 21,0% (16/65) dos casos apresentando “escores baixos” (entre 20 e 185 pontos) e 64,5% (49/65) apresentando “escores altos” (acima de 185 pontos).

As variáveis quantidade, tamanho, padrão arquitetural e grau de diferenciação do CHC também foram comparadas com a reatividade para Hep-Par1 (Tabela 45).

Tabela 45 – Associação entre reatividade para Hep-par-1 e variáveis anatomopatológicas do carcinoma hepatocelular.

Variável anatomopatológica	Negativo	Positivo	Total	P
	n (%)			
Número de tumores				
1	4 (16,7)	20 (83,3)	24 (100,0)	1,000
> 1	7 (15,5)	38 (84,5)	45 (100,0)	
Tamanho do tumor				
≤ 2,0cm	3 (23,1)	10 (76,9)	13 (100,0)	0,495
>2,1cm e ≤5,0 cm	2 (9,5)	19 (90,5)	21 (100,0)	
> 5,0 cm	5 (21,7)	18 (78,3)	23 (100,0)	
Padrão arquitetural				
Trabecular	5 (13,9)	31 (86,1)	36 (100,0)	0,277
Pseudoglandular	0 (0,0)	9 (100,0)	9 (100,0)	
Sólido	5 (23,8)	16 (76,2)	21 (100,0)	
Misto	0 (0,0)	8 (100,0)	8 (100,0)	
Grau de diferenciação				
I	0 (0,0)	1 (100,0)	1 (100,0)	0,160*
II	1 (4,8)	20 (95,2)	21 (100,0)	
III	6 (14,0)	37 (86,0)	43 (100,0)	
IV	4 (36,4)	7 (63,6)	11 (100,0)	

*P= (I + II) vs (III+IV)

Não foram observadas associações significativas ($P>0,05$) entre a frequência de positividade e as variáveis anatomopatológicas dos CHC, comprovando que a reatividade para o Antígeno Específico do Hepatócito -1 permanece elevada independente dos parâmetros avaliados.

A reação imuno-histoquímica para os dois casos de CHC variante de células claras demonstrou 1 (50,0%) caso negativo e 1 (50,0%) com positividade alta (escore=400) com uso do anticorpo anti-Hep-par-1.

A reação imuno-histoquímica para Hep-par-1 nos colangiocarcinomas foi válida em 53 (94,6%) casos, resultando positiva em 6 (11,4%) casos, 5,7% (3/53)

dos casos com “escores baixos” (entre 20 e 40 pontos) e 5,7% (3/53) com “escores altos” (acima de 40 pontos).

O padrão granular de expressão do Hep-par-1 foi observado no citoplasma de colangiócitos de 6 casos, um dos quais apresentou revisão histológica com predomínio de células progenitoras sem grandes evidências de maturação (Figura 18A). Dois outros casos mostraram positividade escassa em células menores (progenitoras?) em meio a colangiócitos diferenciados. Os demais 3 casos corresponderam a adenocarcinoma de padrão ductal com características clássicas e indubitáveis de colangiocarcinoma (Figura 18B).

Figura 18 - Reatividade de Hep-par-1 no colangiocarcinoma. Aspecto granular de intensidade moderada em células menores, provavelmente progenitoras (A, 200X) e nos colangiócitos neoplásicos bem diferenciados (B, 200X).

As variáveis de localização, padrão macroscópico de crescimento, tipo histológico e grau de diferenciação do CC foram associadas ao escore de positividade para Hep-Par1 (Tabela 46).

Tabela 46 - Associação entre a reatividade para Hep-par-1 e variáveis anatomopatológicas do colangiocarcinoma.

Variável Anatomopatológica	Negativo	Positivo n (%)	Total	P
Topografia				
intra-hepático periférico	10 (100,0)	0 (00,0)	10 (100,0)	0,587*
intra-hepático hilar	23 (88,5)	3 (11,5)	26 (100,0)	
extra-hepático	14 (88,3)	3 (11,7)	17 (100,0)	
Padrão de crescimento				
Formador de massa	17 (89,4)	2 (10,5)	19 (100,0)	1,000**
Infiltrativo peri-ductal	29 (87,8)	4 (12,2)	33 (100,0)	
intra-ductal	1 (100,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	
Subtipo histológico				
ductal	37 (90,3)	4 (9,7)	41 (100,0)	0,608#
ductular malformação de placa	4 (100,0)	0 (0,0)	4 (100,0)	
ductular células intermediárias	6 (75,0)	2 (25,0)	8 (100,0)	
Grau de diferenciação				
Bem diferenciado	29 (93,5)	2 (6,5)	31 (100,0)	0,219##
Moderadamente diferenciado	15 (83,4)	3 (16,6)	18 (100,0)	
Pouco diferenciado	3 (100,0)	0 (0,0)	3 (100,0)	
Indiferenciado	0 (0,0)	1 (100,0)	1 (100,0)	

*P**= (intra-hepático periférico) vs (intra-hepático hilar + extra-hepático)

*P***= (formador de massa) vs (infiltrativo peri-ductal + intra-ductal)

P#= (ductal) vs ductular (malformação de placa + células intermediárias)

P###= (bem diferenciados) vs menos diferenciados (moderadamente + pouco + indiferenciado).

Não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os escores de positividade e as variáveis anatomopatológicas mencionadas, inclusive quanto ao grau histológico, demonstrando que, ainda que em níveis baixos, os vários tipos de apresentação dos CC podem mostrar reatividade pelo menos focal de expressão de Hep-Par-1.

4.3.4 - Arginase – 1

A reação imuno-histoquímica para arginase-1 no carcinoma hepatocelular foi válida para análise em 75 (93,7%) casos. Resultou negativa em 6 (8,0%) casos e positiva em 69 (92,0%) casos, com 13 casos (17,3%) apresentando “escores baixos” (entre 20 e 255 pontos) e 56 (74,7%) com “escores altos” (acima de 40 pontos).

A expressão citoplasmática e nuclear de Arginase-1 foi observada tanto nos hepatócitos normais como nos neoplásicos (Figura 19).

Figura 19 - Reatividade para Arginase-1 em carcinoma hepatocelular. Padrão citoplasmático e nuclear de intensidade variável no padrão arquitetural macrotrabecular/sólido graus 2 (A: 400X) e 4 (B: 200X).

A Tabela 47 apresenta a relação entre a distribuição das variáveis quantidade, tamanho, padrão arquitetural e grau de diferenciação do CHC com a reatividade para Arginase-1.

Tabela 47 - Associação entre a reatividade para Arginase-1 e variáveis anatomopatológicas do carcinoma hepatocelular.

Variável anatomopatológica	Negativo	Positivo	Total	P
	n (%)			
Número de tumores				
1	3 (14,3)	18 (85,7)	21 (100,0)	0,363
> 1	3 (6,4)	44 (93,6)	47 (100,0)	
Tamanho do tumor				
≤ 2,0cm	0 (0,0)	13 (100,0)	13 (100,0)	0,329
>2,1cm e ≤5,0 cm	3 (15,8)	16 (84,2)	19 (100,0)	
> 5,1 cm	3 (14,3)	18 (85,7)	21 (100,0)	
Padrão arquitetural				
Trabecular	3 (8,8)	31 (91,2)	34 (100,0)	0,540
Pseudoglandular	0 (0,0)	9 (100,0)	9 (100,0)	
Sólido	3 (13,0)	20 (87,0)	23 (100,0)	
Misto	0 (0,0)	7 (100,0)	7 (100,0)	
Grau de diferenciação				
I	0 (0,0)	1 (100,0)	1 (100,0)	0,176*
II	0 (0,0)	20 (100,0)	20 (100,0)	
III	5 (11,6)	38 (88,4)	43 (100,0)	
IV	1 (9,1)	10 (90,9)	11 (100,0)	

*P= (I + II) vs (III+IV)

Não foram observadas associações significativas ($P > 0,05$) entre a reatividade para Arginase-1 e as variáveis anatomopatológicas mencionadas, comprovando que reatividade para o Arginase-1 permaneceu elevada independentemente dos parâmetros avaliados.

Os dois casos de CHC variante de células claras apresentaram reação negativa para Arginase-1.

A reação imuno-histoquímica para Arginase-1 no colangiocarcinoma foi válida em 52 (92,8%) casos. A ausência de área avaliável por exiguidade das amostras pós-processamento das lâminas do TMA não permitiu a análise de 1 (1,8%) caso. O uso do anticorpo policlonal Arginase-1 ofereceu em algumas

reações menor contraste positivo/fundo do que obtido com outros marcadores aqui utilizados. A reação de fundo tornou inválidos 3 (5,4%) casos.

A reação imuno-histoquímica para Arginase-1 foi negativa nos casos de adenocarcinoma ductal com características clássicas de colangiocarcinoma. Contudo, dois (3,84%) casos exibiram reatividade para Arginase-1, sendo um dos quais apresentando revisão histológica com predomínio de células progenitoras sem grandes evidências de maturação (Figura 20A) e um caso apresentou reatividade escassa em células menores (progenitoras?) em meio a colangiócitos diferenciados (Figura 20B).

Figura 20 - Reatividade para Arginase-1 em células progenitoras (A, 200X) e em células menores permeando colangiócitos maduros (B, 200X).

A comparação da presença de variáveis de localização, padrão de crescimento macroscópico, tipo histológico e grau de diferenciação do CC com a reatividade para a Arginase-1 é apresentada na Tabela 48.

Tabela 48 - Associação entre a reatividade para Arginase-1 e variáveis anatomopatológicas do colangiocarcinoma.

Variável Anatomopatológica	Negativo	Positivo n (%)	Total	P
Topografia				
intra-hepático periférico	8 (81,8)	2 (18,2)	10 (100,0)	0,033*
intra-hepático hilar	25 (100,0)	0 (0,0)	25 (100,0)	
extra-hepático	17 (100,0)	0 (0,0)	17 (100,0)	
Padrão de crescimento				
Formador de massa	17 (90,0)	2 (10,0)	19 (100,0)	0,129**
Infiltrativo peri-ductal	32 (100,0)	0 (0,0)	32 (100,0)	
intra-ductal	1 (100,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	
Subtipo histológico				
ductal	40 (100,0)	0 (0,0)	40 (100,0)	0,049#
ductular malformação de placa	3 (75,0)	1 (25,0)	4 (100,0)	
ductular células intermediárias	7 (88,8)	1 (11,2)	8 (100,0)	
Grau de diferenciação				
Bem diferenciado	31 (100,0)	0 (0,0)	31 (100,0)	0,158##
Moderadamente diferenciado	15 (89,5)	2 (10,5)	17 (100,0)	
Pouco diferenciado	3 (100,0)	0 (0,0)	3 (100,0)	
Indiferenciado	1 (100,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	

*P**= (intra-hepático periférico) vs (intra-hepático hilar + extra-hepático)

*P***= (formador de massa) vs (infiltrativo peri-ductal + intra-ductal)

P#= (ductal) vs ductular (malformação de placa + células intermediárias)

P###= (bem diferenciados) vs menos diferenciados (moderadamente + pouco + indiferenciado).

Não foram observadas associações significativas ($P > 0,05$) entre a frequência de reatividade para Arginase-1 e as variáveis, padrão de crescimento e grau de diferenciação do CC.

Em relação à topografia, 2/11 (18,2%) casos de CC intra-hepático periféricos foram positivos para Arginase-1 enquanto, nenhum dos 43 casos agrupados de CC hilar e extra-hepático exibiu reatividade para o marcador. Tais dados mostram que a expressão de Arginase-1 nos casos de CC intra-hepáticos periféricos foi significativamente superior à encontrada para as demais localizações da neoplasia.

Em relação ao tipo histológico, a reatividade para Arginase-1 foi negativa nos casos do tipo ductal e positiva em 2/12 (16,6%) casos agrupados do tipo ductular (com malformação de placa e de células intermediárias). Tais dados mostram que a expressão de Arginase-1 nos casos de tipo histológico ductular foi significativamente superior à encontrada no tipo ductal ($P=0,049$).

4.4 – Comparação do desempenho dos anticorpos anti-transportadores biliares BSEP e MDR3 com o de outros marcadores diagnósticos de neoplasia hepática

Os anticorpos anti-BSEP monoclonal F6 e policlonal HPA01935 propiciaram reações IHQ positivas em 77,3% e 75,9%, respectivamente no carcinoma hepatocelular, não havendo nenhum sinal positivo em qualquer dos casos de colangiocarcinoma, devendo apenas ser relatado o encontro de maior contraste sinal – fundo com uso do anticorpo monoclonal F6.

A pesquisa IHQ com o anticorpo monoclonal anti-MDR3 resultou positiva em apenas 56,4% dos casos de carcinoma hepatocelular, com sensibilidade inferior à obtida com BSEP. Por outro lado, merece menção a ausência de detecção da proteína transportadora MDR3 em 100% (54/54) dos casos avaliados de colangiocarcinoma.

A reatividade da proteína MRP2 foi detectada em 92,3% (72/78) dos casos de carcinoma hepatocelular e 96,4% (54/56) dos colangiocarcinomas, coerente com o encontro de reatividade para este marcador tanto em hepatócitos como em colangiócitos não neoplásicos.

A pesquisa imuno-histoquímica para a proteína MRP3 resultou positiva (escore >10) em apenas 15 dos 80 (18,8%) casos de CHC e 24 dos 56 (44,5%) de casos de CC. A reduzida expressão desta proteína em ambas as neoplasias

não permite definir este anticorpo como relevante para o diagnóstico destas neoplasias.

Portanto, as proteínas transportadoras BSEP e MDR3 foram eleitas para a comparação de imunorreatividade com CEA, Hep-par-1 e Arginase-1 nos CHC e CC menos diferenciados:

4.4.1 - Anti-BSEP policlonal e Anti-BSEP monoclonal

Dentre os 75 casos de carcinoma hepatocelular comuns às reações realizadas com os anticorpos anti-BSEP monoclonal F6 e anti-BSEP policlonal HPA019035, 69 (92%) casos apresentaram resultados concordantes e 6 (8,0%) apresentaram resultados discordantes para os marcadores avaliados.

Para os casos concordantes, 14 (20,2%) casos foram negativos e 55 (79,8%) casos foram positivos.

Dos resultados discordantes, 3 (50,0%) casos apresentaram reação positiva para o anticorpo BSEP monoclonal e negativa para BSEP policlonal. Os outros 3 (50,0%) casos demonstraram resultado inverso: negativos para BSEP monoclonal e positivos para a reação com BSEP policlonal. Independentemente, da discordância, 5 casos (83,3%) apresentaram escores baixo de positividade, escore 20 e apenas 1 (16,7%) caso apresentando escore 60.

O único caso de tumor primário de carcinoma hepatocelular que não pode ser avaliado para BSEP policlonal também não pode ser analisado para BSEP monoclonal. Já os outros 4 casos que não puderam ser avaliados para BSEP monoclonal, 2 se mostraram negativos e 2 exibiram positividade com intensidade 2+ para BSEP policlonal.

Vale repetir que todos (100%) os casos de colangiocarcinoma foram negativos para BSEP monoclonal e também para BSEP policlonal.

Dos 3 casos que não foram validados para análise da reação de BSEP policlonal nos tumores de colangiocarcinoma, 1 também não foi validado para BSEP monoclonal e os 2 restantes foram negativos para o anticorpo monoclonal.

Os anticorpos policlonal HPA019035 e monoclonal F6 apresentaram desempenho similar ($P=0,8515$) para o reconhecimento da proteína transportadora BSEP no carcinoma hepatocelular e no colangiocarcinoma. Entretanto, a reação imuno-histoquímica com o anticorpo policlonal HPA019035 resultou em 7 (8,9%) casos de CHC com escore 10 (intensidade 1+ X extensão da positividade em até 10% das células neoplásicas) cuja qualidade da expressão foi considerada duvidosa e possivelmente espúria, por isso, classificados como negativos (Figura 21).

Desta maneira, os resultados observados para a reação IHQ com o anticorpo monoclonal anti-BSEP F6 foram escolhidos para a comparação do desempenho da positividade nos casos mais anaplásicos de carcinoma hepatocelular e de colangiocarcinoma.

figura 21 - Reação imuno-histoquímica para BSEP considerada negativa para o carcinoma hepatocelular. (A) escore 0 observada com uso do anticorpo monoclonal F6 e (B) escore 10 com o uso do anticorpo policlonal HPA019035 (400X).

4.4.2 - Anti-BSEP monoclonal e Anti- MDR3

Setenta e cinco casos de carcinoma hepatocelular foram comuns às reações realizadas com os anticorpos anti-BSEP monoclonal F6 e anti-MDR3. Destes, 41(74,5%) casos foram considerados positivos e 14 (25,5%) negativos para ambos os anticorpos, totalizando 55 casos com resultados concordantes.

Dentre os casos com resultados divergentes para os dois anticorpos, 18 (3 casos com grau histológico de diferenciação II, 12 casos grau III e 3 casos grau IV) foram considerados positivos para a reação imuno-histoquímica com o anticorpo monoclonal anti-BSEP e negativos para a reação com anticorpo anti-MDR3. Em apenas 2 casos (grau II), a pesquisa IHQ foi negativa com o uso do anti-BSEP e positiva com o uso de anti-MDR3.

Em relação aos casos mais anaplásicos de CHC (grau III+ grau IV), constatamos reação positiva em 73,6% (39/53) casos com anti-BSEP monoclonal, sendo 46,4% (26/56) a positividade obtida anti-MDR3.

Todos os casos de colangiocarcinomas tiveram reações negativas para as proteínas transportadoras BSEP e MDR3 (100%).

4.4.3 - Anti-BSEP monoclonal e anti-CEA policlonal

Dentre os 75 casos de CHC válidos para ambos marcadores, 59 mostraram resultados concordantes, 54 (91,5%) positivos e 5 (8,5%) negativos. Dos 16 casos com resultado discordante, 6 (37,5%) foram positivos com o anti-BSEP monoclonal F6 e negativos com o anti-CEA policlonal. Dentre esses, 1 caso correspondia a CHC grau II, 4 casos grau III e 1 caso grau IV). É importante ressaltar que 10 casos tiveram reação negativa com o uso do anticorpo anti-BSEP monoclonal e positiva com anti-CEA policlonal. (2 casos grau II e 4 casos grau III e 3 graus IV).

A comparação dos 73,6% (39/53) casos positivos com anti-BSEP monoclonal em relação aos 81,4% (44/54) casos positivos com o anticorpo anti-CEA policlonal para os casos CHC mais anaplásicos (grau III+ grau IV) não demonstrou variação significativa ($P=0,361$) da imunoexpressão destas proteínas nos casos menos diferenciados.

Dos 54 casos de colangiocarcinoma comparados, 51(94,4%) apresentaram positividade apenas para a pesquisa com o anticorpo anti-CEA policlonal e 3 (5,6%) foram considerados negativos nas reações IHQ para ambos os anticorpos.

A pesquisa imuno-histoquímica para epítomos reconhecidos pelo anticorpo anti-CEA policlonal foi positiva em 87% (20/23) casos considerados mais

anaplásicos de CC. A comparação com a reação IHQ para BSEP demonstrou redução significativa ($P=0,0001$) da imunoexpressão de BSEP nos casos menos diferenciados.

4.4.4 - Anti-BSEP monoclonal e anti-Hep-par-1

O desempenho dos anticorpos anti-BSEP monoclonal F6 e anti-Hep-par-1 pode ser comparado em 76 amostras. Em 61(80,3%) casos, o resultado da reação IHQ foi similar para ambos os anticorpos: 55 (90,2%) casos positivos e 6 (9,8%) casos negativos. Resultados diferentes foram observados em 14 casos, sendo 4 (28,6%) casos (1 caso grau II, 1 caso grau III e 2 casos grau IV) positivos para pesquisa IHQ com anti-BSEP monoclonal F6 e negativos com o anticorpo anti-Hep-par-1. Em 10 (71,4%) casos (3 casos grau III 4 graus III e 3 graus IV) foram considerados negativos para a reação IHQ com anti-BSEP monoclonal e negativo para reação com anti-Hep-par-1.

A comparação dos 73,6% (39/53) casos positivos com anti-BSEP monoclonal em relação aos 81,4% (44/54) casos positivos observados com o anticorpo Hep-par-1 para os casos de CHC mais anaplásicos (grau III+ grau IV) não demonstrou variação significativa ($P=0,361$) da imunoexpressão destas proteínas nos casos menos diferenciados.

Cinquenta e três casos de colangiocarcinoma foram comparados para ambos os anticorpos com a concordância dos resultados negativos em 47(88,7%) casos. A reação IHQ para Hep-par-1 resultou positiva em 6 (11,3%) casos.

A pesquisa imuno-histoquímica para Hep-par-1 foi positiva em 13,6% (3/22) casos considerados mais anaplásicos de CC. A comparação com a reação

IHQ para BSEP demonstrou redução significativa ($P=0,0001$) da imunoexpressão de BSEP nos casos menos diferenciados.

4.4.5 - Anti-BSEP monoclonal e anti-Arginase-1

Todos os setenta e cinco casos de carcinoma hepatocelular validados para as reações imuno-histoquímicas com os anticorpos anti-BSEP monoclonal e anti-Arginase-1 puderam ser comparados entre si.

Entre 62 (82,7%) casos com resultados concordantes, 4 (6,4%) foram negativos e 58 (93,6%) positivos para as pesquisas IHQ com os anticorpos anti-BSEP monoclonal e anti-Arginase-1. Dos 13 casos com resultados discordantes, 1(7,7%) caso (grau III) foi positivo com o anticorpo anti-BSEP monoclonal F6 e negativo com o anti-Arginase. E, a reação IHQ resultou negativa com o uso do anticorpo anti-BSEP monoclonal e positiva com antiArginase-1 em 12 (92,3%) casos (3 casos grau II e 5 casos grau III e 4 graus IV).

A comparação dos 73,6% (39/53) casos positivos e 26,4% (14/53) dos casos negativos com anti-BSEP monoclonal em relação aos 88,9% (48/54) dos casos positivos e 11,1% (6/54) dos casos negativos observados com o anticorpo Arginase-1 não demonstrou variação significativa ($P=0,050$) da imunoexpressão destas proteínas nos casos de CHC mais anaplásicos (grau III+ grau IV),

Em relação ao colangiocarcinoma, 52 casos validados para as reações imuno-histoquímicas com os anticorpos anti-BSEP monoclonal e anti-Arginase-1 puderam ser comparados entre si. A avaliação resultou em concordância de 50 (96,2%) casos considerados negativos para as reações IHQ com ambos os anticorpos e divergência em 2 (3,8%) casos (2 intra-hepáticos periféricos moderadamente diferenciados) considerados positivos apenas para a pesquisa com o anticorpo anti-Aginase-1.

A reação imuno-histoquímica foi negativa para BSEP em todos os 23 (100%) casos menos diferenciados e positiva para a Arginase-1 em 2/21 (9,5%) casos menos diferenciados. A comparação com a reação IHQ para BSEP não demonstrou variação expressiva ($P=0,222$) da imunoexpressão entre os dois marcadores para os casos menos diferenciados.

4.4.6 - Anti- MDR3 e Anti-CEA policlonal

Entre 50 casos de carcinoma hepatocelular com resultados concordantes, 9 (18,0%) foram negativos e 41(82,0%) positivos para as pesquisas IHQ com os anticorpos anti-MDR3 monoclonal e anti-CEA policlonal. Dos 26 casos com resultado discordante, 4 (15,4%) (1 caso grau II, 4 casos grau III e 1 caso grau IV) foram positivos com o anti-MDR3 e negativos com o anti-CEA policlonal. Em 22 (84,6%) casos (2 casos grau II e 4 casos grau III e 3 graus IV) a reação IHQ resultou negativa com o uso do anticorpo anti-MDR3 e positiva com anti-CEA monoclonal.

Para os casos mais anaplásicos de CHC (grau III+ grau IV), a comparação dos 46,4% (26/56) casos positivos com anti-MDR3 em relação aos 81,4% (44/54) casos positivos com anti-CEA policlonal demonstrou redução significativa ($P=0,002$) da imunoexpressão de MDR3 nos casos menos diferenciados.

Todos os 54 casos de colangiocarcinoma foram comparados para as reações IHQ para ambos os anticorpos. Cinquenta e um casos apresentaram positividade apenas para a pesquisa com o anticorpo anti-CEA policlonal e 3 (5,5%) foram considerados negativos nas reações IHQ para ambos os anticorpos.

A reação imuno-histoquímica foi negativa para MDR3 em todos os 23 (100%) casos mais anaplásicos de colangiocarcinoma e positiva para a epítomos

reconhecidos pelo anticorpo anti-CEA policlonal em 87% (20/23) casos menos diferenciados. A comparação com a reação IHQ para MDR3 demonstrou redução significativa ($P=0,0001$) da imunoexpressão de MDR3 nos casos menos diferenciados.

4.4.7 - Anti- MDR3 e anti-Hep-par-1

Setenta e cinco casos de carcinoma hepatocelular foram comuns às reações realizadas com os anticorpos anti-MDR3 e anti-Hep-par-1. Destes, 55 (90,2%) casos foram considerados positivos e apenas 6/61 (9,8%) negativos para ambos os anticorpos.

Entre os 14 casos, cujos os resultados foram divergentes para os dois anticorpos, 4 (28,5%) casos (1 caso grau II, 1 grau III e 2 grau IV) foram considerados positivos para a reação imuno-histoquímica com o anticorpo anti-MDR3 e negativos para a reação com anticorpo anti-Hep-par-1. Em dez (71,4%) casos (3 grau II, 4 grau 3 e 3 casos grau IV), a pesquisa IHQ foi negativa com o uso do anti-MDR3 e positiva com o uso de anti-Hep-par-1.

Enquanto, 46,4% (26/56) dos casos de CHC menos diferenciados (grau III+ grau IV) foram positivos com anti-MDR3, 81,4% (44/54) dos casos expressaram a proteína Hep-par-1. Houve redução significativa ($P=0,0002$) da imunoexpressão de MDR3 nos casos mais anaplásicos.

Todos os 54 casos de colangiocarcinoma foram comparados para as reações IHQ para ambos os anticorpos. As pesquisas IHQ para MDR3 e Hep-par-1 resultaram negativas em 47 (87,0%) casos e, positivas somente para Hep-par-1 em 6 (12,8%) casos (3 bem diferenciados, 2 moderadamente e 1 indiferenciado).

A imunorreatividade para Hep-par-1 foi detectada em 13,7% (3/19) casos menos diferenciados de CC avaliados. Comparando a expressão de MDR3 e Hep-par-1 nos casos mais anaplásicos, foi verificada ausência de variação significativa ($P=0,108$) da detecção destas proteínas nos casos avaliados.

4.4.8 - Anti-MDR3 e anti-Arginase-1

Dos 75 casos de tumores primários de carcinoma hepatocelular comuns às reações realizadas com os anticorpos anti-MDR3 e anti-Arginase-1, 46 (61,3%) casos apresentaram resultados concordantes e 29 (38,7%) apresentaram resultados discordantes para estes marcadores.

Para os casos concordantes, 5 (10,9%) casos foram negativos e 41 (89,1%) casos foram positivos.

Dos resultados discordantes, 1 (3,4%) único caso apresentou reação positiva para o anticorpo anti-MDR3 e negativa para Arginase-1. Enquanto, 28 (96,5%) casos foram negativos para a pesquisa com o anticorpo anti-MDR3 e positivos para Arginase-1.

Em relação aos casos mais anaplásicos de CHC (grau III+ grau IV), a comparação dos 46,4% (26/56) casos positivos com o uso do anticorpo anti-MDR3 e dos 21,7% (5/23) casos positivos para a expressão de Arginase-1 demonstrou redução significativa ($P=0,0001$) da imunoexpressão de MDR3 nos casos menos diferenciados.

Cinquenta e dois casos de colangiocarcinoma puderam ser comparados para as reações IHQ e os dois anticorpos. As pesquisas para MDR3 e Arginase-1 resultaram negativas em 50 (96,2%) casos e positivas somente para Arginase-1 em 2 (3,8%) casos.

Enquanto, todos os 23 casos menos diferenciados de colangiocarcinoma foram negativos para as reações IHQ com anti-MDR3, 2/21 casos moderadamente diferenciados foram positivos para a Arginase-1. Comparando a expressão de MDR3 e Arginase-1 nos casos menos diferenciados, não foi observada variação significativa ($P=0,222$) da expressão destas proteínas nos casos avaliados.

5 - DISCUSSÃO

Diante das crescentes evidências da importância das proteínas transportadoras biliares na função de hepatócitos e de colangiócitos, bem como de escassos trabalhos sugerindo sua preservação em várias neoplasias hepáticas, efetuamos um estudo transversal retrospectivo que buscou caracterizar, por imuno-histoquímica, a expressão de proteínas ABC relacionadas ao transporte biliar em série de casos colecionados em tissue microarray de carcinoma hepatocelular e colangiocarcinoma (intra-hepático e extra-hepático), com ênfase às formas menos diferenciadas desses dois principais padrões de adenocarcinomas primários do fígado.

5.1 – BSEP – Bomba de Exportação de Ácidos Biliares

Bomba de Extrusão de Ácidos Biliares (BSEP) é um polipeptídeo transmembrânico que, em condições normais, é expresso apenas na membrana apical (canalicular) dos hepatócitos. É o principal determinante da formação e fluxo da bile sendo responsável pelo transporte de ácidos biliares conjugados monovalentes para o interior do canalículo biliar.^(34,40) A ausência desta proteína está intrinsecamente relacionada o espectro de fenótipos de colestase (colestase intra-hepática benigna recorrente e à colestase familiar intra-hepática do tipo 2).^(41,42)

No nosso estudo, foram avaliados dois anticorpos para estudar os epitopos da proteína transportadora BSEP: o anticorpo policlonal HPA019035 (Sigma-Aldrich) e o anticorpo monoclonal F6 (Santa Cruz).

No carcinoma hepatocelular, a reação com BSEP policlonal resultou positiva em 75,9% (60/79) dos casos e aquela efetuada com BSEP monoclonal F6 em 77,3% (58/75) dos casos. No colangiocarcinoma, a reação para BSEP mostrou-se igualmente negativa em 100% dos casos com o uso destes dois anticorpos, evidenciando boa sensibilidade e elevada especificidade similares para a avaliação das neoplasias estudadas.

A reação imuno-histoquímica com o anticorpo monoclonal anti-BSEP, entretanto, não apresentou casos considerados duvidosos (escore 10 = intensidade 1+ e frequência de até 10% de células positivas) e desta forma, permitiu demonstrar um melhor contraste positivo-negativo na reação IHQ por isso, foi considerado como o anticorpo para avaliação de BSEP que apresentou melhor desempenho.

Escassos estudos, atualmente, abordam com interesse diagnóstico a expressão de BSEP nas neoplasias hepáticas.

Zollner e colaboradores⁽¹³⁵⁾ analisaram a variação da expressão de proteínas transportadoras como potencial fator preditivo de quimiorresistência e encontraram positividade em todos os 10 casos de CHC (5 de padrão trabecular e 5 pseudoglandular) de amostras congeladas, não tendo sido explicitada a origem e a clonalidade do anticorpo utilizado.

Um estudo de 2005 conduzido por Borght e colaboradores⁽¹³⁷⁾ avaliou a expressão de proteínas transportadoras em adenoma hepatocelular e hiperplasia nodular focal (HNF), comparando com os CHC bem diferenciados em pacientes não-cirróticos como potenciais marcadores de diagnóstico diferencial. O uso de anticorpo policlonal anti-BSEP propiciou positividade em todas as amostras parafinadas de adenomas e de HNF. Tal reação resultou positiva em apenas 3 (37,5%) dos 8 casos de CHC bem diferenciado. Tais achados, de uma parte, demonstram que a transformação maligna é acompanhada de redução de expressão de BSEP, explicável porque várias propriedades de especialização e de funcionalidade da célula madura são perdidas na carcinogênese ⁽¹⁴⁵⁾. Por outro lado, esses resultados são desanimadores quanto à capacidade de detecção de verdadeiros CHC por meio de tal reação, que pode ser considerada pouco sensível.

Diferentemente dos resultados citados, observamos em nosso estudo constituído predominantemente de CHC ocorrendo em fígados cirróticos (90%,72/80), uma alta expressão de BSEP nos CHC bem diferenciados (Graus I e II) pois a reação IHQ resultou positiva em 86,4% (19/22) dos casos com o uso

do anticorpo monoclonal e em 90,9% (20/22) dos casos com o anticorpo policlonal.

Dez anos após o primeiro relato da investigação da expressão de BSEP em CHC, Lagana e colaboradores, 2015⁽¹³⁸⁾ avaliaram a mesma proteína transportadora numa casuística mais expressiva colecionada em TMA e visando a possibilidade de aplicação diagnóstica mediante uso do anticorpo monoclonal F6 anti-BSEP. Aqueles autores, definindo positividade como reação presente em qualquer conjunto de células, observaram reatividade em 43 dentre 48 (90%) amostras de CHC fixadas em formol e incluídas em parafina. Importa relatar que Lagana e colaboradores estudaram 39 casos que apresentavam grau histológico I ou II e 9 casos graus III e IV. Aqueles autores destacaram ainda que, dentre os 43 casos positivos, 7 casos exibiram a reatividade em menos de 10% células positivas (“focal”). Assim, 36 casos (75,0%) dos casos de Lagana e colaboradores preenchem os critérios de positividade para um cutpoint de 10%.

Em nossa presente pesquisa, usando o mesmo anticorpo monoclonal F6 anti-BSEP e também amplificação mediante reação com polímeros curtos conjugados com peroxidase, obtivemos resultados muito similares aos de Lagana e colaboradores, com 58/75 casos com reatividade em mais de 10% das células tumorais. Nossos resultados, com uso de anticorpo policlonal, são muito similares se considerarmos negativos os 7 casos em que a reatividade foi observada em menos de 10% das células neoplásicas.

Além de estudarmos a definição de positividade compondo intensidade e estimativa de fração de células positivas, abordamos também os padrões de expressão de BSEP. Na nossa casuística, mais de um padrão de expressão foi predominantemente encontrado na membrana (80% com o anticorpo monoclonal e 79,3% com o anticorpo policlonal) e, conseqüentemente, não foram encontrados casos apresentando padrão de expressão unicamente puntiforme, diferente dos 10 (“dot-like”) casos observados por Lagana e colaboradores. Além disso, o padrão de expressão acinar observado na membrana das células neoplásicas provavelmente está relacionado a dilatação das estruturas

canaliculares biliares dos ácinos formados pelo CHC de padrão arquitetural pseudoglandular.

Outro ponto importante do nosso estudo, foi a análise da expressão de BSEP conforme o grau histológico, já que são os casos menos diferenciados (graus III e IV de Edmondson – Steiner) aqueles que, à morfologia, mais geram dúvidas quanto ao órgão e à linhagem de origem e, portanto, os que mais requerem estudos imuno-histoquímicos complementares.

A casuística estudada por Lagana (2015) constituiu-se de 39 (81,3%) casos graus I e II e apenas 9 (18,7%) casos graus III e IV, ou seja, a maioria dos casos eram bem diferenciados. Dos casos agrupados nos graus I e II, 36 (92%) foram positivos. Já dentre os 9 casos classificados como graus III e IV, a positividade foi um pouco inferior, ou seja 78% (7/9).

Nossa casuística diferiu bastante daquela estudada por Lagana, pois, além de mais numerosa, nossa série teve menor proporção de casos (27,5%) graus I e II, contrastando com a maior proporção (72,5%) de casos graus III e IV. Assim, nossos resultados, com o mesmo anticorpo, apontaram uma expressão de BSEP ligeiramente inferior (73,6%, 39/53) para os casos menos diferenciados. Da mesma forma, observamos redução significativa da expressão de BSEP, com uso do anticorpo monoclonal anti-BSEP e mais acentuada com o uso do anticorpo policlonal anti-BSEP, nos casos que apresentavam o padrão sólido, considerado o padrão mais complexo, associado a menor diferenciação no plano arquitetural. A maior perda de reatividade observada com o anticorpo policlonal anti-BSEP em CHC de padrão arquitetural sólido e de grau histológico menos diferenciados provavelmente é atribuível ao fato de alguns destes casos terem apresentado como resultado o escore 10, limítrofe na interpretação positivo vs negativo.

Em nosso estudo, não foi observada associação importante da expressão de BSEP e o número e tamanho dos nódulos de CHC, variáveis consideradas como critério para o estadiamento da lesão neoplásica associadas à predição de recorrência e de sobrevida.⁽¹⁴⁶⁾

Nugyen e colaboradores, 2015,⁽¹³⁹⁾ compararam a positividade de diversos marcadores de diferenciação e de linhagem celular hepatocitária e incluíram o anticorpo BSEP monoclonal (F6) para avaliar 79 amostras parafinadas de biopsias hepáticas com diferentes graus de diferenciação. A casuística foi constituída de 13 (14%) casos bem diferenciados, 41(44%) moderadamente diferenciados e 39 (42%) pouco diferenciados. Foram considerados positivos os casos com mais de 5% reativas em intensidade moderada ou forte. A reação para BSEP com uso do anticorpo monoclonal F6 foi considerada positiva na maioria dos casos bem diferenciados (92% dos casos entre 5 e 50% de positividade e 69% dos casos acima de 50% de positividade) e menos da metade dos casos pouco diferenciados (45% dos casos entre 5 e 50% e 6% dos casos acima de 50% de positividade). Tais resultados, segundo aqueles autores, são semelhantes ou menos favoráveis do que os resultados encontrados para a sensibilidade dos anticorpos Hep-par-1 e Glipican 3, e, como tal, sua conclusão é que a adição de BSEP ao painel diagnóstico diferencial não seria útil.

Em nosso estudo, observamos uma sensibilidade similar para os anticorpos BSEP monoclonal, Hep-par-1 e CEA policlonal tanto para a detecção de casos de CHC em geral ($P=0,156$), bem como especificamente para os casos menos diferenciados ($P=0,361$), discordando, portanto, dos resultados e da proposição final de Nugyen e colaboradores, 2015.

Reforça ainda nossa valorização da utilidade do anticorpo monoclonal F6 anti-BSEP o encontro de sua expressão em 6 casos cuja pesquisa de Hep-Par-1 havia resultado negativa e em 4 casos que foram negativos para pesquisa IHQ com o anticorpo anti-CEA policlonal.

Demonstrando a necessidade atual de busca de marcadores diagnósticos mais eficientes para CHC, ao início de 2016 Fujikura e colaboradores⁽¹⁴⁰⁾ avaliaram o anticorpo BSEP policlonal (HPA 019035) e o anticorpo transportador de fosfolípidios MDR3 comparando-os com Hep-par-1 e Arginase-1 nas amostras de CHC, ICC, carcinoma hepatóides e carcinomas indiferenciados detectados no fígado, mas sem diagnóstico específico (SOE). Foram incluídos

na pesquisa, 54 casos de amostras parafinadas de CHC (33 bem a moderadamente diferenciados e 21 pouco diferenciados) e avaliadas com o anticorpo policlonal HPA019035. Fujikura e colaboradores definiram como positivos os casos com intensidade moderada a forte em pelo menos 5% de células tumorais. A reação com BSEP policlonal foi positiva em 91% (49/54) dos casos de CHC, com imunoexpressão em 100% (33/33) dos casos com bem a moderada diferenciação e com sensibilidade mais reduzida (76%; 16/21) nos pouco diferenciados. Aqueles pesquisadores advogam a favor da utilização do BSEP e de MDR3 (sensibilidade de 83%) em relação a Hep-par-1 (93%) e Arginase-1 (96%) porque os transportadores ABC são, até agora, considerados altamente específicos para linhagem hepatocelular e foram positivos para 5 dentre 6 casos em que os dois anticorpos de referência não expressaram marcação. Além disso, a positividade para BSEP em casos de carcinoma indiferenciado SOE levou aqueles autores a sugerir linhagem hepatocitária fosse sugerida em 2 dos 8 casos avaliados.

Provavelmente, a sensibilidade mais alta encontrada para o anticorpo BSEP nos dois últimos trabalhos citados em relação ao do nosso grupo seja justificada pela consideração da positividade a partir de 5% de células imunomarcadas em contrapartida ao limite mínimo de 10% de células para o nosso trabalho, o que também ocorreu com nossos achados quanto a detecção de Hep-par-1 (85,5%) e de Arginase-1 (92,0%) que se mostraram pouco inferiores aos encontrados nos trabalhos de Fujikura e Nguyen. Outra explicação seria decorrente de questões de fixação e autólise, visto que nossas amostras são de casos de necropsias, sempre com várias horas entre o óbito do paciente e o início da exposição do tecido hepático ao formol tamponado que adotamos como fixador.

Nossa avaliação demonstrou que a reação IHQ com o anticorpo anti-Arginase-1 resultou em um número significativamente maior de casos de CHC positivos e uma tendência de detecção de maior número de casos menos diferenciados em relação aos resultados encontrados para o anticorpo anti-BSEP

monoclonal, em concordância com as observações de Fujikura sobre redução da sensibilidade de BSEP nos casos mais anaplásicos do CHC.

Especula-se, através da observação destes resultados, que a enzima arginase-1 (principal responsável pela destoxificação da amônia como uréia) seja uma proteína fisiologicamente fundamental para a manutenção e sobrevivência da célula, seja normal ou neoplásica.⁽¹⁴⁷⁾

Nosso estudo não observou positividade do padrão apical de BSEP com os anticorpos policlonal e monoclonal nas amostras de colangiocarcinoma analisadas. Os resultados sugerem que o marcador é bastante específico (100%) para tal diferenciação, afastando o diagnóstico de CC em casos de carcinomas hepáticos menos diferenciados.

Estes resultados são idênticos aos estudos de Lagana e cols⁽¹³⁸⁾, e Fujikura e colaboradores⁽¹⁴⁰⁾, os dois únicos estudos que encontramos em nossa revisão da literatura, analisando a expressão de tais marcadores em casuísticas expressivas de colangiocarcinoma intra-hepático.

Desta maneira, como bem ressaltam Lagana e cols⁽¹³⁸⁾, a especificidade de BSEP é tão grande que desobriga a necessidade de identificar o padrão canalicular, aspecto que, ao acrescentar subjetividade na interpretação, restringe a utilização de outros marcadores canaliculares frequentemente utilizados como o anti-CEA policlonal.

Além disso, alguns casos de colangiocarcinoma exibiram reações IHQ positivas com os anticorpos CEA policlonal (padrão circunferencial), Hep-par-1 e Arginase-1, diferentemente de BSEP que não foi detectada em nenhum caso de CC. No nosso estudo, a análise das reações IHQ com o anticorpo BSEP monoclonal apresentou um desempenho similar ao marcadores disponíveis atualmente para a discriminação do CHC e do CC, levando-nos a propor estudos que validem a utilidade prática de sua inclusão no painel para o diagnóstico diferencial entre esses dois importantes adenocarcinomas primários do fígado.

5.2 – MDR3 - Proteína 3 Resistente a Múltiplas Drogas

O transportador MDR3 (Proteína 3 Resistente a Múltiplas Drogas) é uma proteína expressa na membrana apical (canalicular) de hepatócitos normais, responsável pela excreção de fosfolipídios para o interior do canalículo biliar. A deficiência desta proteína está associada a colestase intra-hepática familiar progressiva do tipo 3.

O anticorpo monoclonal P3II-26 (Alexis Biochemicals) foi aqui utilizado para avaliar as duas neoplasias malignas epiteliais primárias do fígado. A reação com MDR3 foi positiva em 56,4% dos casos de carcinoma hepatocelular com expressão concomitante dos padrões de marcação linear, puntiforme e acinar em todos os casos de CHC. Todos os casos de colangiocarcinoma (100%) mostraram-se negativos.

A baixa expressão de MDR3 em casos de CHC foi também relatada em uma casuística pequena de amostras congeladas⁽¹³⁵⁾ que constatou redução de 70% da expressão gênica de MDR3 no CHC comparada ao seu respectivo tecido não-tumoral adjacente. A avaliação de MDR3 no fígado normal, no adenoma e na hiperplasia nodular focal revelou não haver variação significativa da expressão desta proteína entre o tecido normal e lesões hepáticas benignas, entretanto, apenas 25% (2/8) dos CHCs não-cirróticos bem ou moderadamente diferenciados foram positivos para pesquisa IHQ.

Em contrapartida, em seu recente estudo, Fujikura e cols⁽¹⁴⁰⁾, demonstraram positividade de MDR3 em 83% (45/54) casos de CHC numa casuística composta de 61% de tumores bem diferenciados e 39% de pouco diferenciados.

Nossos resultados apresentam valores intermediários aos observados nesses dois únicos estudos disponíveis. Nossa série de casos, no entanto, é formada predominantemente (72,5%), de casos menos diferenciados, apontando para a proposição de que esta proteína se apresenta cada vez mais reduzida

conforme o maior grau de malignidade da lesão, justificando também a diminuição significativa da expressão de MDR3 no padrão arquitetural sólido observada em nossa pesquisa. Desta forma, como relatado para análise de BSEP, não detectamos variação da expressão de MDR3 em relação ao número e tamanho dos nódulos de CHC.

A expressão de MDR3 nos CHC foi pronunciadamente inferior em comparação a expressão de CEA, Hep-par-1 e Arginase-1, desfavorecendo a aplicabilidade deste anticorpo como marcador para a investigação nos casos de CHC menos diferenciados. De outra parte, assim como o BSEP, o anticorpo anti-MDR3 propiciou reações negativas em todos (100%) os casos de colangiocarcinoma, conferindo alto poder para discriminar os dois tumores hepáticos analisados e concordando com os resultados obtidos por Nguyen e colaboradores⁽¹³⁹⁾. Estudos futuros poderão avaliar a utilidade de uso conjunto de anticorpos anti-BSEP e anti-MDR3 em um painel ou mesmo em um coquetel de anticorpos, visando a atingir maior sensibilidade na identificação de CHC.

5.3 – MRP2 – Proteína 2 Associada à Resistência a Múltiplas Drogas

MRP-2 (Proteína 2 associada à resistência a múltiplas drogas) é expressa predominantemente na membrana apical de hepatócitos, colangiócitos e em outros tecidos normais (epitélio da vesícula biliar e dos túbulos proximais renais) e neoplásicos (carcinomas de células claras de epitélios tubulares renais).^(53,55,148–151) No fígado, é responsável pela excreção de ampla variedade de ânions orgânicos bivalentes relacionados ao metabolismo da bilirrubina. Sua deficiência está relacionada à síndrome de Dubin-Johnson caracterizada por uma moderada hiperbilirrubinemia conjugada crônica.^(59,152,153)

Nossa pesquisa utilizando o anticorpo MRP2 (M2 III-6, Abcam) resultou positiva em 72 casos (92,3%) dos 80 CHC avaliados demonstrando alta sensibilidade deste marcador.

Os padrões de expressão da membrana (linear, puntiforme e acinar) foram observados de modo concomitante nos casos de CHC. O padrão acinar identificado em nosso trabalho também foi reconhecido em células com arranjo pseudoglandular em outras pesquisas.^(135,154)

A investigação da expressão de MRP2 é um pouco mais explorada na literatura, sobretudo relacionada a participação desta proteína na resposta terapêutica ao CHC. Nossos resultados estão em concordância com a literatura que indica a manutenção ou aumento da expressão de MRP2 no carcinoma hepatocelular.^(135,137,154–157)

A ausência de variação da expressão de MRP2 em relação ao número, tamanho dos nódulos, padrão arquitetural (inclusive os sólidos), e grau de diferenciação (inclusive os menos diferenciados) de CHC sugere que a proteína MRP2 apresenta-se altamente expressa no CHC independentemente das variáveis anatomopatológicas analisadas.

Nos casos de colangiocarcinoma, a reatividade para MRP2 foi observada em 96,3% (52/54) dos casos e o padrão expressão exibiu marcação linear uniforme e, algumas vezes, granular com intensidade e distribuição variando de moderada a intensa nas membranas lateral e luminal dos ductos normais, proliferados (reação ductular) e neoplásicos.

O único estudo relacionado, cuja a nossa pesquisa bibliográfica permitiu identificar, foi o de Rau e colaboradores⁽⁶⁹⁾ que investigaram a expressão, por imunofluorescência, de MRP2 e MRP3 em cultura de células e amostras de tecido parafinado de colangiocarcinomas, carcinomas de vesícula biliar e adenocarcinomas do trato biliar. Aqueles pesquisadores utilizaram o anticorpo policlonal EAG e relataram baixa expressão (29%) de MRP2 na neoplasia de vesícula biliar e ausência nos 7 casos de colangiocarcinoma extra-hepático (5 casos grau 2 e 2 casos grau 3) do estudo.

Nossos resultados são consideravelmente diferentes do trabalho Rau e colaboradores⁽⁶⁹⁾. Nossas reações IHQ foram realizadas com o anticorpo

monoclonal M2 III-6 (Abcam) cujo sinal de positividade foi amplificado por sistema de detecção de última geração e alto desempenho (anticorpos secundários conjugados a polímeros curtos marcados com moléculas de peroxidase).

A alta sensibilidade para este marcador foi observada em nossa casuística, composta de 54 casos de CC, em todos os parâmetros anatomopatológicos analisados, que incluiu diferentes localizações (intra e extra-hepático), tipos de padrão de crescimento (formado de massa, peri e ductal), subtipos histológicos (ductal e ductular) e grau histológico de diferenciação (bem diferenciados a indiferenciados). Não foi detectada a expressão de MRP2 em nosso único caso classificado como indiferenciado, entretanto, todos os 19 casos de CC moderadamente diferenciados (equivalente ao grau II) foram positivos e, 2/3 (66,7%) pouco diferenciados (equivalente ao grau III) exibiram positividade para MRP2.

A comparação do agrupamento dos casos bem e moderadamente diferenciados vs o agrupamento dos casos pouco e indiferenciados, demonstrou em nossa pesquisa redução significativa da expressão de MRP2 nos casos mais anaplásicos.

Desta forma, a escassez de informações e a presença de resultados divergentes sobre a avaliação da expressão desta proteína nos adenocarcinomas de ductos biliares conduzem a necessidade de ampliação da investigação desta proteína transportadora nos colangiocarcinomas.

A alta sensibilidade para MRP2 observada no carcinoma hepatocelular e no colangiocarcioma não permitiu eleger esta proteína como potencial marcador de desempenho para identificar a linhagem (hepatocitária ou biliar) das neoplasias malignas hepáticas mais anaplásicas de nosso estudo.

5.4 – MRP3 – Proteína 3 Associada à Resistência à Múltiplas Drogas

A Proteína 3 Associada a Resistência a Múltiplas Drogas (MRP3) está presente, em condições fisiológicas, na membrana basolateral dos hepatócitos, colangiócitos, células da vesícula biliar, do ducto pancreático, além de presente na glândula suprarrenal, rim, placenta, estômago e cólon.^(34,61–63) . A principal função desta proteína ABC está relacionada ao transporte de compostos orgânicos e sais biliares conjugados bivalentes, podendo estar super expressa em condições colestatías.^(34,157)

No presente estudo, apenas 14 (17,5%) dos 80 CHC avaliados mostraram-reação positiva com o anticorpo MRP3 (DTX1), exibindo distribuição basolateral em mais de 10% dos hepatócitos tumorais.

Borgh⁽¹³⁷⁾ também analisou a imunoexpressão de MRP3 (clone DTX1) em adenomas hepatocelulares ou hiperplasias nodulares focais (25) versus 8 amostras de CHC. A expressão foi uniformemente positiva em todos (100%) os adenomas hepáticos e nas hiperplasias nodulares focais, mas apenas em 50% dos CHC bem diferenciados. Como já mencionamos com relação ao BSEP, esta menor reatividade de CHC para moléculas relacionadas à transformação maligna é biologicamente esperada.

Ainda que, sob o ponto de vista diagnóstico, tanto os nossos achados como os de Borgh sugerem pouca utilidade do uso de MRP3 como marcador de interesse diagnóstico em CHC, a reatividade consistente obtida com tal tipo de reação, oferecendo excelente contraste entre o sinal positivo e o tecido negativo ao fundo pode propiciar outras aplicações da detecção da importante proteína transportadora biliar MRP3 no estudo das neoplasias hepáticas. Já em 2001, Nies e colaboradores⁽¹⁵⁴⁾ apontaram evidências de possível associação da positividade tecidual para MRP3 com a quimiorresistência, encontrando, através da reação imunofluorescente, positividade na membrana basolateral em todos os 9 casos de amostras congeladas CHC bem ou moderadamente diferenciados.

O trabalho de Zollner e colaboradores para avaliação da expressão de proteínas transportadoras como potencial fator preditivo de quimiorresistência incluiu a análise de MRP3 nas amostras congeladas de carcinoma hepatocelular. Aqueles autores observaram que 75% (3/4) dos casos avaliados foram negativos para o anticorpo analisado e, um dos casos apresentou reação citoplasmática que poderia ser explicado, segundo os autores, por um distúrbio de migração da proteína em direção a membrana basolateral. Tais resultados levaram aqueles autores a sugerir que MRP3 não participaria ativamente da resistência ao tratamento de CHC.

Reforçando a hipótese de que a detecção de hiperexpressão de MRP3 relaciona-se com os mecanismos de resistência aos inibidores de tiroquinase relacionados ao tratamento do CHC, Tomonari e cols, 2016.⁽¹³⁶⁾ apontam para a possibilidade que MRP3 venha a ser um fator de resistência à ação terapêutica de Sorafenib. A nosso ver, ensaios terapêuticos no futuro próximo deverão testar o fator preditivo desses marcadores, o que tornaria tal detecção útil na melhor seleção de pacientes para o tratamento com tais inibidores de quinases.

Nosso estudo observou que MRP3 foi positivo em 42,6% (23/54) dos casos de colangiocarcinoma avaliados. O único estudo semelhante que encontramos na literatura foi realizado por Rau e colaboradores⁽⁶⁹⁾ em 2008. Aqueles autores observaram a imunoexpressão de MRP3, por imuno-histoquímica, em apenas 7 amostras de colangiocarcinoma extra-hepático (5 moderadamente diferenciados e 2 pouco diferenciados) e 14 carcinomas de vesícula biliar para a avaliação da resistência ao tratamento quimioterápico. Rau e colaboradores relataram positividade para MRP3 em 57% (4/7) dos casos de colangiocarcinoma extra-hepáticos.

Também avaliamos a expressão de MRP3 em relação aos parâmetros anatomopatológicos de localização, padrão de crescimento macroscópico, subtipo histológico e grau de diferenciação do colangiocarcinoma. Observamos redução expressiva do transportador MRP3 apenas no subtipo histológico ductular. Esta apresentação que inclui o padrão de células intermediárias e de

malformação da placa ductal) se assemelha a proliferação de ductos biliares e expressão de fenótipos de células progenitoras hepáticas.^(158,159) Diferentemente do observado em nosso estudo, dois trabalhos^(160,161) disponíveis relataram o aumento da expressão de MRP3 nos ductulos biliares neoplásicos.

Visto que nosso presente trabalho, um dos pioneiros a abordar a expressão de MRP3 em colangiocarcinomas, detectou positividade em 42,6% dos casos, abre-se aqui a oportunidade para estudos futuros buscando relacionar tal positividade com demais parâmetros clínicos e histológicos dos colangiocarcinomas, principalmente para o colangiocarcinoma intra-hepático cuja imunoexpressão é desconhecida na literatura.

6 – CONCLUSÕES

6.1 A expressão canalicular de BSEP nos carcinomas hepatocelulares foi observada em 77,3% com o anticorpo monoclonal F6 e 76% com o anticorpo policlonal, sendo melhor definido o contraste obtido com uso do anticorpo monoclonal. Todos os casos de colangiocarcinoma foram negativos para reações IHQ com estes anticorpos. Ainda que um pouco menos sensível que os marcadores em uso atual (CEAp, Hep-par-1 e Arginase-1), o excelente contraste e a ausência de reatividade em colangiocarcinomas torna aconselhável o uso do anticorpo monoclonal anti-BSEP F6 no painel adotado para o diagnóstico diferencial entre estas duas principais neoplasias malignas primárias do fígado.

6.2 A expressão canalicular de MDR3 em 56,4% dos casos de carcinoma hepatocelular e em nenhum caso de colangiocarcinoma, apesar de demonstrar a especificidade deste transportador não atinge níveis de detecção suficientes para indicação de seu uso no painel diagnóstico destas neoplasias.

6.3 As reações IHQ com o anticorpo MRP2 exibiram positividade canalicular em 92,3% dos casos de carcinoma hepatocelular e 96,3% nos casos de colangiocarcinoma. Estes resultados são coerentes com a distribuição biológica deste importante transportador biliar em hepatócitos e em colangiócitos normais. A manutenção de tal reatividade independente de todas as variáveis anatomopatológicas analisadas sugere que a excreção de ampla variedade de ânions orgânicos bivalentes por este transportador não está essencialmente alterada no carcinoma hepatocelular e no colangiocarcinoma.

6.4 A expressão de MRP3 em 18,8% dos casos de carcinoma hepatocelular e em 44,5% do colangiocarcinoma, predominando o padrão basolateral, é consideravelmente inferior à obtida com os demais transportadores biliares, não tornando recomendável o uso deste marcador na diferenciação entre estas duas neoplasias hepáticas. De outra parte, a aparente redução de expressão de

MRP3 no subtipo histológico ductular de colangiocarcinoma torna promissoras as pesquisas futuras para avaliação mais detalhada da expressão deste marcador nos vários subtipos de colangiocarcinomas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gartner, Leslie P.; Hiatt JL. Sistema Digestório - Glândulas. In: Histologia essencial. 3ed ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012. p. 342.
2. Suriawinata AA, Thung SN. Histology for Pathologists. In: Mills SE, editor. Histology for Pathologists. 4th ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins; 2012. p. 1328.
3. Crawford JM, Chen L. The liver and the tract biliary tract. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC, editors. Robbins and Cotran Pathologic Basis of disease. 8 ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2010. p. 833–90.
4. Alves VAF, Chapchap P, Menezes Y. Anatomia, Embriologia e Histologia. In: Gayotto LCD, editor. Doenças do Fígado e Vias Biliares. São Paulo: Atheneu; 2001. p. 5–17.
5. Roskams T, Desmet V. Embryology of extra- and intrahepatic bile ducts, the ductal plate. Anat Rec (Hoboken) [Internet]. 2008 Jun;291(6):628–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18484608>
6. Van Eyken P, Sciort R, Callea F, Steen K Van Der, Moerman P, Desmet VJ. The development of the intrahepatic bile ducts in man: A keratin-immunohistochemical study. Hepatology [Internet]. 1988 Nov;8(6):1586–95. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2461337>
7. Vijayan V, Tan CEL. Developing human biliary system in three dimensions. Anat Rec [Internet]. 1997 Nov;249(3):389–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9372173>
8. Antoniou A, Raynaud P, Cordi S, Zong Y, Tronche F, Stanger BZ, et al. Intrahepatic Bile Ducts Develop According to a New Mode of Tubulogenesis Regulated by the Transcription Factor SOX9. Gastroenterology [Internet]. 2009 Jun;136(7):2325–33. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001650850900300X>
9. Tabibian JH, Masyuk AI, Masyuk T V., O'Hara SP, LaRusso NF. Physiology of Cholangiocytes. In: Comprehensive Physiology [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2013. p. 541–65. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cphy.c120019>
10. Fraile A. Membranas canalicular, sinusoidal y basolateral de los hepatocitos [Internet]. Mutxamel: Hospital Veterinario J. Griñán; 2014. Available from: <http://vetblog.vetjg.com/utilidad-clinica-de-la-fosfatasa-alcalina-plasmatica-en-el-perro-y-el-gato/>
11. Maroni L, Haibo B, Ray D, Zhou T, Wan Y, Meng F, et al. Functional and Structural Features of Cholangiocytes in Health and Disease. Cell Mol Gastroenterol Hepatol [Internet]. 2015 Jul 1;1(4):368–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcmgh.2015.05.005>
12. Concepcion AR, Lopez M, Ardura-Fabregat A, Medina JF. Role of AE2 for pH_i regulation in biliary epithelial cells. Front Physiol [Internet].

- 2013;4(January):413. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24478713>
13. Guyton AC, Hall JE. Tratado de Fisiologia médica. 12a ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda; 2011. 752 p.
14. Tellingén C van. Physiology. 1a ed. Driebergen: Louis Bolk Institute; 2003. 94 p.
15. Nicolaou M, Andress EJ, Zolnercijs JK, Dixon PH, Williamson C, Linton KJ. Canalicular ABC transporters and liver disease. J Pathol [Internet]. 2012 Jan;226(2):300–15. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/path.3019>
16. Porta G. Transporte dos Ácidos Biliares Biliary Salts Transportantion. Gaz méd Bahia [Internet]. 2006;76(1): S13–5. Available from: <http://www.gmbahia.ufba.br/index.php/gmbahia/article/viewFile/312/302>
17. Banales J-M, Prieto J, Medina J-F. Cholangiocyte anion exchange and biliary bicarbonate excretion. World J Gastroenterol [Internet]. 2006 Jun 14;12(22):3496–511. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16773707>
18. Houten SM, Watanabe M, Auwerx J. Endocrine functions of bile acids. EMBO J [Internet]. 2006;25(7):1419–25. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1440314&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
19. Hofmann AF, Hagey LR. Bile Acids: Chemistry, Pathochemistry, Biology, Pathobiology, and Therapeutics. Cell Mol Life Sci [Internet]. 2008 Aug 19;65(16):2461–83. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18488143>
20. Roma MG, Crocenzi FA, Sánchez Pozzi EA. Hepatocellular transport in acquired cholestasis: new insights into functional, regulatory and therapeutic aspects. Clin Sci [Internet]. 2008 May 1;114(9):567–88. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18377365>
21. Hylemon PB, Zhou H, Pandak WM, Ren S, Gil G, Dent P. Bile acids as regulatory molecules. J Lipid Res [Internet]. 2009 Aug 1;50(8):1509–20. Available from: <http://www.jlr.org/cgi/doi/10.1194/jlr.R900007-JLR200>
22. Thomas C, Pellicciari R, Pruzanski M, Auwerx J, Schoonjans K. Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. Nat Rev Drug Discov [Internet]. 2008 Aug;7(8):678–93. Available from:
<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrd2619>
23. Trauner M, Boyer JL. Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. Physiol Rev [Internet]. 2003 Apr 1;83(2):633–71. Available from:
<http://physrev.physiology.org/cgi/doi/10.1152/physrev.00027.2002>

24. Meier PJ, Stieger B. Bile salt transporters. *Annu Rev Physiol* [Internet]. 2002 Mar;64(1):635–61. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.physiol.64.082201.100300>
25. Borst P, Elferink RO. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem* [Internet]. 2002 Jun;71(1):537–92. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.biochem.71.102301.093055>
26. Stefková J, Poledne R, Hubáček JA. ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases. *Physiol Res* [Internet]. 2004;53(3):235–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15209530>
27. Rees DC, Johnson E, Lewinson O. ABC transporters: the power to change. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2009 Mar;10(3):218–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19234479>
28. Tarling EJ, de Aguiar Vallim TQ, Edwards PA. Role of ABC transporters in lipid transport and human disease. *Trends Endocrinol Metab* [Internet]. 2013;24(7):342–50. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3659191&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
29. Wilkens S. Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime Rep* [Internet]. 2015 Feb 3;7(14):1–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959440X04001034>
30. Vasiliou V, Vasiliou K, Nebert DW. Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum Genomics* [Internet]. 2009 Apr;3(3):281–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19403462> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2752038>
31. Schmitt L. In vitro investigations of ABC transporters of the human liver – advantages and surprises. *Eur J Med Res* [Internet]. 2014;19(Suppl 1): S18. Available from: <http://www.eurjmedres.com/content/19/S1/S18>
32. Strautnieks SS, Byrne JA, Pawlikowska L, Cebecauerová D, Rayner A, Dutton L, et al. Severe Bile Salt Export Pump Deficiency: 82 Different ABCB11 Mutations in 109 Families. *Gastroenterology* [Internet]. 2008 Apr;134(4):1203–1214.e8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508508001121>
33. Kubitz R, Dröge C, Kluge S, Stindt J, Häussinger D. Genetic variations of bile salt transporters. *Drug Discov Today Technol* [Internet]. 2014 Jun;12:e55–67. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1740674914000122>

34. Klaassen CD, Aleksunes LM. Xenobiotic, Bile Acid, and Cholesterol Transporters: Function and Regulation. *Pharmacol Rev* [Internet]. 2010 Mar 1;62(1):1–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20103563>
35. Alrefai WA, Gill RK. Bile acid transporters: structure, function, regulation and pathophysiological implications. *Pharm Res* [Internet]. 2007 Oct;24(10):1803–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17404808>
36. Kusters A, Karpen SJ. Bile acid transporters in health and disease. *Xenobiotica* [Internet]. 2008 Aug 22;38(7–8):1043–71. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00498250802040584>
37. Halilbasic E, Claudel T, Trauner M. Bile acid transporters and regulatory nuclear receptors in the liver and beyond. *J Hepatol* [Internet]. 2013 Jan;58(1):155–68. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2012.08.002>
38. Gerloff T. The Sister of P-glycoprotein Represents the Canalicular Bile Salt Export Pump of Mammalian Liver. *J Biol Chem* [Internet]. 1998 Apr 17;273(16):10046–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9545351>
39. ABCB11: ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 11 [Internet]. The Human Protein Atlas. 2017 [cited 2017 Jan 31]. Available from: <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000073734-ABCB11/tissue>
40. Arrese M, Ananthanarayanan M. The bile salt export pump: molecular properties, function and regulation. *Pflugers Arch* [Internet]. 2004 Nov 24;449(2):123–31. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00424-004-1311-4>
41. Soroka CJ, Boyer JL. Biosynthesis and trafficking of the bile salt export pump, BSEP: Therapeutic implications of BSEP mutations. *Mol Aspects Med* [Internet]. 2014; 37:3–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2013.05.001>
42. Davit-Spraul A, Gonzales E, Baussan C, Jacquemin E. Progressive familial intrahepatic cholestasis. *Orphanet J Rare Dis* [Internet]. 2009 Dec;4(1):1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21134824>
43. ABCB4: ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 4 [Internet]. The Human Protein Atlas. 2017 [cited 2017 Jan 31]. Available from: <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000005471-ABCB4/tissue>
44. MDR3: ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 4 [Internet]. GenAtlas - Université Paris Descartes. 2017 [cited 2017 Jan 31]. Available from: <http://genatlas.medecine.univ-paris5.fr/fiche.php?n=4992>

45. Müller M, Jansen PL. Molecular aspects of hepatobiliary transport. *Am J Physiol* [Internet]. 1997 Jun;272(6 Pt 1): G1285-303. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9227463>
46. Müller M, Jansen PLM. The secretory function of the liver: new aspects of hepatobiliary transport. *J Hepatol* [Internet]. 1998 Feb;28(2):344–54. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0168827888800242>
47. Morita S, Terada T. Molecular mechanisms for biliary phospholipid and drug efflux mediated by ABCB4 and bile salts. *Biomed Res Int* [Internet]. 2014;2014:954781. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25133187>
48. Wendum D, Barbu V, Rosmorduc O, Arrivé L, Fléjou J-F, Poupon R. Aspects of liver pathology in adult patients with MDR3/ABCB4 gene mutations. *Virchows Arch* [Internet]. 2012 Mar;460(3):291–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22331132>
49. Degiorgio D, Crosignani A, Colombo C, Bordo D, Zuin M, Vassallo E, et al. ABCB4 mutations in adult patients with cholestatic liver disease: impact and phenotypic expression. *J Gastroenterol* [Internet]. 2016 Mar 1;51(3):271–80. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00535-015-1110-z>
50. Tougeron D, Fotsing G, Barbu V, Beauchant M. ABCB4/MDR3 gene mutations and cholangiocarcinomas. *J Hepatol* [Internet]. 2012 Aug;57(2):467–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2012.01.025>
51. Chen Y, Song X, Valanejad L, Vasilenko A, More V, Qiu X, et al. Bile salt export pump is dysregulated with altered farnesoid X receptor isoform expression in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* [Internet]. 2013 Apr;57(4):1530–41. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.26187>
52. Yu Z, Peng S, Hong-Ming P, Kai-Feng W. Expression of Multi-drug Resistance-Related Genes MDR3 and MRP as Prognostic Factors in Clinical Liver Cancer Patients. *Hepatogastroenterology* [Internet]. 2012 Feb 22;59(117):1556–9. Available from: <https://www.hepatogastroenterology.org/?p=3803>
53. Jedlitschky G, Hoffmann U, Kroemer HK. Structure and function of the MRP2 (ABCC2) protein and its role in drug disposition. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* [Internet]. 2006 Jun 30;2(3):351–66. Available from: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1517/17425255.2.3.351>
54. ABCC2: ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 2 [Internet]. *The Human Protein Atlas*. 2017 [cited 2017 Jan 31]. Available from: <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000023839-ABCC2/tissue>

55. Nies AT, König J, Cui Y, Brom M, Spring H, Keppler D. Structural requirements for the apical sorting of human multidrug resistance protein 2 (ABCC2). *Eur J Biochem* [Internet]. 2002 Apr;269(7):1866–76. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1432-1327.2002.02832.x>
56. Taniguchi K, Wada M, Kohno K, Nakamura T, Kawabe T, Kawakami M, et al. A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation. *Cancer Res* [Internet]. 1996 Sep 15;56(18):4124–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8797578>
57. Chen Z, Shi T, Zhang L, Zhu P, Deng M, Huang C, et al. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. *Cancer Lett* [Internet]. 2016 Jan 1;370(1):153–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2015.10.010>
58. Erlinger S, Arias IM, Dhumeaux D. Inherited disorders of bilirubin transport and conjugation: new insights into molecular mechanisms and consequences. *Gastroenterology* [Internet]. 2014 Jun;146(7):1625–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2014.03.047>
59. Keppler D. The Roles of MRP2, MRP3, OATP1B1, and OATP1B3 in Conjugated Hyperbilirubinemia. *Drug Metab Dispos* [Internet]. 2014 Mar 5;42(4):561–5. Available from: <http://dmd.aspetjournals.org/cgi/doi/10.1124/dmd.113.055772>
60. Kullak-Ublick GA, Stieger B, Meier PJ. Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. *Gastroenterology* [Internet]. 2004 Jan;126(1):322–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14699511>
61. Kool M, van der Linden M, de Haas M, Scheffer GL, de Vree JM, Smith AJ, et al. MRP3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1999;96(12):6914–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=22016&tool=pmc&entrez&rendertype=abstract>
62. Scheffer GL, Kool M, Heijn M, de Haas M, Pijnenborg AC, Wijnholds J, et al. Specific detection of multidrug resistance proteins MRP1, MRP2, MRP3, MRP5, and MDR3 P-glycoprotein with a panel of monoclonal antibodies. *Cancer Res* [Internet]. 2000 Sep 15;60(18):5269–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11016657>
63. ABCC3: ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3 [Internet]. The Human Protein Atlas. 2017 [cited 2017 Jan 31]. Available from: <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000108846-ABCC3/tissue>

64. ABCC3: ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3 [Internet]. GenAtlas - Université Paris Descartes. 2017 [cited 2017 Jan 31]. Available from: <http://genatlas.medecine.univ-paris5.fr/fiche.php?symbol=ABCC3>
65. König J, Rost D, Cui Y, Keppler D. Characterization of the human multidrug resistance protein isoform MRP3 localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology* [Internet]. 1999 Apr;29(4):1156–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10094960>
66. Ballatori N, Hammond CL, Cunningham JB, Krance SM, Marchan R. Molecular mechanisms of reduced glutathione transport: Role of the MRP/CFTR/ABCC and OATP/SLC21A families of membrane proteins. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005;204(3):238–55.
67. Belinsky MG, Dawson PA, Shchaveleva I, Bain LJ, Wang R, Ling V, et al. Analysis of the in vivo functions of Mrp3. *Mol Pharmacol* [Internet]. 2005 Jul 6;68(1):160–8. Available from: <http://molpharm.aspetjournals.org/cgi/doi/10.1124/mol.104.010587>
68. Sodani K, Patel A, Kathawala RJ, Chen Z-S. Multidrug resistance associated proteins in multidrug resistance. *Chin J Cancer* [Internet]. 2012;31(2):58–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22098952> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3777468>
69. Rau S, Autschbach F, Riedel HD, König J, Kulaksiz H, Stiehl A, et al. Expression of the multidrug resistance proteins MRP2 and MRP3 in human cholangiocellular carcinomas. *Eur J Clin Invest* [Internet]. 2008 Feb 22;38(2):134–42. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2362.2007.01916.x>
70. Teng S. Induction of ABCC3 (MRP3) by Pregnane X Receptor Activators. *Drug Metab Dispos* [Internet]. 2003 Nov 1;31(11):1296–9. Available from: <http://dmd.aspetjournals.org/content/31/11/1296>
71. Venook AP, Papandreou C, Furuse J, Ladrón De Guevara L. The Incidence and Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma: A Global and Regional Perspective. *Oncologist* [Internet]. 2010;15(suppl 4):5–13. Available from: http://theoncologist.alphamedpress.org/content/15/suppl_4/5.full.pdf
72. El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* [Internet]. 2011 Sep 22;365(12):1118–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21992124>
73. Gomes MA, Priolli DG, Tralhão JG, Botelho MF. Carcinoma hepatocelular: epidemiologia, biologia, diagnóstico e terapias. *Rev Assoc Med Bras* [Internet]. 2013 Sep;59(5):514–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24041910>

74. George J, Robotin M. Hepatocellular carcinoma Overview : the future starts now *Forum*. George J, Robotin M, editors. *Cancer Forum* [Internet]. 2009;33(2):1–5. Available from: <http://cancerforum.org.au/forum/2009/july/overview-hepatocellular-carcinoma-the-future-starts-now/>
75. Srivatanakul P, Sriplung H, Deerasamee S. Epidemiology of Liver Cancer : An Overview. *Asian Pac J Cancer Prev* [Internet]. 2004;5:118–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15244512>
76. Carrilho FJ, Kikuchi L, Branco F, Gonçalves CS, Mattos AA, Group BHS. Clinical and epidemiological aspects of hepatocellular carcinoma in Brazil. *Clinics* [Internet]. 2010;65(12):1285–90. Available from: <http://www.intmedpress.com/journals/avt/abstract.cfm?id=2602&pid=88>
77. Rizvi S, Gores GJ. Pathogenesis, Diagnosis, and Management of Cholangiocarcinoma. *Gastroenterology* [Internet]. 2013 Dec;145(6):1215–29. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2013.10.013>
78. Cardinale V, Semeraro R, Torrice A, Gatto M, Napoli C, Bragazzi MC, et al. Intra-hepatic and extra-hepatic cholangiocarcinoma: New insight into epidemiology and risk factors. *World J Gastrointest Oncol* [Internet]. 2010 Nov 15;2(11):407–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3000454/>
79. Tyson GL, El-Serag HB. Risk factors for cholangiocarcinoma. *Hepatology* [Internet]. 2011 Jul;54(1):173–84. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.24351>
80. Brown KM, Parmar AD, Geller DA. Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Surg Oncol Clin N Am* [Internet]. 2014 Apr;23(2):231–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.soc.2013.10.004>
81. Razumilava N, Gores GJ. Cholangiocarcinoma. *Lancet* [Internet]. 2014 Jun 21;383(9935):2168–79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24581682>
82. Blechacz B, Komuta M, Roskams T, Gores GJ. Clinical diagnosis and staging of cholangiocarcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2011 Aug 2;8(9):512–22. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrgastro.2011.131>
83. Soares KC, Kamel I, Cosgrove DP, Herman JM, Pawlik TM. Hilar cholangiocarcinoma: diagnosis, treatment options, and management. *Hepatobiliary Surg Nutr* [Internet]. 2014;3(1):18–34. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3955000&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

84. Dickson P V., Behrman SW. Distal Cholangiocarcinoma. Surg Clin North Am [Internet]. 2014 Apr 1;94(2):325–42. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039610913002132>
85. Ishak KG, Goldman ZD, Stocker JT. Tumors of the Liver and Intrahepatic Bile Ducts. 3 ed. Atlas of Tumor Pathology. Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology; 2001.
86. Soares. Hepatic tumours. In: Dooley JS, Lok A, Burroughs AK, Heathcote J, editors. Sherlock's Diseases of the Liver and Biliary System. 12 ed. Hoboken: Willey-Blackwell Science; 2011. p. 681–98.
87. Edmondson HA, Steiner PE. Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48,900 necropsies. Cancer [Internet]. 1954 May;7(3):462–503. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13160935>
88. Paradis V. Histopathology of Hepatocellular Carcinoma. In: Vauthey J-N, Brouquet A, editors. Recent Results in Cancer Research [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013. p. 21–32. (Recent Results in Cancer Research; vol. 190). Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-16037-0_2
89. Pimenta JR, Massabki PS. Carcinoma hepatocelular : um panorama clínico. Rev Bras Clin Med [Internet]. 2010;8:59–67. Available from: http://www.doencasdofigado.com.br/CARCINOMA_HEPATOCELULAR.pdf
90. CONTE VP. Carcinoma hepatocelular. Parte 1: considerações gerais e diagnóstico. Arq Gastroenterol [Internet]. 2000 Jan;37(1):58–67. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-28032000000100012&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
91. D'errico A, Baccarini P, Fiorentino M, Ceccarelli C, Bonazzi C, Ponzetto A, et al. Histogenesis of primary liver carcinomas: Strengths and weaknesses of cytokeratin profile and albumin mRNA detection. Hum Pathol [Internet]. 1996 Jun;27(6):599–604. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0046817796901690>
92. Blechacz B, Ghouri Y, Mian I. Cancer review: Cholangiocarcinoma. J Carcinog [Internet]. 2015 Apr 16;14(1):1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20442801>
93. Sanada Y, Kawashita Y, Okada S, Azuma T, Matsuo S. Review to better understand the macroscopic subtypes and histogenesis of intrahepatic cholangiocarcinoma. World J Gastrointest Pathophysiol [Internet]. 2014;5(3):188–99. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4133518&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
94. 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 [Internet]. 2010 Dec 27;2(12):419–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21191517>
95. Khan S a., Davidson BR, Goldin RD, Heaton N, Karani J, Pereira SP, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: an update. Gut BMj [Internet]. 2012 Dec;61(12):1657–69. Available from: <http://gut.bmj.com/lookup/doi/10.1136/gutjnl-2011-301748>
96. Werner B, Campos AC, Nadji M, Torres LFB. Uso prático da imuno-histoquímica em patologia cirúrgica. J Bras Patol e Med Lab [Internet]. 2005 Oct;41(5):353–64. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442005000500011&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
97. Alves VAF, Bacchi CE, Vassalo J. Manual de Imuno-histoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia; 1999. 270 p.
98. Wee A. Diagnostic utility of immunohistochemistry in hepatocellular carcinoma, its variants and their mimics. Appl Immunohistochem Mol Morphol [Internet]. 2006;14(3):266–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16932016>
99. Christensen WN, Boitnott JK, Kuhajda FP. Immunoperoxidase staining as a diagnostic aid for hepatocellular carcinoma. Mod Pathol an Off J United States Can Acad Pathol Inc. 1989;2(1):8–12.
100. Ma CK, Zarbo RJ, Frierson HF, Lee MW. Comparative immunohistochemical study of primary and metastatic carcinomas of the liver. Am J Clin Pathol [Internet]. 1993 May;99(5):551–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7684185>
101. Perocco MA. Adenocarcinomas no fígado - Contribuição da imuno-histoquímica ao diagnóstico diferencial do sítio de origem. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 1995.
102. Lau SK, Prakash S, Geller SA, Alsabeh R. Comparative immunohistochemical profile of hepatocellular carcinoma, cholangiocarcinoma, and metastatic adenocarcinoma. Hum Pathol [Internet]. 2002 Dec;33(12):1175–81. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004681770200182X>
103. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. Cell [Internet]. 1982 Nov;31(1):11–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6186379>
104. Moll R, Divo M, Langbein L. The human keratins: biology and pathology. Histochem Cell Biol [Internet]. 2008 Jun 7;129(6):705–33. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00418-008-0435-6>

105. Geller SA, Pitman MB, Nichols SW. Cellular and molecular diagnostic technique. In: MacSween RNM, Burt AD, Portmann BC, Ferrell LD, editors. *MacSween's Pathology of the liver*. 5 ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone; 2007. p. 119–44.
106. Al-Muhannadi N, Ansari N, Brahmi U, Satir AA. Differential diagnosis of malignant epithelial tumours in the liver: an immunohistochemical study on liver biopsy material. *Ann Hepatol* [Internet]. 2011;10(4):508–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21911893>
107. Arber, MD DA, Chu, MD, PhD P. Paraffin-Section Detection of CD10 in 505 Nonhematopoietic Neoplasms. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 2000;113(3):374–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10705818> <http://ajcp.ascpjournals.org/cgi/doi/10.1309/8VAV-J2FU-8CU9-EK18>
108. Hammarstrom S, Shively JE, Paxton RJ, Beatty BG, Larsson A, Ghosh R, et al. Antigenic sites in carcinoembryonic antigen. *Cancer Res* [Internet]. 1989 Sep 1;49(17):4852–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2474375>
109. Nap M, Hammarström M, Börner O, Hammarsträ M, Hammarsträ S, Wagener C, et al. Specificity and Affinity of Monoclonal Antibodies against Carcinoembryonic Antigen Specificity and Affinity of Monoclonal Antibodies against Carcinoembryonic. *Cancer Res*. 1992;52:2329–39.
110. Tanaka S, Hirohashi K, Uenishi T, Yamamoto T, Hamba H, Kubo S, et al. A mixed hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma: Dual expression of biliary-type cytokeratin and hepatocyte specific marker. *Hepatology*. 2004;51(57):839–41.
111. Stroescu C, Herlea V, Dragnea A, Popescu I. The diagnostic value of cytokeratins and carcinoembryonic antigen immunostaining in differentiating hepatocellular carcinomas from intrahepatic cholangiocarcinomas. *J Gastrointest liver Dis* [Internet]. 2006 Mar;15(1):9–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16680226>
112. Basturk O, Farris AB, Adsay NV. Immunohistology of the Pancreas, Biliary Tract, and Liver. In: Dabbs D, editor. *Diagnostic Immunohistochemistry*. 3 ed. Philadelphia: Elsevier; 2010. p. 541–92.
113. Morrison C, Marsh W, Frankel WL. A comparison of CD10 to pCEA, MOC-31, and hepatocyte for the distinction of malignant tumors in the liver. *Mod Pathol* [Internet]. 2002 Dec;15(12):1279–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12481008>
114. Bateman AC, Hübscher SG. Cytokeratin expression as an aid to diagnosis in medical liver biopsies. *Histopathology* [Internet]. 2010 Mar;56(4):415–25. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2559.2009.03391.x>

115. 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* [Internet]. 2012 Jun;55(6):1876–88. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.25595>
116. Radwan N a, Ahmed NS. The diagnostic value of arginase-1 immunostaining in differentiating hepatocellular carcinoma from metastatic carcinoma and cholangiocarcinoma as compared to Hep-par-1. *Diagn Pathol* [Internet]. 2012 Oct 30;7(1):149. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23111165>
117. Timek DT, Shi J, Liu H, Lin F. Arginase-1, Hep-par-1, and Glypican-3 Are the Most Effective Panel of Markers in Distinguishing Hepatocellular Carcinoma From Metastatic Tumor on Fine-Needle Aspiration Specimens. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 2012 Aug 1;138(2):203–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22904131>
118. Jain D. Tissue Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma. *J Clin Exp Hepatol* [Internet]. 2014;4:S67–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jceh.2014.03.047>
119. Di Costanzo L, Moulin M, Haertlein M, Meilleur F, Christianson DW. Expression, purification, assay, and crystal structure of perdeuterated human arginase I. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2007 Sep;465(1):82–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003986107002330>
120. Muller AJ, Scherle P a. Targeting the mechanisms of tumoral immune tolerance with small-molecule inhibitors. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2006 Aug;6(8):613–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16862192>
121. Yan BC, Gong C, Song J, Krausz T, Tretiakova M, Hyjek E, et al. Arginase-1: A New Immunohistochemical Marker of Hepatocytes and Hepatocellular Neoplasms. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2010 Aug;34(8):1147–54. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00000478-201008000-00008>
122. Iida H, Hata M, Kakuno A, Hirano H, Yamanegi K, Yamada N, et al. Expression of hepatocyte markers in mass-forming peripheral and periductal-infiltrating hilar intrahepatic cholangiocarcinomas. *Oncol Lett* [Internet]. 2011 Nov 2;2(6):1041–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22848265>
123. Fujiwara M, Kwok S, Yano H, Pai RK. Arginase-1 is a more sensitive marker of hepatic differentiation than Hep-par-1 and glypican-3 in fine-needle aspiration biopsies. *Cancer Cytopathol* [Internet]. 2012 Aug 25;120(4):230–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22434791>

124. Zhang L, Liu H, Sun L, Li N, Ding H, Zheng J. Glypican-3 as a potential differential diagnosis marker for hepatocellular carcinoma: A tissue microarray-based study. *Acta Histochem* [Internet]. 2012;114(6):547–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2011.10.003>
125. Ho M, Kim H. Glypican-3: A new target for cancer immunotherapy. *Eur J Cancer* [Internet]. 2011 Feb;47(3):333–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2010.10.024>
126. Jakubovic BD, Jothy S. Glypican-3: From the mutations of Simpson–Golabi–Behmel genetic syndrome to a tumor marker for hepatocellular carcinoma. *Exp Mol Pathol* [Internet]. 2007 Apr;82(2):184–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17258707>
127. Kakar S, Gown AM, Goodman ZD, Ferrell LD. Best practices in diagnostic immunohistochemistry: hepatocellular carcinoma versus metastatic neoplasms. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2007 Nov;131(11):1648–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17979482>
128. Mondada D, Bosman FT, Fontollet C, Seelentag WKF. Elevated hepatocyte paraffin 1 and neprilysin expression in hepatocellular carcinoma are correlated with longer survival. *Virchows Arch* [Internet]. 2006 Jan 12;448(1):35–45. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00428-005-0081-5>
129. Chan ES, Yeh MM. The use of immunohistochemistry in liver tumors. *Clin Liver Dis* [Internet]. 2010 Nov;14(4):687–703. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cld.2010.10.001>
130. Lin F, Liu H. Immunohistochemistry in undifferentiated neoplasm/tumor of uncertain origin. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2014 Dec;138(12):1583–610. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25427040>
131. Saad RS, Luckasevic TM, Noga CM, Johnson DR, Silverman JF, Liu YL. Diagnostic value of HepPar1, pCEA, CD10, and CD34 expression in separating hepatocellular carcinoma from metastatic carcinoma in fine-needle aspiration cytology. *Diagn Cytopathol* [Internet]. 2004 Jan;30(1):1–6. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/dc.10345>
132. Lee HS, Kim WH, Kang GH. Hepatocyte Expressions in Hepatocellular Carcinomas, Gastrointestinal Neoplasms, and Non-neoplastic Gastrointestinal Mucosa: its Role as a Diagnostic Marker. *J Korean Med Sci* [Internet]. 2003 Dec;18(6):842. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14676441>
133. Elferink RP, Groen AK. The mechanism of biliary lipid secretion and its defects. *Gastroenterol Clin North Am* [Internet]. 1999 Mar;28(1):59–74, vi. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889855305700431>

134. Stieger B. Recent insights into the function and regulation of the bile salt export pump (ABCB11). *Curr Opin Lipidol* [Internet]. 2009;20(3):176–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19684528>
135. Zollner G, Wagner M, Fickert P, Silbert D, Fuchsbichler A, Zatloukal K, et al. Hepatobiliary transporter expression in human hepatocellular carcinoma. *Liver Int* [Internet]. 2005 Apr;25(2):367–79. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1478-3231.2005.01033.x>
136. Tomonari T, Takeishi S, Taniguchi T, Tanaka T, Tanaka H, Fujimoto S, et al. MRP3 as a novel resistance factor for sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* [Internet]. 2016 Feb 9;7(6):7207–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26769852>
137. Vander Borgh S, Libbrecht L, Blokzijl H, Nico Faber K, Moshage H, Aerts R, et al. Diagnostic and pathogenetic implications of the expression of hepatic transporters in focal lesions occurring in normal liver. *J Pathol* [Internet]. 2005 Dec;207(4):471–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16161006>
138. Lagana SM, Salomao M, Remotti HE, Knisely AS, Moreira RK. Bile salt export pump: A sensitive and specific immunohistochemical marker of hepatocellular carcinoma. *Histopathology*. 2015;66(4):598–602.
139. Nguyen T, Phillips D, Jain D, Torbenson M, Wu T-T, Yeh MM, et al. Comparison of 5 Immunohistochemical Markers of Hepatocellular Differentiation for the Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2015 Aug;139(8):1028–34. Available from: <http://www.archivesofpathology.org/doi/10.5858/arpa.2014-0479-OA>
140. Fujikura K, Yamasaki T, Otani K, Kanzawa M, Fukumoto T, Ku Y, et al. BSEP and MDR3. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2016 May;40(5):689–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26735860>
141. Silva AF-S. Aloísio Souza Felipe da Silva Análise da expressão de EGFR e proteínas relacionadas em carcinoma hepatocelular , tecido hepático circunjacente e metástases: estudo clínico-patológico em autópsias Tese apresentada à Faculdade de Medicina da [Internet]. School of Mecine of University São Paulo; 2013. Available from: www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5144/tde.../AloisioSouzaFelipedaSilva.pdf
142. Rocha EC, Mello ES de, Marins LV, Alves VAF. Muc5AC and Muc2 profile is different according to topography of cholangiocarcinoma. *Histopathology*. 2010;57(1):168.
143. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärnlund M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*. 1998;4(7):844–7.

144. DiVito KA, Charette LA, Rimm DL, Camp RL. Long-term preservation of antigenicity on tissue microarrays. *Lab Invest* [Internet]. 2004 Aug;84(8):1071–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15195116>
145. Bhan AK. Diagnostic strategies based on differentiation antigens. In: COLVIN RB, BHAN AK, McCLUSKEY RT, editors. *Diagnostic Immunopathology*. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995. p. 455–78.
146. Pascual S, Herrera I, Irurzun J. New advances in hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol* [Internet]. 2016 Mar 28;8(9):421–38. Available from: <http://www.wjgnet.com/1948-5182/full/v8/i9/421.htm>
147. Morris Jr SM. Recent advances in arginine metabolism: roles and regulation of the arginases. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2009 Jul;157(6):922–30. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1476-5381.2009.00278.x>
148. Namisaki T, Schaeffeler E, Fukui H, Yoshiji H, Nakajima Y, Fritz P, et al. Differential expression of drug uptake and efflux transporters in Japanese patients with hepatocellular carcinoma. *Drug Metab Dispos* [Internet]. 2014 Dec 31;42(12):2033–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25231932>
149. König J, Nies AT, Cui Y, Leier I, Keppler D. Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 1999 Dec 6;1461(2):377–94. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273699001698>
150. Nies AT, Keppler D. The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2). *Pflugers Arch* [Internet]. 2007 Feb;453(5):643–59. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00424-006-0109-y>
151. Hoblinger A, Grunhage F, Sauerbruch T, Lammert F. Association of the c.3972C>T variant of the multidrug resistance-associated protein 2 Gene (MRP2/ABCC2) with susceptibility to bile duct cancer. *Digestion* [Internet]. 2009;80(1):36–9. Available from: <http://www.karger.com/doi/10.1159/000212990>
152. Strassburg CP. Hyperbilirubinemia syndromes (Gilbert-Meulengracht, Crigler-Najjar, Dubin-Johnson, and Rotor syndrome). *Best Pract Res Clin Gastroenterol* [Internet]. 2010 Oct;24(5):555–71. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521691810000867>
153. Erlinger S, Arias IM, Dhumeaux D. Inherited disorders of bilirubin transport and conjugation: new insights into molecular mechanisms and consequences. *Gastroenterology* [Internet]. 2014 Jun;146(7):1625–38. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508514004442>

154. Nies AT, König J, Pfannschmidt M, Klar E, Hofmann WJ, Keppler D. Expression of the multidrug resistance proteins MRP2 and MRP3 in human hepatocellular carcinoma. *Int J cancer* [Internet]. 2001 Nov;94(4):492–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11745434>
155. Apte U, Krisnamurthy P. Molecular Pathology of Liver Diseases. In: Monga SPS, editor. *Molecular Pathology of Liver Diseases* [Internet]. Boston, MA: Springer US; 2010. p. 147–64. (Molecular Pathology Library). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-7107-4>
156. Korita P V, Wakai T, Shirai Y, Matsuda Y, Sakata J, Takamura M, et al. Multidrug resistance-associated protein 2 determines the efficacy of cisplatin in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* [Internet]. 2010 Apr;23(4):965–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20204280>
157. Atilano-Roque A, Roda G, Fogueri U, Kiser JJ, Joy MS. Effect of Disease Pathologies on Transporter Expression and Function. *J Clin Pharmacol* [Internet]. 2016 Jul;56 Suppl 7:S205-21. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcph.768>
158. Buettner S, van Vugt JLA, IJzermans J, Groot Koerkamp B. Intrahepatic cholangiocarcinoma: current perspectives. *Onco Targets Ther* [Internet]. 2017 Feb;Volume 10:1131–42. Available from: <https://www.dovepress.com/intrahepatic-cholangiocarcinoma-current-perspectives-peer-reviewed-article-OTT>
159. Nakanuma Y, Kakuda Y. Pathologic classification of cholangiocarcinoma: New concepts. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2015;29(2):277–93.
160. Komuta M, Spee B, Vander Borgh S, De Vos R, Verslype C, Aerts R, et al. Clinicopathological study on cholangiolocellular carcinoma suggesting hepatic progenitor cell origin. *Hepatology* [Internet]. 2008 May;47(5):1544–56. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.22238>
161. Ros JE, Roskams TAD, Geuken M, Havinga R, Splinter PL, Petersen BE, et al. ATP binding cassette transporter gene expression in rat liver progenitor cells. *Gut* [Internet]. 2003 Jul;52(7):1060–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12801967>

ANEXOS

Anexo A - Avaliação anatomopatológica dos 80 casos de autópsia de carcinoma hepatocelular.⁽¹⁴¹⁾

Identificação do caso		Nº de spots do caso	número de nódulos	tamanho do maior nódulo(cm)	Grau de diferenciação Edmondson Steiner	Padrão Arquitetural
Nº	Identificação do caso	Nº de spots	M=mais de 4 99=não informado	tamanho 99=não informado	1 a 4	0 = variante 1=trabecular 2=pseudoglandular 3=sólido 4=misto
1	HC2003/42	2	1	4,5	3	3
2	HC2003/51	4	M	99	2	1
3	HC2003/96	2	1	10	3	1
4	HC2003/301	2	1	3,0	1	1
5	HC2003/433	2	99	99	2	1
6	HC2003/434	2	1	99	3	1
7	HC2003/450	2	99	99	3	3
8	HC2003/504	4	1	99	3	4
9	HC2003/575	2	1	1,5	2	4
10	HC2003/728	1	1	5	2	4
11	HC2003/752	2	2	2	2	1
12	HC2003/780	2	1	99	2	1
13	HC2003/805	2	M	99	3	4
14	HC2003/867	2	M	8	3	2
15	HC2003/919	2	1	2	3	1
16	HC2003/1003	2	M	3	3	1
17	HC2003/1058	2	1	6,5	4	3
18	HC2003/1064	2	M	99	3	1
19	HC2004/29	2	M	99	2	2
20	HC2004/183	2	1	5,5	2	2
21	HC2004/372	3	M	2,5	4	3
22	HC2004/494	2	M	1,9	3	1
23	HC2004/553	3	M	8,5	4	3
24	HC2004/638	4	2	15	3	1
25	HC2004/941	2	1	2,5	2	1
26	HC2004/1027	1	1	6	2	1
27	HC2005/161	2	M	6	3	1
28	HC2005/241	2	1	2	3	1
29	HC2005/298	2	M	5	3	1
30	HC2005/302	2	2	0,8	2	0
31	HC2005/405	1	99	1,5	3	1
32	HC2005/413	4	M	2	3	1
33	HC2005/457	2	M	2,5	3	1
34	HC2005/644	3	M	99	3	2
35	HC2005/724	2	1	2,5	2	1
36	HC2005/777	2	1	17	4	1
37	HC2005/818	4	4	1,5	4	3
38	HC2006/28	2	M	5,5	2	1
39	HC2006/32	2	1	1	3	1
40	HC2006/173	4	4	1,6	3	3
41	HC2006/212	2	M	10	3	2
42	HC2006/292	1	1	4	3	4
43	HC2006/494	2	99	99	2	2
44	HC2006/598	2	M	1,5	3	1
45	HC2006/731	2	1	1,1	3	1
46	HC2006/822	2	1	3	3	1
47	HC2006/856	2	99	99	4	3
48	HC2007/2380	3	M	14	3	3
49	HC 2004/430	2	M	12	3	4
50	HC2003/839	6	M	9,5	3	1
51	HC2003/427	2	99	99	2	2
52	HC2003/481	6	M	3	3	1
53	HC2003/77	2	99	99	3	3
54	HC2003/610	2	M	99	3	3
55	HC2003/386	2	99	99	3	3
56	HC2004/85	2	M	99	3	3
57	HC2004/737	2	M	18	3	2
58	HC2004/333	2	M	8	2	1
59	HC2006/631	2	M	99	3	3
60	HC2006/733	2	1	6,5	2	2
61	HC2007/626	6	4	4	3	4
62	HC2007/542	6	2	6	2	3
63	HC2007/290	4	M	99	4	3
64	HC2007/328	2	M	8,5	4	3
65	HC2007/23	3	M	4,1	3	1
66	HC2007/142	3	3	4	4	3
67	HC2008/59	3	M	99	3	1
68	HC2008/258	3	4	8	2	1
69	HC2008/168	3	1	8	3	3
70	HC2008/316	3	1	2,5	3	1
71	HC2008/583	3	M	4	3	3
72	HC2008/431	6	M	5	3	3
73	HC2008/267	3	M	99	3	0
74	HC2008/109	3	M	5	2	1
75	HC2008/477	5	M	6	4	3
76	HC2008/546	2	1	1	2	1
77	HC2008/420	7	M	13	3	1
78	HC2009/120	6	M	2	4	3
79	HC2009/472	9	M	5	3	4
80	HC2009/494	6	1	4	3	3

Anexo B - Avaliação anatomopatológica dos 56 casos de colangiocarcinoma.⁽¹⁴²⁾

Identificação do caso			Nº de spots do caso	Localização	Padrão macroscópico de crescimento	Subtipo histológico	Diferenciação
Nº do caso	Identificação do caso	Nº do caso	Nº de spots	1= intra-hepático periférico 2 = extra-hepático 3 =intra-hepático hilar	1=formador de massa 2=peri-ductal 3=intra-ductal	1=ductal 2=ductular mal formação de placa 3= ductular cél interm	1 = BD 2 = MD 3 = PD 4 = IND
1	B92-4777	1	2	3	2	1	1
2	B92-4897	2	2	3	2	1	1
3	B92-6345	3	2	3	1	3	2
4	B92-12034	4	2	2	2	1	1
5	12-7669-7	5	2	2	2	1	1
6	13-6833-8	6	2	3	2	1	1
7	14-6745-0	7	2	2	2	1	1
8	16-1690-0	8	2	1	1	3	2
9	18-5846-7	9	2	3	2	1	1
10	23-3368-6	10	2	3	2	1	1
11	26-3765-0	11	2	1	1	2	2
12	26-4579-3	12	2	3	1	1	1
13	269868-4	13	2	3	1	1	1
14	271135-4	14	2	1	1	3	2
15	28-3542-8	15	2	1	1	3	2
16	289459-9	16	2	3	1	3	2
17	30-6860-9	17	2	1	1	2	2
18	30-6911	18	2	3	1	1	1
19	34-8712-1	19	2	3	2	1	1
20	36-7167-4	20	2	2	2	1	1
21	36-8299-4	21	2	3	2	1	1
22	36-9536-0	22	2	2	2	1	1
23	37-2993-1	23	2	2	2	1	1
24	40-8527-2	24	2	3	1	3	2
25	41-8200-6	25	2	2	2	1	1
26	42-5186-5	26	2	3	1	1	2
27	43-5759-0	27	2	1	1	1	2
28	43-7369-3	28	2	3	1	1	1
29	43-7911-0	29	2	3	2	1	1
30	45-5634-8	30	2	2	2	1	1
31	45-8932-7	31	2	2	2	1	4
32	49-7046-2	32	2	2	2	1	1
33	51-1195-1	33	2	1	1	3	2
34	51-3301-7	34	2	2	3	1	1
35	51-8451-7	35	2	3	2	1	1
36	53-2229-4	36	2	3	2	1	2
37	55-0608-5	37	2	2	2	1	2
38	56-0485-0	38	2	1	1	3	2
39	56-0489-3	39	2	2	2	1	1
40	58-2172-0	40	2	3	2	1	1
41	58-8718-6	41	2	2	2	1	1
42	59-2914-8	42	2	3	1	1	1
43	60-5546-0	43	2	2	2	1	3
44	61-2196-9	44	2	3	2	1	1
45	61-3152-2	45	2	2	2	1	1
46	61-3273-1	46	2	3	2	1	1
47	63-2525-4	47	2	3	2	1	1
48	70-3930	48	2	3	2	1	2
49	06 6682	49	2	3	2	1	3
50	07 3786	50	2	1	1	2	2
51	07 9481	51	2	2	2	1	1
52	07 39270	52	2	3	2	1	2
53	07 41297	53	2	2	2	1	2
54	2008-6549	54	2	1	1	3	3
55	2009-32807	55	2	3	2	1	2
56	2009-42733	56	2	1	1	2	1

Apêndice A – Avaliação (maior valor do escore) das reações imuno-histoquímicas com os anticorpos BSEP (monoclonal e policlonal), MDR3, MRP2, MRP3, CEA policlonal, Hep-Par-1 e Arginase-1 nos 80 casos de autópsia de carcinoma hepatocelular.

Identificação do caso		BSEP monoclonal (cloneF6)	BSEP policlonal (código HPA019035)	MDR3 monoclonal (clone P3II-26)	MRP2 monoclonal (clone M2 III-6)	MRP3 monoclonal (clone DTX-1)	CEA policlonal (código A0115)	Hep Par-1 monoclonal (clone OCH1E5)	Arginase-1 policlonal (código HPA003595)
Nº	Identificação do caso	maior valor do escore	maior valor do escore	maior valor do escore	maior valor do escore	maior valor do escore	maior valor do escore	maior valor do escore	maior valor do escore
1	HC2003/42	0	10	0	0	0	0	10	0
2	HC2003/51	60	120	180	320	60	240	400	400
3	HC2003/96	0	0	0	0	0	0	0	0
4	HC2003/301	280	320	180	120	0	180	400	400
5	HC2003/433	0	10	10	240	0	210	320	320
6	HC2003/434	40	60	90	150	0	120	360	400
7	HC2003/450	0	0	0	80	0	60	90	300
8	HC2003/504	240	320	180	280	60	180	210	400
9	HC2003/575	200	320	320	200	100	240	360	400
10	HC2003/728	240	320	320	280	80	180	400	400
11	HC2003/752	60	140	0	280	10	280	360	400
12	HC2003/780	40	280	180	240	10	160	400	360
13	HC2003/805	40	20	0	120	0	0	300	400
14	HC2003/867	280	320	180	280	210	200	400	240
15	HC2003/919	120	60	0	180	10	160	40	270
16	HC2003/1003	120	90	80	80	0	40	300	400
17	HC2003/1058	0	0	0	90	0	99	80	400
18	HC2003/1064	120	180	40	210	0	10	270	240
19	HC2004/29	160	320	40	200	0	200	300	400
20	HC2004/183	0	10	40	120	0	90	400	400
21	HC2004/372	40	120	0	150	10	240	0	300
22	HC2004/494	120	280	80	280	10	40	10	400
23	HC2004/553	90	120	120	200	0	280	360	400
24	HC2004/638	40	160	80	120	0	60	300	400
25	HC2004/941	200	320	180	240	240	210	400	400
26	HC2004/1027	40	180	40	80	0	10	0	99
27	HC2005/161	160	240	40	180	0	40	400	300
28	HC2005/241	60	60	80	240	80	320	120	400
29	HC2005/298	40	40	60	210	0	90	150	0
30	HC2005/302	0	20	40	150	0	90	400	240
31	HC2005/405	99	20	120	120	0	320	40	99
32	HC2005/413	120	210	210	180	10	280	400	400
33	HC2005/457	40	40	0	210	0	40	60	40
34	HC2005/644	60	90	10	120	0	180	400	400
35	HC2005/724	150	210	240	210	60	40	240	300
36	HC2005/777	0	10	0	10	0	100	0	400
37	HC2005/818	0	0	0	80	0	20	90	150
38	HC2006/28	120	150	80	160	150	150	270	400
39	HC2006/32	40	100	40	180	60	90	400	400
40	HC2006/173	99	0	99	99	0	99	99	99
41	HC2006/212	280	320	140	360	80	200	400	400
42	HC2006/292	240	240	150	60	0	180	360	99
43	HC2006/494	40	60	150	240	0	240	400	400
44	HC2006/598	99	20	60	99	0	20	99	300
45	HC2006/731	0	0	0	90	0	150	0	120
46	HC2006/822	60	60	0	80	0	240	160	99
47	HC2006/856	90	40	0	80	0	99	60	300
48	HC2007/2380	0	0	0	210	0	100	10	10
49	HC 2004/430	60	180	10	120	0	100	60	400
50	HC2003/839	40	40	0	120	0	0	360	240
51	HC2003/427	90	40	0	120	0	160	60	160
52	HC2003/481	0	20	0	40	0	10	400	400
53	HC2003/77	80	100	60	60	10	80	300	400
54	HC2003/610	0	0	10	150	0	20	60	280
55	HC2003/386	99	99	0	160	0	99	99	120
56	HC2004/85	360	320	0	120	0	80	400	120
57	HC2004/737	40	10	0	60	0	180	400	400
58	HC2004/333	120	120	0	40	0	120	280	300
59	HC2006/631	90	120	99	120	0	120	99	240
60	HC2006/733	120	60	280	180	0	240	400	400
61	HC2007/626	320	320	60	240	10	280	400	400
62	HC2007/542	120	60	60	90	0	20	300	400
63	HC2007/290	0	80	0	20	0	20	270	120
64	HC2007/328	99	0	0	210	0	90	0	0
65	HC2007/723	40	30	120	210	0	120	210	400
66	HC2007/142	60	0	0	80	0	90	280	400
67	HC2008/59	40	10	0	0	0	0	90	300
68	HC2008/258	180	100	180	240	0	180	400	400
69	HC2008/168	40	30	0	60	0	40	100	270
70	HC2008/316	0	0	0	10	0	0	300	0
71	HC2008/583	320	320	210	280	0	320	400	400
72	HC2008/431	150	210	180	60	0	120	400	400
73	HC2008/267	0	10	0	0	0	0	0	30
74	HC2008/109	60	40	60	120	0	120	400	400
75	HC2008/477	280	180	120	150	120	200	300	360
76	HC2008/546	280	150	120	90	0	120	160	400
77	HC2008/420	120	90	60	90	40	180	400	400
78	HC2009/120	0	0	0	40	0	0	10	400
79	HC2009/472	180	80	120	240	40	280	400	400
80	HC2009/494	120	60	120	90	30	280	300	400

Apêndice B – Avaliação (maior valor do escore) das reações imuno-histoquímicas com os anticorpos BSEP (monoclonal e policlonal), MDR3, MRP2, MRP3, CEA policlonal, Hep-Par-1 e Arginase-1 nos 56 casos de colangiocarcinoma.

Identificação do caso		BSEP monoclonal (cloneF6)	BSEP policlonal (código HPA019035)	MDR3 monoclonal (clone P3II-26)	MRP2 monoclonal (clone M2 III-6)	MRP3 monoclonal (clone DTX-1)	CEA policlonal (código A0115)	Hep Par-1 monoclonal (clone OCH1E5)	Arginase-1 policlonal (código HPA003595)
Nº do caso	Identificação do caso	maior valor do escore	maior valor do escore	maior valor do escore	maior valor do escore	maior valor do escore	maior valor do escore	maior valor do escore	maior valor do escore
1	B92-4777	99	0	99	99	99	99	99	0
2	B92-4897	0	0	0	120	150	240	0	0
3	B92-6345	0	0	0	120	10	10	0	0
4	B92-12034	0	0	0	180	0	120	0	0
5	12-7669-7	0	0	0	60	0	150	0	0
6	13-6833-8	0	0	0	180	10	120	0	0
7	14-6745-0	0	0	0	80	60	150	0	0
8	16-1690-0	0	0	0	60	10	240	0	30
9	18-5846-7	0	0	0	280	150	210	0	99
10	23-3368-6	0	0	0	60	0	320	0	0
11	26-3765-0	0	0	0	180	0	120	0	0
12	26-4579-3	0	0	0	210	90	240	0	0
13	269868-4	0	0	0	100	80	320	0	0
14	271135-4	0	0	0	100	10	240	10	0
15	28-3542-8	0	0	0	120	120	100	30	0
16	289459-9	0	0	0	40	0	120	60	99
17	30-6860-9	0	0	0	280	0	60	0	0
18	30-6911	0	0	0	210	0	280	0	0
19	34-8712-1	0	0	0	360	210	240	0	0
20	36-7167-4	0	0	0	360	320	210	0	0
21	36-8299-4	0	0	0	100	40	240	0	0
22	36-9536-0	0	0	0	120	60	150	40	0
23	37-2993-1	0	0	0	240	10	280	120	0
24	40-8527-2	0	0	0	240	0	80	0	0
25	41-8200-6	0	0	0	280	210	280	0	0
26	42-5186-5	0	0	0	120	0	10	0	0
27	43-5759-0	0	0	0	240	80	160	0	0
28	43-7369-3	0	0	0	20	0	320	0	0
29	43-7911-0	0	0	0	150	10	240	0	0
30	45-5634-8	0	0	0	180	60	180	0	0
31	45-8932-7	0	0	0	0	0	280	120	0
32	49-7046-2	0	0	0	320	120	150	0	0
33	51-1195-1	0	0	0	60	0	0	0	0
34	51-3301-7	0	0	0	150	10	90	0	0
35	51-8451-7	0	0	0	100	0	280	0	0
36	53-2229-4	0	0	0	60	40	240	0	0
37	55-0608-5	0	0	0	20	0	360	0	0
38	56-0485-0	0	0	0	40	0	320	99	0
39	56-0489-3	0	0	0	100	0	120	0	0
40	58-2172-0	0	0	0	210	80	120	0	0
41	58-8718-6	0	0	0	210	210	150	0	0
42	59-2914-8	0	0	0	150	240	210	0	0
43	60-5546-0	0	0	0	120	10	60	0	0
44	61-2196-9	0	0	0	120	60	180	20	0
45	61-3152-2	0	99	99	99	99	99	99	0
46	61-3273-1	0	0	0	180	60	60	10	99
47	63-2525-4	0	0	0	100	10	100	0	10
48	70-3930	0	0	0	80	40	210	0	99
49	06 6682	0	0	0	60	10	280	0	0
50	07 3786	0	0	0	210	140	180	0	40
51	07 9481	0	0	0	240	10	150	0	0
52	07 39270	0	0	0	120	20	280	0	0
53	07 41297	0	0	0	280	210	280	0	0
54	2008-6549	0	0	0	10	0	40	0	0
55	2009-32807	0	0	0	20	0	320	0	0
56	2009-42733	0	0	0	30	0	40	0	0