

VANESSE MARIA DA COSTA

Análise da expressão e da amplificação do receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR) em colangiocarcinoma e a correlação com os tipos histológicos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Evandro Sobroza de Mello

São Paulo

2022

VANESSE MARIA DA COSTA

Análise da expressão e da amplificação do receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR) em colangiocarcinoma e a correlação com os tipos histológicos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Evandro Sobroza de Mello

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Costa, Vanesse Maria da
Análise da expressão e da amplificação do
receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR)
em colangiocarcinoma e a correlação com os tipos
histológicos / Vanesse Maria da Costa. -- São Paulo,
2022.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientador: Evandro Sobroza de Mello.

Descritores: 1.Colangiocarcinoma 2.Neoplasias do
sistema biliar 3.Classificação histológica 4.Genes
erbB-1 5.Variações do número de cópias de DNA
6.Expressão proteica

USP/FM/DBD-482/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

AGRADECIMENTOS

Ao querido Prof. Dr. Evandro Sobroza de Mello pela orientação dedicada neste estudo, meu eterno agradecimento pela oportunidade de desenvolver meu conhecimento científico. Sou imensamente grata pela confiança, paciência e incentivo depositado no meu trabalho. Minha imensa admiração pelo exemplo como pesquisador e grandioso professor que sempre pude presenciar. Serei eternamente grata por acreditar em mim, por não me deixar desanimar nos momentos de dificuldade, pelas inúmeras palavras de conforto e pelos valiosos ensinamentos que jamais serão esquecidos, sem a sua competência este trabalho jamais seria possível. Agradeço demais o espaço de crescimento profissional dentro do Laboratório de Anatomia Patológica do ICESP na minha carreira como bióloga.

Ao Prof. Dr. Venancio Avancini Ferreira Alves pela oportunidade de fazer parte do departamento e pelos grandiosos ensinamentos durante as aulas de patologia hepática.

À Marina Alessandra Pereira que foi a primeira pessoa que plantou a sementinha da pesquisa científica na minha mente e a partir daí foi onde tudo começou, mas não apenas por isso, mas também por toda ajuda concedida neste estudo.

Ao Prof. Dr. Ibere Cauduro Soares pela enorme paciência, dedicação, ensinamentos e contribuições na área da patologia molecular. Sou grata pelas sugestões e críticas apontadas no exame de qualificação.

Aos Profs. Drs. Amaro Nunes Duarte Neto e José Jukemura que também contribuíram com críticas e sugestões no exame de qualificação.

À Aline, Alda e Nathalia pelo apoio técnico das reações realizadas. Sou grata a toda equipe de auxiliares de laboratório, técnicos e biólogos do Laboratório de Anatomia Patológica do ICESP, pela amizade e pelo incentivo que foram importantíssimos nos dias de dificuldade, em especial ao Thiago, Alceia, Marcela, Maria, Paula, Camila e Andreia. Também aos colegas que já passaram pelo serviço, em especial ao David, Rodrigo e Taiçara. Todos de alguma forma me ajudaram muito nessa jornada e estiveram comigo desde o início.

Agradeço a Dra. Regina Schultz pelas oportunidades e auxílios no meu crescimento profissional. Aos médicos patologistas do departamento que sempre esclareceram minhas dúvidas durante a macroscopia.

Agradeço a minha família que é meu alicerce e aos meus amigos que sempre me apoiaram e me incentivaram na minha vida profissional. Aos meus pais Maria e Joaquim que me ensinaram o valor de trabalhar duro e correr atrás dos meus objetivos. A minha querida irmã Maria e a minha amada sobrinha Lívia pelo enorme amor que sempre tiveram comigo.

Aos médicos patologistas Fabio Molinari e Ellen Nascimento que foram os meus primeiros mentores no começo da minha vida profissional como bióloga e a todos os professores que passaram pela minha vida.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente me ajudaram a realizar esse trabalho e que eu possa ter esquecido de mencionar.

Aos pacientes e familiares desse estudo meu eterno respeito.

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

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

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

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de quadros

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
1.1 EMBRIOLOGIA E ANATOMIA DAS VIAS BILIARES	7
1.2 COLANGIOCARCINOMA	8
1.3 EPIDEMIOLOGIA E FATORES DE RISCO	8
1.4 CLASSIFICAÇÃO TOPOGRÁFICA, MACROSCÓPICA E HISTOLÓGICA DO COLANGIOCARCINOMA	10
1.5 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DO COLANGIOCARCINOMA	13
1.6 ASPECTOS MOLECULARES DO COLANGIOCARCINOMA	14
1.7 RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO (EGFR).....	16
1.8 EGFR COMO ALVO NO TRATAMENTO CONTRA O CÂNCER.....	17
1.9 COLANGIOCARCINOMA E EGFR.....	18
2. OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO PRINCIPAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
2.3 JUSTIFICATIVA.....	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	21
3.2 SELEÇÃO DOS CASOS	21
3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	21
3.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	21
3.5 DESENHO DO ESTUDO	22
3.6 CRONOLOGIA.....	22
3.7 VARIÁVEIS CLÍNICO-PATOLÓGICAS.....	23
3.7.1 DADOS CLÍNICOS.....	23
3.7.2 DADOS ANATOMOPATOLÓGICOS	23
3.8 TÉCNICA HISTOLÓGICA CONVENCIONAL (COLORAÇÃO H&E).....	28
3.9 ARRANJOS EM MATRIZ TECIDUAL (TMA).....	29
3.10 ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO	29
3.10.1 INTERPRETAÇÃO DAS REAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS	32
3.10.2 INTERPRETAÇÃO DA REAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA O EGFR.....	32
3.10.3 INTERPRETAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DOS DEMAIS ANTICORPOS	35
3.11 HIBRIDIZAÇÃO EM SITU POR FLUORESCÊNCIA (FISH)	39
3.11.1 REAÇÃO DE FISH	39
3.11.2 INTERPRETAÇÃO DA REAÇÃO DE FISH	40
3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	42

4. RESULTADOS	43
4.1 CASUÍSTICA, ASPECTOS GERAIS E ASPECTOS ANATOMOPATOLÓGICOS.....	43
4.2 ASPECTOS ANATOMOPATOLÓGICOS.....	45
4.3 ANÁLISE DA REATIVIDADE IMUNO-HISTOQUÍMICA DO EGFR.....	46
4.4 ANÁLISE DA REAÇÃO DE FISH DO EGFR.....	48
4.5 ANÁLISE DO STATUS DA EXPRESSÃO E AMPLIFICAÇÃO DO EGFR EM RELAÇÃO AOS DEMAIS MARCADORES.....	51
4.6 ASPECTOS ETIOLÓGICOS DO COLANGIOCARCINOMA.....	55
4.7 ANÁLISE DA REATIVIDADE IMUNO-HISTOQUÍMICA DOS DEMAIS ANTICORPOS.....	59
5. DISCUSSÃO	63
5.1 STATUS DO EGFR NO COLANGIOCARCINOMA.....	63
5.2 SUBTIPOS HISTOLÓGICOS DO COLANGIOCARCINOMA.....	69
5.3 ASPECTOS ANATOMOPATOLÓGICOS.....	71
5.4 ASPECTOS ETIOLÓGICOS.....	72
5.5 Outros Aspectos Moleculares.....	74
6. CONCLUSÕES	78
7. REFERÊNCIAS	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BILIN	Neoplasia intraepitelial biliar (do inglês)
CC	Colangiocarcinoma
CCI	Carcinoma de células intermediárias
CHC	Carcinoma hepatocelular
CLC	Colangiolo carcinoma
DAP	Divisão de Anatomia Patológica
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico (do inglês)
FISH	Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência (do inglês)
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade do Estado de São Paulo
GD	Grandes ductos
HC	Hospital das Clínicas
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina USP
HE	Coloração hematoxilina & eosina
ICESP	Instituto do Câncer do Estado de São Paulo
IHQ	Imuno-histoquímica
LIM-14	Laboratório de Investigação Médica 14 da FMUSP
OMS	Organização Mundial da Saúde
PL	Papilífero
TMA	Micromatriz tecidual (do inglês)
HBV	Vírus da Hepatite B (do inglês)
HCV	Vírus da Hepatite C (do inglês)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Anatomia das vias biliares.....	7
Figura 2 - Classificação topográfica do colangiocarcinoma.....	10
Figura 3 - Padrão de crescimento macroscópico das lesões.....	11
Figura 4 - Padrão de crescimento infiltrativo periductal.....	24
Figura 5 - Padrão de crescimento formador de massa.....	25
Figura 6 - Padrão de crescimento intraductal.....	25
Figura 7 - Análise microscópica: subtipo grandes ductos (HE aumento 100x).....	26
Figura 8 - Análise microscópica: subtipo colangiolo carcinoma (HE aumento 100x).....	27
Figura 9 - Análise microscópica: subtipo células intermediárias (HE aumento 100x).....	27
Figura 10 - Análise microscópica: subtipo papilífero (HE aumento 100x).....	28
Figura 11 - Exemplo da classificação da reatividade IHQ para o EGFR. (aumento 100x).....	34
Figura 12 - Exemplo da classificação positiva do EGFR 2+ (IHQ aumento 200x).....	34
Figura 13 - Exemplo da classificação positiva do EGFR 3+ (IHQ aumento 200x).....	35
Figura 14 - Exemplo da reatividade positiva das mucinas A) MUC1; B) MUC2; C) MUC5AC e D) MUC6 (IHQ aumento 100x).....	36
Figura 15 - Exemplo da reatividade positiva: A) Hep-Par e B) Vimentina (IHQ aumento 100X).....	37
Figura 16 - Exemplo da reatividade positiva: A) CD56 e B) CD133 (IHQ aumento 100x).....	37

Figura 17 - Exemplo da mutação da B-catenina (IHQ aumento 100x).....	37
Figura 18 - Exemplo da perda da expressão da E-caderina (IHQ aumento 100x).....	38
Figura 19 - Exemplo da reatividade positiva da Arginase (IHQ aumento 100x).....	38
Figura 20 - Exemplo da amplificação do EGFR pela técnica de FISH.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sumário dos aspectos gerais de 74 pacientes com diagnóstico de colangiocarcinoma.....	43
Tabela 2 - Relação entre as variáveis anatomopatológicas e os subtipos histológicos.....	45
Tabela 3 - Distribuição da reatividade imuno-histoquímica do EGFR em relação aos subtipos histológicos.....	46
Tabela 4 - Distribuição da reatividade imuno-histoquímica do EGFR em relação aos aspectos anatomopatológicos	47
Tabela 5 - Distribuição da reação de FISH do EGFR em relação aos subtipos histológicos.....	48
Tabela 6 - Relação entre a distribuição do status da amplificação com a reatividade IHQ do EGFR.....	49
Tabela 7 - Distribuição do status da amplificação do EGFR em relação aos aspectos anatomopatológicos.....	50
Tabela 8 - Análise da relação entre a distribuição da reatividade do EGFR e os demais marcadores.....	51
Tabela 9 - Análise da relação entre o status da amplificação do EGFR e os demais marcadores.	53
Tabela 10 - Relação entre as doenças de base e os subtipos histológico.....	55
Tabela 11 - Relação entre as doenças de base e a imunexpressão do EGFR.	57
Tabela 12 - Relação entre as doenças de base e o status da amplificação do EGFR.	58
Tabela 13 - Distribuição da reatividade imuno-histoquímica dos demais anticorpos em relação aos subtipos histológicos.....	59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Especificações das reações imuno-histoquímicas para cada marcador	31
Quadro 2 - Resumo da interpretação da reatividade imuno-histoquímica para o EGFR.....	33
Quadro 3 - Resumo da interpretação da reatividade imuno-histoquímica para os demais anticorpos.....	39

RESUMO

Costa VM. *Análise da expressão e da amplificação do receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR) em colangiocarcinoma e a correlação com os tipos histológicos* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

Introdução: O colangiocarcinoma (CC) é uma neoplasia com diferenciação para o epitélio biliar, que nos últimos anos tem sido classificado em vários subtipos histológicos, com diferentes localizações ao longo da árvore biliar, padrões macroscópicos de crescimento e possivelmente diferentes perfis imuno-histoquímicos. O EGFR está ligado à carcinogênese e progressão tumoral e no CC pode estar relacionado a fatores como crescimento tumoral. **Objetivos:** avaliar o nível de expressão e amplificação do EGFR correlacionando esses achados com os tipos histológicos do CC. **Métodos:** foram avaliados retrospectivamente 74 espécimes cirúrgicos de pacientes diagnosticados com CC no período de 1992 a 2017. Os casos foram classificados de acordo com sua morfologia em grandes ductos (GD), colangiocarcinoma (CLC), carcinoma de células intermediárias (CCI) e carcinoma papilífero (PL). Dados como idade, sexo, tamanho da lesão, topografia, aspecto de crescimento e evidencia de doença hepática de base foram coletados. As áreas representativas das neoplasias foram dispostas em *tissue microarrays* (TMAs) para o estudo imuno-histoquímico (IHQ) com os anticorpos EGFR, MUC1, MUC2, MUC5AC, MUC6, B-catenina, E-caderina, CD56, CD133, Vimentina, Arginase e Hep-Par. O status da amplificação do EGFR foi estudado através da técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH). **Resultados:** foram 55,5 % homens e 44,5 % mulheres, com idade média de 57,2 anos e tamanho médio da lesão de 4,49 cm. Os casos foram distribuídos em 66,2% (GD), 21,7 % (CLC), 8,1% (PL) e 4,0 % (CCI), sendo a topografia peri-hilar (54%) mais frequente, seguida da extra-hepática (27%) e intra-hepática (19%). O padrão de crescimento infiltrativo periductal (60,9%) foi o mais observado, seguido do formador de massa (33,7%) e intraductal (5,4%). A colangite crônica foi observada em 32 casos, a mal formação da placa ductal em 12, esteatose hepática em 11, cirrose em 5, litíase intra-hepática em 3 e hepatite B em 2 casos. A expressão do EGFR foi observada em 80,2% (57/71) dos casos, sendo a intensidade 2+ a mais frequente 55% (39/71) e membrana incompleta a mais observada 54,9% (39/71). Cem por cento (3/3) dos casos de CCI foram positivos, seguidos do CLC com 86,7% (13/15), PL com 80% (4/5) e GD 77% (37/48). Não houve correlação estatística entre a reatividade do EGFR com os tipos histológicos do CC

$p=(0,934)$. A amplificação do EGFR estava presente em 10,5% (5/48), distribuídos em 12,5% (4/32) do subtipo GD e 12,5% (1/8) do subtipo CLC. Não houve correlação estatística entre a amplificação do EGFR com os subtipos histológicos do CC $p=(0,885)$. A maioria dos CC foram positivos para MUC1 (93,1%) e muitos deles foram positivos para MUC5AC (43,6%), enquanto uma menor parte foi positiva para MUC6 (30,5%) e MUC2 (15,2%). CD133 (25,3%), vimentina (22%), Hep-Par (17%), CD56 (11,4%), Arginase (7,3%) também foram detectados. A mutação da b-catenina e a perda da expressão da e-caderina foram observadas em 3 casos cada. Conclusões: O nível de expressão IHQ do EGFR é alto em todos os subtipos histológicos de CC. A amplificação do EGFR, evidenciada por FISH, ocorreu em pequena parcela dos casos do subtipo GD e CLC. Não houve uma clara correlação entre o padrão de expressão imuno-histoquímica da proteína e a amplificação do gene.

Descritores: Colangiocarcinoma, Neoplasia do sistema biliar, Classificação histológica, Genes erbB-1, Variações do número de cópias de DNA, Expressão proteica.

ABSTRACT

Costa VM. *Analysis of the expression and amplification of the epidermal growth factor receptor (EGFR) in cholangiocarcinoma and the correlation with histological types* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022.

Introduction: Cholangiocarcinoma (CC) is a neoplasm with differentiation to the biliary epithelium, which in recent years has been classified into several histological subtypes, with different locations along the biliary tree, macroscopic growth patterns and possibly immunohistochemistry profiles. EGFR is linked to carcinogenesis and tumor progression and in CC it may be related to factors such as tumor growth. **Objectives:** to evaluate the level of EGFR expression and amplification correlating these findings with the histological types of CC. **Methods:** We retrospectively evaluated 74 surgical specimens from patients diagnosed with CC in the period from 1992 to 2017. The cases were classified according to their morphology into large ducts (LD), cholangiolocarcinoma (CLC), intermediate cell carcinoma (ICC) and papillary carcinoma (PL). Data such as age, sex, tumor size, topography, growth pattern and evidence of underlying liver disease were collected. Representative areas of neoplasms were arranged on tissue microarrays (TMA) for immunohistochemical study (IHC) with antibodies EGFR, MUC1, MUC2, MUC5AC, MUC6, B-catenin, E-cadherin, CD56, CD133, Vimentin, Arginase and Hep-Par. The status of EGFR amplification was studied using the Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) technique. **Results:** 55,5% were men and 44,5% were women, with a mean age of 57,2 years and a mean lesion size of 4,49 cm. The cases were distributed in 66,2% (LD), 21,7% (CLC), 8,1% (PL) and 4,0% (ICC), with the perihilar topography (54%) being the most frequent, followed by extrahepatic (27%) and intrahepatic (19%) locations. The periductal infiltrative growth pattern (60,9%) was the most observed, followed by mass former (33,7%) and intraductal (5,4%) patterns. Chronic cholangitis was observed in 32 cases, ductal plate malformation in 12, hepatic steatosis in 11, cirrhosis in 5, intrahepatic lithiasis in 3 and hepatitis B in 2 cases. EGFR immunohistochemical expression was observed in 80,2% (57/71) of the cases, with intensity 2+ being the most frequent (55%, 39/71) and incomplete membrane the most observed (54,9%, 39/71). All (3/3) of ICC cases were positive, followed by CLC with 86,7% (13/15), PL with 80% (4/5) and LD 77% (37/48). There was no statistical correlation between EGFR reactivity with CC histological types $p=(0,934)$. EGFR amplification was present in 10,5% (5/48), distributed in 12,5% (4/32) of the LD subtype and 12,5% (1/8) of the CLC subtype. There was no statistical correlation between EGFR amplification with CC histological subtypes $p=(0,885)$. Most CC were positive for MUC1 (93,1%) and many of them were positive for MUC5AC (43,6%), while a smaller part was positive for MUC6 (30,5%) and MUC2 (15,2%). CD133 (25,3%), vimentin (22%), Hep-Par (17%), CD56 (11,4%), Arginase (7,3%) were also detected. The b-catenin mutation and loss of e-cadherin expression were observed in 3 cases each. **Conclusions:** The level of EGFR IHC expression is high in all histological subtypes of CC. EGFR amplification, evidenced by FISH, occurred in a small portion of the LD and CLC subtype cases. There was no clear

correlation between the immunohistochemical pattern of protein expression and gene amplification.

Descriptors: Cholangiocarcinoma, Biliary tract neoplasms, Histological classification, Genes erbB-1, DNA copy number variations, Protein expression

1. INTRODUÇÃO

1.1 Embriologia e anatomia das vias biliares

A via biliar é formada por um conjunto de ductos intra e extra-hepáticos, que se comunicam com o fígado, duodeno, pâncreas e com a vesícula biliar.¹ Os ductos biliares são classificados em pequenos (<300 µm) e grandes ductos (>300 µm). Localizados na porção intra-hepática, os dútulos (<15 µm), ductos interlobulares (15-100 µm) e septais (100-300 µm) são considerados ductos pequenos, já os grandes ductos são representados pelos ductos segmentares (400-800 µm).² A árvore biliar extra-hepática é formada pelos ductos hepáticos direito, esquerdo, ducto hepático comum, ducto cístico e ducto colédoco^{1,2} (Figura 1).

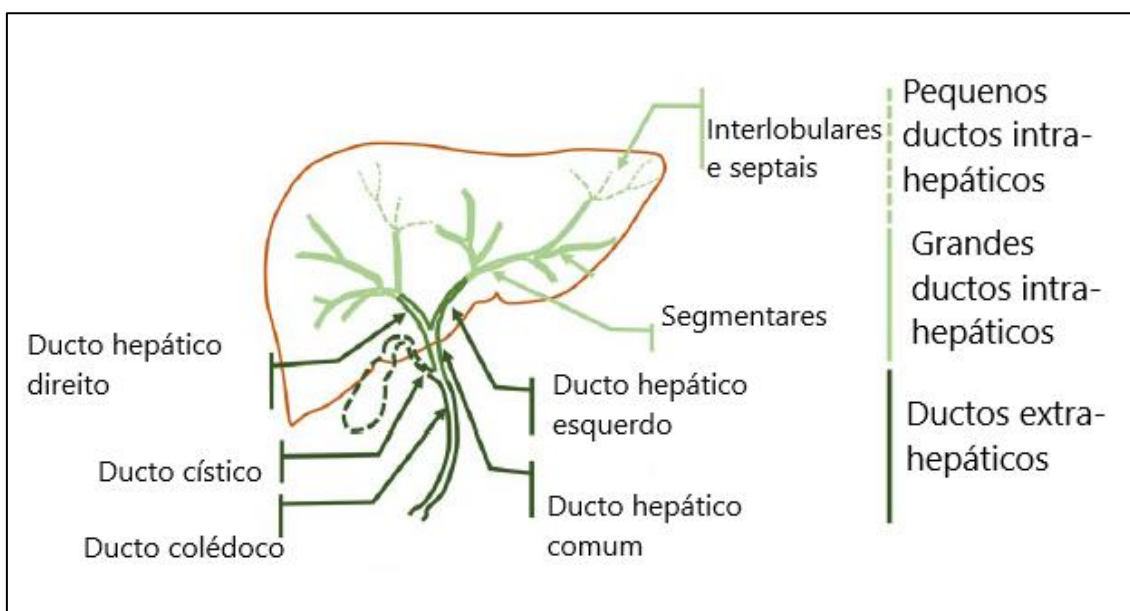


Figura 1. Anatomia das vias biliares. Fonte: Kendall, 2019³ (modificado).

Os pequenos e grandes ductos diferem na sua embriologia e histologia. Embriologicamente, os pequenos ductos se originam da modelação da placa ductal. Basicamente, os hepatoblastos se alinham em volta da veia porta para construir uma camada circular denominada placa ductal a qual gradualmente se desenvolve para formar o sistema de ductos biliares.¹ Os grandes ductos derivam do alongamento dos ductos do hilo hepático, os colangiócitos da via biliar extra-hepática são originados de células endodérmicas e possuem a mesma origem do pâncreas e duodeno. Histologicamente, os pequenos ductos são revestidos por pequenos colangiócitos

cuboides, enquanto os grandes ductos são revestidos por colangiócitos altos e cilíndricos.⁴

Localizados entre os hepatócitos, encontramos os canalículos biliares, estes possuem microvilos e microfilamentos que auxiliam no fluxo biliar.⁵ Os canalículos se anastomosam e quando alcançam a periferia do lóbulo se fundem para constituírem os colangíolos (dúctulos) que vão se unindo até formar os dúctulos, ductos interlobulares, ductos septais e segmentares e assim sucessivamente até ir formando ductos cada vez maiores gerando a via biliar.^{1,5}

A via biliar é o canal por onde acontece o transporte da bile, que participa diretamente do processo de digestão na emulsificação da gordura. A bile é uma solução aquosa que é produzida no interior dos hepatócitos e armazenada na vesícula biliar, é composta basicamente por sais biliares, fosfolipídios, colesterol, bilirrubina conjugada, eletrólitos e água. O contato entre a bile e a via biliar acontece através dos microvilos do canalículo biliar.⁵

1.2 Colangiocarcinoma

O colangiocarcinoma (CC) ou carcinoma das vias biliares é uma neoplasia maligna originada no epitélio dos ductos biliares podendo acometer qualquer área da árvore biliar.⁶ Está entre os tumores primários do fígado e corresponde a cerca de 5 a 15% das neoplasias hepáticas, sendo a segunda neoplasia mais comum após o carcinoma hepatocelular (CHC). O CC contabiliza 3% das neoplasias gastrointestinais e possui taxa global de mortalidade de 2%. O colangiocarcinoma ocorre em pacientes com idades entre 50 e 70 anos.⁷ Trata-se de um tipo raro e agressivo de tumor, as taxas de sobrevivência em 5 anos são de 10% a 40% para tumores ressecáveis e menos de 5% para tumores irresssecáveis.⁶

1.3 Epidemiologia e fatores de risco

Apesar do CC ser um câncer raro, sua incidência tem aumentado nas últimas décadas em todo o mundo, representando um problema de saúde pública. Sua incidência global gira em torno de 3-6 casos por 100 mil habitantes e possui uma taxa de mortalidade de 1-6 casos por 100 mil habitantes, não incluindo a incidência dos países do sudeste asiático que possuem incidência maior que 6 casos por 100 mil habitantes.^{7,8}

A mortalidade global por CC vem aumentando nos últimos tempos, de acordo com os bancos de dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) e da Organização Pan-Americana da Saúde que reuniu dados de 32 países selecionados na Europa, América, Ásia e Oceania nos períodos entre os anos de 2000-2014. A maior taxa de mortalidade foi relatada no sudeste asiático, países como a Tailândia, China e Coreia do Sul apresentam mais de 6 óbitos por 100 mil habitantes. Países da América do Norte, Europa e Oceania apresentam taxas de mortalidade de 2-4 óbitos por 100 mil habitantes. Já países da América do Sul revelou menos de 2 óbitos por 100 mil habitantes.^{7,9}

Algumas particularidades chamam a atenção, como por exemplo, a taxa de mortalidade foi maior nos homens do que nas mulheres em todo o mundo. Nos Estados Unidos, os aumentos na mortalidade foram encontrados em indivíduos afro-americanos (45%), seguidos por asiáticos (22%) e brancos (20%) e as piores taxas de sobrevivência geral para afro-americanos, seguidas por índios americanos e grupos nativos do Alasca.⁷⁻⁹

A incidência do CC está relacionada a uma série de fatores etiológicos e variações geográficas, embora alguns fatores etiológicos sejam observados globalmente, outros são endêmicos, como é o caso dos países do sudeste asiático, muito provavelmente isso ocorra nesses países devidos a alguns fatores como a infestação parasitária das vias biliares por *Clonorchis sinensis* ou *Opisthorchis viverrini* que são nematelmintos encontrados em alimentos crus, eles provocam à inflamação crônica do epitélio biliar, fator ligado a carcinogênese do CC.^{10,11} Também foi relado a relação do CC ao uso do dióxido de tório (usado como contraste radiológico) e altos níveis de exposição dos químicos diclorometano e 1,2-dicloropropano, como aconteceu no Japão.^{6,10,11}

Do ponto de vista global, vários outros fatores de risco são relatados, algumas doenças de base parecem estar ligadas ao surgimento do CC, como é o caso da colangite esclerosante primária, doença de Caroli, hepatolitíase, esteatose hepática, infecção causada pelos vírus da hepatite B (HBV) e C (HCV) e a cirrose.⁶⁻¹²

Doenças relacionadas a mal formações dos ductos biliares ou formações císticas como doença de Caroli, possui um risco aumentado de 10-30% para desenvolver CC. A hepatolitíase causa uma inflamação crônica nas vias biliares e estase, fator já conhecido como predisposição ao CC, seu risco para CC está por volta de 2-13%. A colangite

esclerosante primária apresenta um risco de 7-14% para o desenvolvimento do CC, um sistema de vigilância da colangite é importante para detecção do CC em estágios precoces. A relação entre a infecção pelos vírus HBV e HCV no CC não é bem conhecida, mas acredita-se que a inflamação crônica e a proliferação celular causada pelo vírus estejam ligadas a carcinogênese, estudos recentes apresentaram uma estimativa de risco para HBV e HCV com um OR de 3,17 e 3,42 respectivamente. Em um estudo de meta-análise incluindo os países EUA, Japão, Dinamarca e China a cirrose biliar apresentou um OR geral de 22,92.^{7, 13-18}

Demais fatores como diabetes mellitus tipo II, alto consumo de álcool, tabagismo obesidade e a síndrome metabólica vem sendo estudados como fatores de risco que merecem atenção.^{7, 19,20}

1.4 Classificação topográfica, macroscópica e histológica do Colangiocarcinoma

Levando-se em consideração a localização anatômica, o CC pode ser dividido em intra-hepático, peri-hilar e extra-hepático. O CC intra-hepático é aquele que se localiza acima dos ductos biliares de segunda ordem, podendo acometer os ductos interlobulares, septais e segmentares. O CC peri-hilar acomete os ductos direito e esquerdo e/ou a sua junção, ducto cístico e hepático comum, também é chamado de tumor de Klatskin. O CC extra-hepático inclui uma porção do ducto hepático comum, ducto colédoco e a borda superior do duodeno e a ampola de Vater (Figura 2).^{6,21}

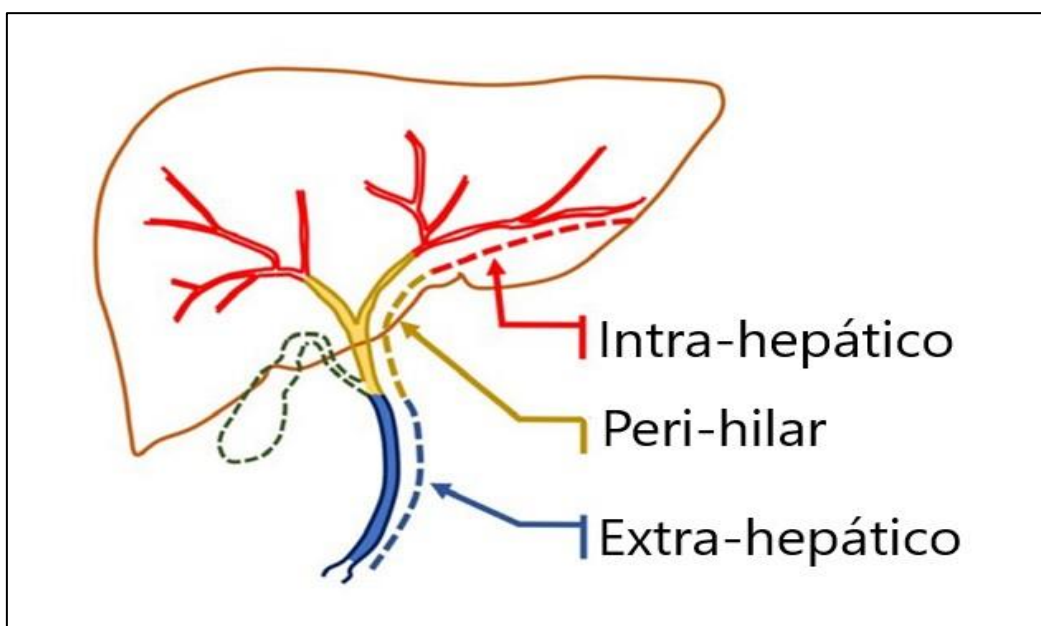


Figura 2. Classificação topográfica do colangiocarcinoma. Fonte: Kendall, 2019³ (modificado).

Macroscopicamente o CC é classificado de acordo com o padrão de crescimento da lesão, podendo ser classificado como formador de massa, infiltrativo periductal e intraductal, alguns casos podem apresentar mais de um padrão de crescimento juntos. (Figura 3).²² O formador de massa aparece no parênquima hepático em forma de lesão em massa ou nodular, geralmente tem uma coloração cinza ou cinza-esbranquiçada, é firme e sólido. O infiltrativo periductal dissemina-se ao longo da parede do ducto biliar, provocando um espessamento da parede. O crescimento intraductal apresenta tumores polipóides ou papilares localizado dentro do lúmen dos ductos biliares dilatados. Os tipos peri-hilar e extra-hepáticos geralmente são precedidos por uma neoplasia intraepitelial biliar (BILIN)^{6, 22,23}

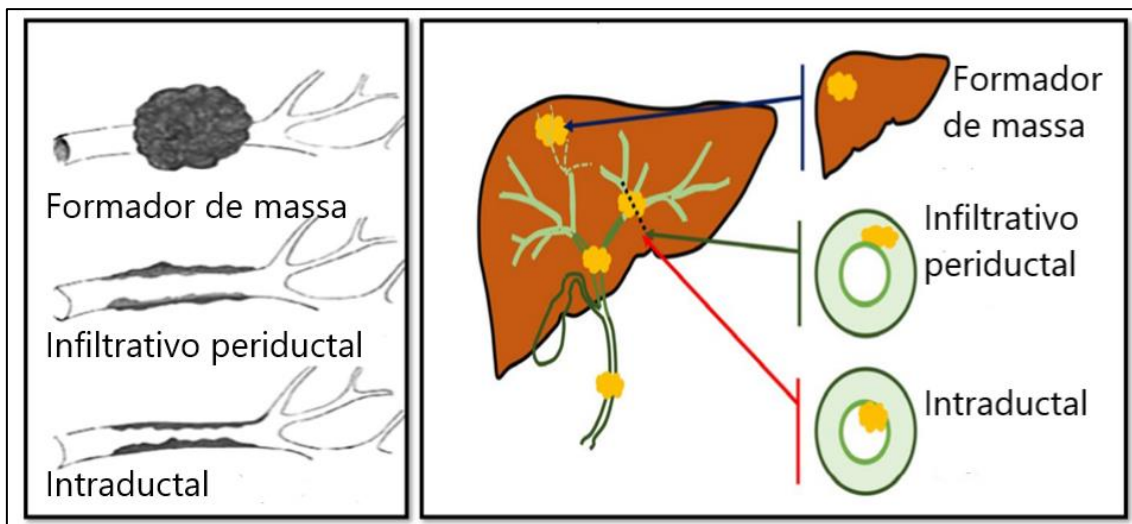


Figura 3. Padrão de crescimento macroscópico das lesões. Fonte: Kendall 2019³ (modificado).

Em relação ao tipo histológico, antigamente o colangiocarcinoma era dividido apenas como adenocarcinoma (bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciado) e variantes raras. Hoje, embora ainda existam muitas dúvidas em relação à classificação histológica do CC ele pode ser classificado nos seguintes subtipos: grandes ductos, colangiolo carcinoma (pequenos ductos), células intermediárias e papilífero, a classificação histológica é baseada de acordo com o ducto afetado pela neoplasia.^{6,7}

O subtipo grandes ductos é um adenocarcinoma invasivo com estruturas tubulares de tamanhos variados e formação de ácinos. Geralmente, trata-se de um adenocarcinoma moderadamente diferenciado composto por células colunares para

cubóides, com citoplasma claro ou ligeiramente granular. Os tubulos ou ácinos são geralmente maiores do que os ductos biliares não neoplásicos. Glandulas peribiliares, reações desmoplásicas e inflamatórias são normalmente observadas. A produção de mucina é encontrada no lúmen e no citoplasma das células. Esse subtipo frequentemente apresenta infiltração venosa e neural.^{6,7,24}

O subtipo colangiocarcinoma possuem estruturas em formas de cordões e seu lúmen possui forma de fenda. Suas células são consideradas pequenas em relação ao subtipo grandes ductos. É comum encontrar deposição de fibras colágenas em torno e ao longo de suas células e geralmente a produção de mucina é ausente, apresenta estroma denso e hialino. Esse subtipo apresenta uma variante descrita como mal formação de placa ductal, a morfologia das células se assemelham a letras chinesas, nessa variante a lesão mimetiza os complexos de von Meyenburg e/ou a doença de Caroli e a fibrose congênita.^{6,7,25}

O subtipo células intermediárias trata-se de uma neoplasia menos diferenciada, com aspecto precursor entre hepatócito e colangiócito. Essas células tumorais são pequenas e de formato oval, com núcleo hipercromático e com citoplasma escasso. Elas estão distribuídas em trabéculas, ninhos sólidos ou em cordões com desmoplasia. Não são observadas estruturas glandulares bem definidas. Atipias celulares não são marcantes e a produção de mucina não é presente.^{6,26,27}

O subtipo papilífero é um carcinoma com formações papilares maiores que 3 milímetros e no centro dessas papilas apresenta um tecido conjuntivo. A neoplasia se apresenta como projeções de crescimento para dentro do lúmen. Pode apresentar três fenótipos de epitélio: biliar, intestinal e gástrico.^{6,7,28}

Encontramos ainda, o carcinoma combinado é observado quando a histologia apresenta elementos característicos tanto de colangiocarcinoma como de carcinoma hepatocelular, além disso, pode apresentar componente com características de células progenitoras. Tumores mistos representam cerca de 2% das neoplasias hepáticas. A confirmação da diferenciação entre os dois componentes é facilmente fornecido por coloração imuno-histoquímica.^{6,27}

1.5 Diagnóstico e tratamento do colangiocarcinoma

O diagnóstico precoce muitas vezes é difícil de ocorrer devido o CC não apresentar sintomas nos estágios iniciais, o que compromete muito as opções terapêuticas, resultando em um prognóstico ruim. Quando o CC é diagnosticado precocemente está mais relacionado a achados acidentais, através de exames de imagens por outros motivos, na grande maioria dos casos são diagnosticados quando a doença já está em estágios mais avançados.^{29,30}

O sintoma mais observado é a icterícia que é mais presentes nos CC peri-hilares e extra-hepáticos e menos frequente no CC intra-hepático, demais sintomas incluem mal-estar, dor abdominal, sudorese, perda de peso, enjojo, fraqueza e anorexia.³¹

O CC é difícil de diagnosticar com precisão devido à sua localização, muitas vezes inacessível à histologia ou citologia. O diagnóstico do CC envolve exames laboratoriais, de imagem, citológicos e histopatológicos. Os exames de imagem como o ultrassom, ressonância magnética, tomografia computadorizada e a colangiopancreatografia são opções na avaliação pré-operatória, porém cada uma apresenta um nível de sensibilidade. O melhor método radiológico foi a combinação da ressonância magnética e a colangiopancreatografia, com sensibilidade de 89% e especificidade de 75%. Algumas vezes, o diagnóstico só acontece através da análise anatomopatológica do espécime cirúrgico.²⁹⁻³²

O biomarcador sérico mais usado para o CC é o CA19-9, admitindo o valor de corte de 129UL/mL apresenta sensibilidade de 79% e especificidade de 99%, porém na presença de bactérias esses valores são comprometidos. A colangiopancreatografia retrógrada endoscopia com citologia é indicada em pacientes com colangite esclerosante primária e altos níveis de CA 19-9, porém a citologia convencional por escova tem baixa sensibilidade.²⁹⁻³²

Cada vez mais tem surgidos estudos utilizando técnicas moleculares para ajudar no diagnóstico do CC, como por exemplo, o uso da hibridização in situ por fluorescência (FISH), para detecção de perdas ou ganhos de cromossomos associados a doenças de base como a colangite esclerosante primária. Novos biomarcadores vêm sendo estudados e desenvolvidos, e tem si mostrados bastante promissores como é o caso dos marcadores peptídicos, microRNA no soro, bile e urina.⁷

Atualmente a ressecção cirúrgica ainda é a opção curativa para o CC, porém muitos casos não são possíveis de serem ressecados devido ao estágio avançado da doença e a presença de metástases, nesses casos é necessário lançar mão do tratamento paliativo. Estudos publicados em 2019 sugerem o uso de capecitabina por um período de 6 meses após a cirurgia outros estudos em andamento estão avaliando o uso de cisplatina e gemcitabina.³³

O transplante de fígado tem sido uma opção profilática para paciente com colangite esclerosante primária avançada, com sobrevida de 80% em 5 anos. Quando o paciente possui um diagnóstico de CC o transplante é desencorajado devido ao mau prognóstico, porém o aprofundamento na histologia do tumor tem demonstrado que a depender do subtipo histológico o transplante pode ser uma opção. Outro estudo demonstra que pacientes com colangite esclerosante primária e CC peri-hilar que não puderam ser ressecados se beneficiaram do transplante após terapia neoadjuvante com sobrevida livre de doença de 5 anos em 65% dos casos. A displasia biliar sem a presença do CC possui indicação para transplante de acordo com as diretrizes da Associação Europeia para estudo de fígado (EASL), porém a disponibilidade de órgãos é levada em consideração para essa indicação. Já as diretrizes da Associação Americana para estudos de doenças hepáticas (AASLD) não possui indicação de transplante em casos de displasia biliar.^{7,34-36}

1.6 Aspectos moleculares do colangiocarcinoma

O CC é considerado um tumor heterogêneo do ponto de vista molecular. A técnica de imuno-histoquímica é uma ferramenta muito utilizada para detecção da origem do tumor, cada vez mais surgem novos marcadores que auxiliam no diagnóstico do CC. Existem alguns marcadores que são sabidamente utilizados para caracterizar o CC, outros ainda estão sendo melhor investigados.

As citoqueratinas são proteínas que estão presentes no citoesqueleto de células epiteliais e são expressas na maioria dos colangiocarcinomas. As citoqueratinas CK7 e CK19 são marcadores biliares utilizadas para distinguir o CC do CHC, entretanto algumas regiões com diferenciação para hepatocelular podem marcar, sugerindo que esse tumor seja derivado da transformação de células progenitoras.³⁷

As mucinas são glicoproteínas de alto peso molecular encontradas na superfície de células epiteliais com função de proteção e lubrificação. A expressão de MUC1 está

relacionada a ocorrência de metástases, através da inibição da adesão celular. A secreção de MUC2 é mais comum no epitélio intestinal e possui função de proteção contra bactérias e supressão tumoral. MUC5AC é observada em lesões pré-neoplásicas. MUC 6 relacionada a um melhor prognóstico. Alguns autores sugerem que o tipo de expressão das mucinas se relaciona ao prognóstico. Estudos indicam que a transformação maligna de células epiteliais está associada à expressão alteradas das mucinas.³⁸⁻³⁹

Os anticorpos Arginase e Hep-Par são marcadores para diferenciação hepatocelular. A Arginase está presente no citoplasma de hepatócitos normais e neoplásicos, já o marcador Hep-Par reage com um antígeno da membrana mitocondrial dos hepatócitos. Alguns autores relatam a detecção da Arginase e Hep-Par em colangiocarcinoma intra-hepáticos. Além da Arginase e Hep-Par outros marcadores são utilizados para distinguir o CC do CHC como a Alfa-fetoproteína (AFP), pCEA (canalicular) e CD10 (canalicular).^{40,41}

O CD133 é um marcador de células progenitoras, porém estudos revelam que o CD133 também é expresso em tumores sólidos. No fígado o CD133 pode auxiliar no diagnóstico de hepatocolangio, tende a ser mais expresso no componente colangiolar. Muitos estudos relacionam o CD133 a um pior prognóstico.⁴²

O CD56 é uma molécula de adesão celular neural e marcador de células epiteliais biliares reativas, é um importante aliado para distinguir neoplasias de reações ductulares.⁴³

A Vimentina é um marcador para células de origem mesenquimal, estudos indicam que sua expressão pode estar ligada um pior prognóstico, pois a expressão da Vimentina implica na transdução mecânica de sinais da superfície celular para o núcleo, isso influencia processos como a adesão celular.⁴⁴

A via de sinalização WNT/B-catenina controla vários mecanismos e entre eles a proliferação celular. Mutações da B-catenina parece estar ligadas ao desenvolvimento e progressão de tumores hepáticos. Já a E-caderina é uma molécula de adesão celular, no câncer a perda da expressão da E-caderina está relacionada ao descolamento da adesão célula-célula, tornando a célula com características invasivas e perda da diferenciação.

O estudo molecular do CC a nível DNA através de técnicas de sequenciamento revela mutações em oncogenes e genes supressores de tumores, como é o caso do oncogene KRAS que apresenta mutações em 15%-30% dos casos, já no gene supressor de tumor TP53 a frequência é de 10%-40%, essas mutações estão mais presentes no subtipo grandes ductos. No subtipo pequenos ductos as alterações mais comuns são mutações no IDH1/2 (10%-30%) e fusões FGFR2 (10%-25%), além dessas mutações de alta frequência, outros genes, como BRAF, BAP1, PIK3CA, GNAS, ARID1A, SMAD4, PTEN, MDM2, EGFR, ERBB2/HER2 e muito mais, são mutados, no entanto, geralmente em uma frequência muito menor na maioria dos estudos.^{7,48-50}

1.7 Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR)

O EGFR é um receptor de fator crescimento epidérmico, localizado na membrana citoplasmática de células epiteliais, também é conhecido como ErbB1 e HER1 e faz parte da família Her. Este receptor possui massa molecular entre 170 e 185 quilodaltons e está situado no braço curto do cromossomo 7, na região 7p11.2 e possui 28 exons. Faz ligações com EGF, TGF- α (fator transformador), HB-EGF (fator de crescimento ligante de heparina), AR (Anfiregulina) e BTC (Betacelulina). Seus parceiros na dimerização são o EGF, o ERB2 e o HER4.^{51,52}

A estrutura do EGFR é dividida em três partes básicas, apresentando um domínio extracelular, uma região transmembrana e um domínio intracelular. O domínio tirosino-quinase é codificado nos exons 18 e 24, o domínio extracelular nos exons 2 e 16, e o domínio transmembrana no exon 17. O domínio extracelular amino-terminal possui duas regiões ricas em cisteína que formam o domínio de ligação com o ligante. A região transmembrana é uma alfa hélice simples que ancora o receptor a célula. O domínio citoplasmático contém uma região tirosina quinase (enzimas que catalisam a fosforilação de resíduos de tirosina em proteínas, com ATP, ou outros nucleotídeos, como doadores de fosfato) além de uma cauda carboxi-terminal que contém pelo menos seis sítios de autofosforilação.^{51,53,54}

Quando ativado pelos seus ligantes específicos, o EGFR participa da transdução de sinal para proliferação celular, crescimento, diferenciação, sobrevivência e apoptose celular. No momento em que há um desequilíbrio na transmissão de sinal da superfície celular para o núcleo, o controle homeostático da célula fica comprometido, levando as células a crescerem desordenadamente e de forma irregular. Entre os mecanismos do

aumento da expressão do EGFR estão à ativação da transcrição e à amplificação do gene.^{55,56}

O EGFR existe como um monômero inativo que se ativa por intermédio de um ligante externo, o que leva o receptor a dimerizar-se com outro monômero de EGFR (homodimerização) ou com um membro da família CerbB (heterodimerização), essa dimerização do receptor leva a ativação do domínio tirosinaquinase por transfosforilação, estimulando a atividade proteinoquinásica. Em seguida, a cascata de transdução de sinal é ativada, resultando na propagação da sinalização celular. Ela, por sua vez, conduz uma série de sinalizações intracelulares, que levam a mudanças na fisiologia e/ou nos modelos de expressão gênica.^{56,57}

Por vezes o EGFR pode sofrer mutações, tornando-se incapaz de se ligar a um ligante externo. Isso, no entanto, não impede sua atividade tirosinaquinase, já que ele é capaz de induzir a atividade proliferativa de forma independente de um ligante externo.^{56,57}

As mutações mais conhecidas do EGFR estão localizadas nos exons 18, 19, 20 e 21. Entre elas destaca-se a deleção encontrada no exon 19 (D761Y) com uma frequência de 45% de todas as alterações encontradas e a mutação no exon 21 (L858R) com frequência de 40-45%. Outra mutação que apresenta frequência alta (50-60%) é a T790M encontrada no exon 20, porém ela está relacionada a resistência ao medicamento.^{58,59}

É importante saber se a via do EGFR apresenta mutação, hiperexpressão, amplificação e/ou alterações na estrutura do EGFR isso gera respostas para decisões terapêuticas e prognósticas.

1.8 EGFR como alvo no tratamento contra o câncer

Vários estudos indicam que o EGFR é um alvo promissor no tratamento contra diversos tipos de cânceres, estando super expresso em tumores como pulmão, cabeça e pescoço e bexiga, estratégias desenvolvidas na prevenção da ativação do EGFR, como a inibição da ligação ao receptor, ou o bloqueio da atividade tirosinaquinase, parecem ter um potencial benéfico no tratamento.⁶⁰

Há duas formas de terapia anti-EGFR, através de inibidores do domínio tirosinoquinase (Gefinitib e Erlotinib) e anticorpos monoclonais que competem com os ligantes ativadores no domínio extracelular do receptor (Panitumumab e Cetuximab).⁶¹

Nos cânceres de pulmão os anti-EGFR de primeira geração melhoraram as taxas de sobrevida livre de doença, porém muitos pacientes desenvolvem resistência ao medicamento dentro de um período de 9 a 12 meses, esses pacientes apresentam a mutação T790M após a terapia anti-EGFR. Dentro desse cenário, surgiram novos medicamentos conhecidos como segunda geração, com o intuito de controlar o problema da resistência, são eles Afatinib, Dacomitinib, Neratinib e Canertinib, e o mais recente já considerado de terceira geração o Osimertinib.^{60,61}

1.9 Colangiocarcinoma e EGFR

Neoplasias malignas como o colangiocarcinoma podem apresentar hiperexpressão, amplificação e alterações estruturais do EGFR. O EGFR no colangiocarcinoma parece estar associado a fatores como: invasão, estágio da doença, prognóstico, sobrevida, crescimento/progressão do tumor, metástase, grau de diferenciação, inibição da apoptose e resposta à quimioterapia. Vários estudos tentam comprovar e testar essas variáveis.^{62, 63}

O Hospital Saint-Antoine na França realizou um estudo onde o EGFR foi correlacionado com a progressão tumoral, através da indução da transição epitélio-mesenquimal. A transição epitelial-mesenquimal é um processo celular envolvido na progressão tumoral, que consiste na ruptura das junções aderentes, favorecendo a invasão celular. Constatou-se que o desencadeamento da transição epitélio-mesenquimal se dá por meio do eixo EGFR. A pesquisa foi realizada em ratos xenotransplantados.^{64,65}

A Universidade de Amsterdam, através de uma revisão sistemática e meta-análise, observou que o colangiocarcinoma intra-hepático e o extra-hepático comportam-se de maneiras diferentes, considerando padrões como: crescimento, sintoma, incidência de metástase, resposta a tratameno e sobrevida. Foram analisadas as diferenças do perfil imunohistoquímico de 54 estudos, incluindo 4.458 pacientes e 57 marcadores imunohistoquímicos. Alguns marcadores como o EGFR, expressaram diferenças proteicas significativas, tais diferenças podem ter um impacto considerável sobre as estratégias terapêuticas, consequentemente, os pacientes com

colangiocarcinoma intra-hepático e extra-hepático podem beneficiar-se de diferentes estratégias de tratamento.⁶⁶

A Faculdade de Medicina de Taiwan desenvolveu uma pesquisa envolvendo mutações nos oncogenes EGFR, KRAS e BRAF, associando tais mutações com seus resultados clínicos. Foram incluídos 137 pacientes no estudo, desse total 13 pacientes apresentaram mutações no EGFR (exons 18 e 21), enquanto 23 tinham mutações no KRAS e apenas 1 paciente apresentou mutação no BRAF. A pesquisa associou que essas mutações desempenham um papel chave em diversos processos que estimulam a proliferação celular, a diferenciação e sobrevivência. Para os pesquisadores, esses resultados são importantes, pois implicam na escolha do tratamento.⁶⁷

Outro estudo importante de Taiwan envolve o uso do fármaco Cetuximab, utilizado em pacientes diagnosticados com colangiocarcinoma. Foram analisados retrospectivamente os resultados de 5 pacientes com câncer do trato biliar que recebem a terapia contendo cetuximab. Quatro deles tiveram a doença em estágio IV, e um paciente teve ressecção incompleta no momento do diagnóstico. Após o tratamento com Cetuximab, a resposta completa foi conseguida em 1 paciente, a resposta parcial em 3 pacientes, e a doença estável em 1 paciente. Três espécimes cirúrgicos estavam disponíveis, e todas revelaram expressão positiva do EGFR. A pesquisa concluiu que o Cetuximab é um fármaco importante no tratamento de pacientes com colangiocarcinoma que expressa o EGFR.⁶⁸

Conhecer esses mecanismos permitirá que pacientes sejam beneficiados de forma que suas chances de cura sejam aumentadas. Ainda assim, são necessários muitos estudos nessa área.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

Esse estudo tem como objetivo avaliar o nível de expressão imuno-histoquímica e de amplificação do EGFR no colangiocarcinoma e correlacionar estes achados com os diferentes tipos histológicos desta neoplasia.

2.2 Objetivos específicos

-Correlacionar os dados clínicos, etiológicos e anatomopatológicos com a expressão e a amplificação do EGFR.

-Comparar a expressão e a amplificação do EGFR com diversos marcadores imuno-histoquímicos usados para caracterizar o colangiocarcinoma.

2.3 Justificativa

Apesar de ser uma neoplasia hepática com frequência crescente em diversos países, o colangiocarcinoma tem um prognóstico ainda bastante reservado, especialmente por ser diagnosticado em fases avançadas.

Para a obtenção de uma melhora neste quadro, é de extrema relevância compreender o desenvolvimento do colangiocarcinoma, especialmente frente ao fato de tratar-se de uma neoplasia heterogênea, com diferentes tipos histológicos. A necessidade de entender a carcinogênese biliar e a carência de pesquisas nessa área nos motivaram a realizar este estudo, a fim de contribuir com dados que possam acrescentar na caracterização das vias moleculares do colangiocarcinoma.

Por fim, o EGFR e as alterações em suas vias de sinalização são um alvo terapêutico que tem sido usado em diversos tumores. Caracterizar o padrão de expressão e amplificação do EGFR nos diversos tipos histológicos desta neoplasia pode ser de grande utilidade na prática clínica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Considerações éticas

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob o número de registro NP 575/15 e a aprovação da Plataforma Brasil foi obtida sob o número CAAE 51477615.6.0000.0065.

3.2 Seleção dos casos

Para o presente estudo, foram avaliados retrospectivamente 74 espécimes cirúrgicos de ressecção de pacientes diagnosticados com colangiocarcinoma no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) e do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), sendo 55 casos do HCFMUSP no período de 1992 a 2009 e 19 pacientes do ICESP no período de 2011 a 2017.

A casuística do HCFMUSP foi submetida anteriormente à pesquisa morfológica e imunohistoquímica associada ao gene HER2 pela médica patologista Lidiane Vieira Marins no ano de 2019, sob orientação do Prof. Dr. Venâncio A. F. Alves. A tese foi defendida no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.3 Critérios de inclusão

- Pacientes submetidos a procedimento cirúrgico realizado no HCFMUSP e no ICESP com laudo anatomopatológico emitido pela Anatomia Patológica como colangiocarcinoma ou adenocarcinoma de vias biliares no período avaliado.
- Neoplasia das vias biliares intra-hepáticas, da região hilar ou extra-hepática.
- Disponibilidade de blocos de parafina representativos da neoplasia nos arquivos da Anatomia Patológica do HC (Hospital das Clínicas) e do ICESP.

3.4 Critérios de Exclusão

- Espécimes provenientes de biópsias incisionais da neoplasia.
- Componente histológico de carcinoma hepatocelular.

3.5 Desenho do Estudo

Este é um estudo transversal retrospectivo que avaliou as características macroscópicas e microscópicas do colangiocarcinoma.

O estudo do EGFR foi através de avaliações imuno-histoquímicas (IQH) e de hibridização in situ fluorescente (FISH).

Além disso, o perfil imuno-histoquímico do colangiocarcinoma foi caracterizado utilizando amostras de tecido parafinado dispostas em arranjos de matriz tecidual (TMA).

3.6 Cronologia

- Levantamento bibliográfico através do Pubmed com as palavras chaves: colangiocarcinoma, neoplasias de vias biliares, EGFR e tipos histológicos.
- Consulta em banco de dados HCmed (casos operados no HC) e Tasy (casos operados no ICESP), para levantamento de prontuários e laudos anatomopatológicos.
- Seleção dos casos com diagnóstico de colangiocarcinoma e/ou carcinoma de vias biliares obedecendo aos critérios de inclusão e exclusão.
- Revisão dos laudos anatomopatológicos.
- Levantamento das lâminas histológicas (H&E).
- Revisão histológica e escolha das áreas tumorais mais representativas para construção do TMA e para realização do FISH.
- Separação dos blocos parafinados para confecção do TMA.
- Confecção de dois TMAs, um com a casuística do HC (T0239) e o outro com a casuística do ICESP (T0430).
- Realização das reações de imuno-histoquímicas nas lâminas provenientes do TMA.
- Avaliação das lâminas de imuno-histoquímicas.

- Confeção de novas lâminas em branco do bloco selecionado para realização do FISH.
- Realização das reações pela técnica do FISH.
- Avaliação das lâminas de FISH.
- Tabulação e análise dos resultados.
- Redação da dissertação.

3.7 Variáveis clínico-patológicas

3.7.1 Dados clínicos

Os dados clínicos como idade, sexo e doença de base associada foram obtidos através da revisão dos laudos e dos prontuários com os seguintes critérios de avaliação:

- Idade em anos na data da cirurgia.
- Sexo dividido em masculino e feminino.
- Doenças de base (colangite crônica, mal formação de placa ductal, esteatose hepática, cirrose, hepatite viral, litíase intra-hepática e doença de Caroli) quando mencionadas nos prontuários ou com evidências anatomopatológicas.

3.7.2 Dados anatomopatológicos

- Tamanho da lesão: determinada em centímetros no maior eixo.
- Topografia: o comprometimento tumoral ao longo da árvore biliar foi classificado em intra-hepático, peri-hilar e extra-hepático. a) intra-hepático: neoplasia com localização em qualquer região da árvore biliar intra-hepática, podendo acometer os ductos septais e/ou interlobulares. b) peri-hilar: neoplasia localizada na região hilar do fígado acometendo os ductos segmentares, ductos direito e esquerdo ou a área de confluência dos ductos. c) extra-hepático: neoplasia localizada abaixo da confluência dos ductos biliares direito e esquerdo, podendo acometer o ducto hepático comum e/ou o ducto colédoco.

- Padrão macroscópico: os casos foram classificados em formador de massa, infiltrativo periductal e intraductal. a) infiltrativo periductal: neoplasia de crescimento longitudinal estendendo-se ao longo da parede do ducto biliar provocando uma obliteração da luz e infiltração da sua parede (Figura 4). b) padrão formador de massa: neoplasia com forma nodular/massa, de consistência firme e sólida e de coloração esbranquiçada (Figura 5). c) intraductal: neoplasia com aspecto vegetante ou polipóide com crescimento no interior do ducto biliar provocando uma dilatação da sua luz (Figura 6).

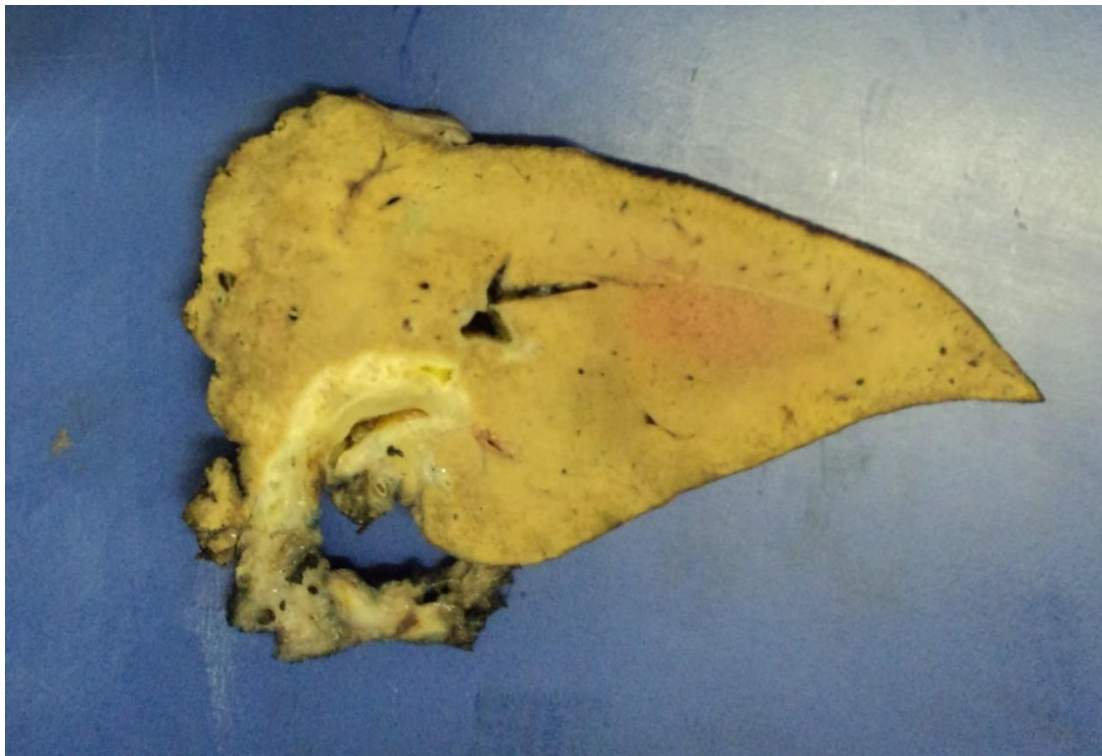


Figura 4. Padrão de crescimento infiltrativo periductal.

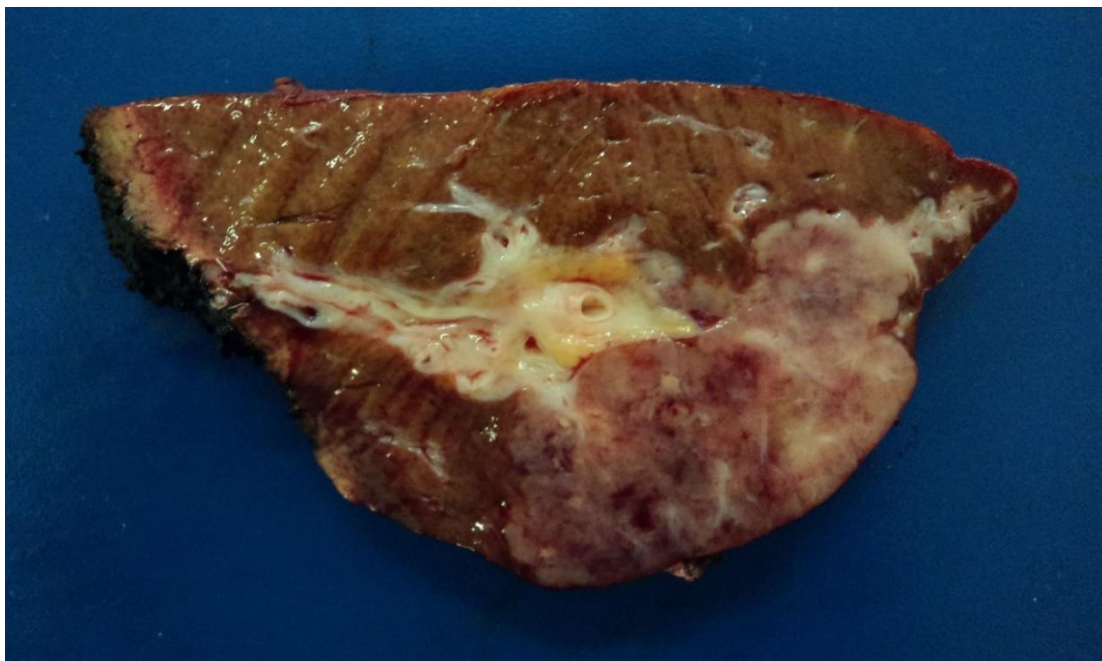


Figura 5. Padrão de crescimento formador de massa.



Figura 6. Padrão de crescimento intraductal.

- Subtipo histológico: levando em consideração o padrão histológico predominante os casos foram classificados em subtipos de grandes ductos, colangiocarcinoma, células intermediárias e papilífero. Quando mais do que um tipo foi identificado, foi considerado o predominante. a) subtipo grandes ductos: células tumorais com o aspecto histológico parecido com a do ducto biliar maduro, citoplasma claro e abundante, com os núcleos polarizados em direção a base, frequente infiltração perineural e produção de mucina (Figura 7). b) Colangiocarcinoma: células tumorais semelhantes aos colangiócitos, com citoplasma escasso e cromatina fina, distribuídas em forma de cordão com aspecto interanastomosante, por vezes estruturas tumorais com morfologia semelhante ao complexo de von Meyenburg, que lembram o formato de letras chinesas (Figura 8). c) Células intermediárias: células tumorais menos diferenciadas com aspecto citológico precursor entre hepatócito e colangiócito (Figura 9). d) Papilífero: estruturas papilares que formam projeções crescendo para dentro do ducto biliar, podendo mimetizar o próprio epitélio biliar, intestinal ou gástrico (Figura 10).

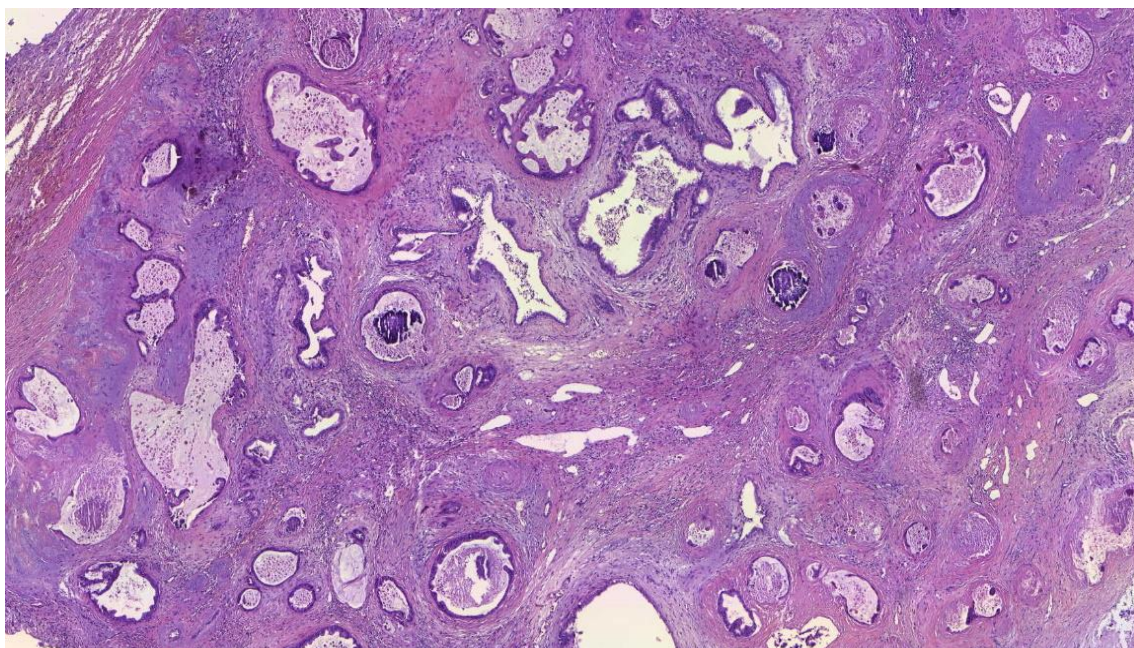


Figura 7. Análise microscópica: subtipo grandes ductos (HE aumento 100x).

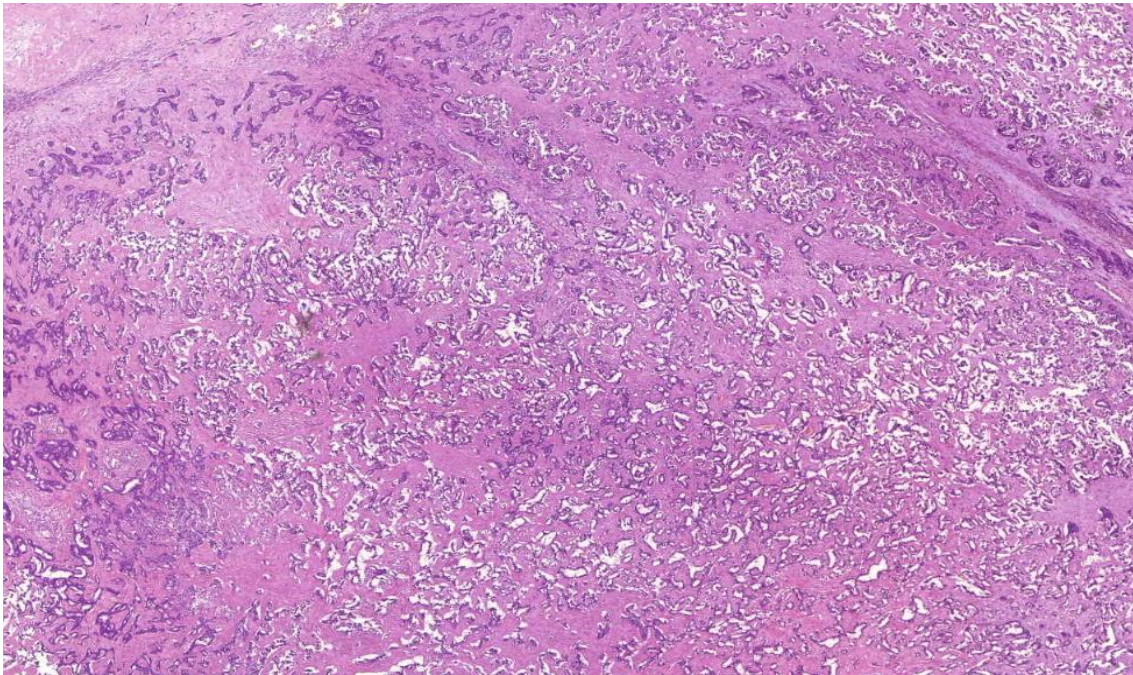


Figura 8. Análise microscópica: subtipo Colangiolocarcinoma (HE aumento 100x).

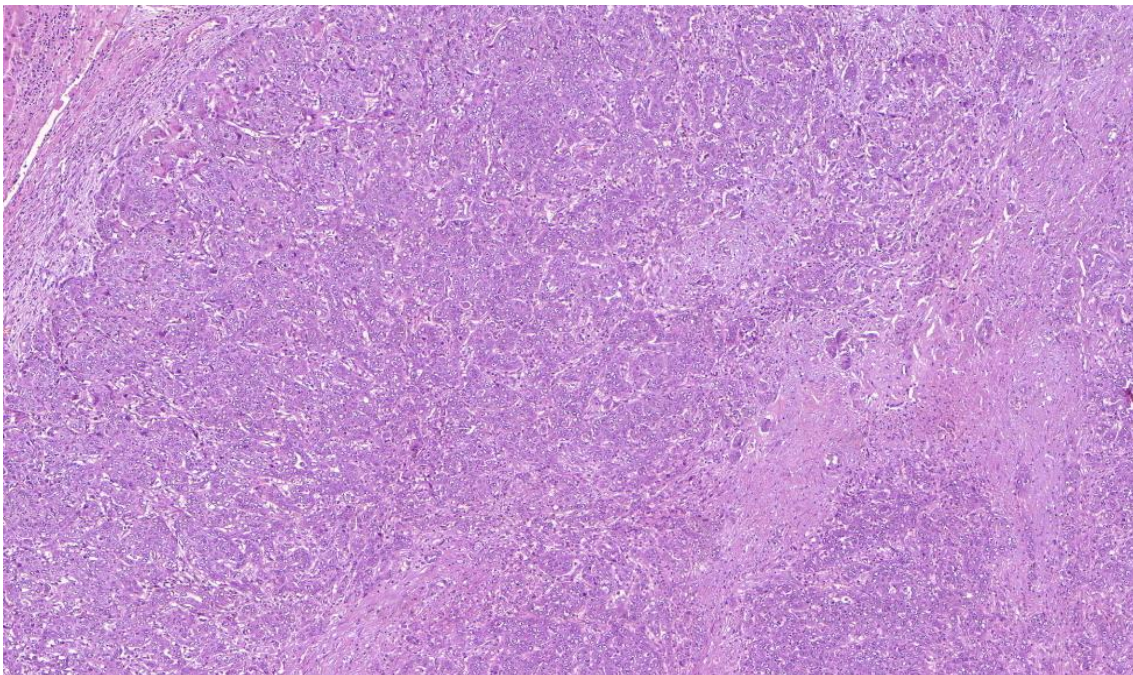


Figura 9. Análise microscópica: subtipo células intermediárias (HE aumento 100x).

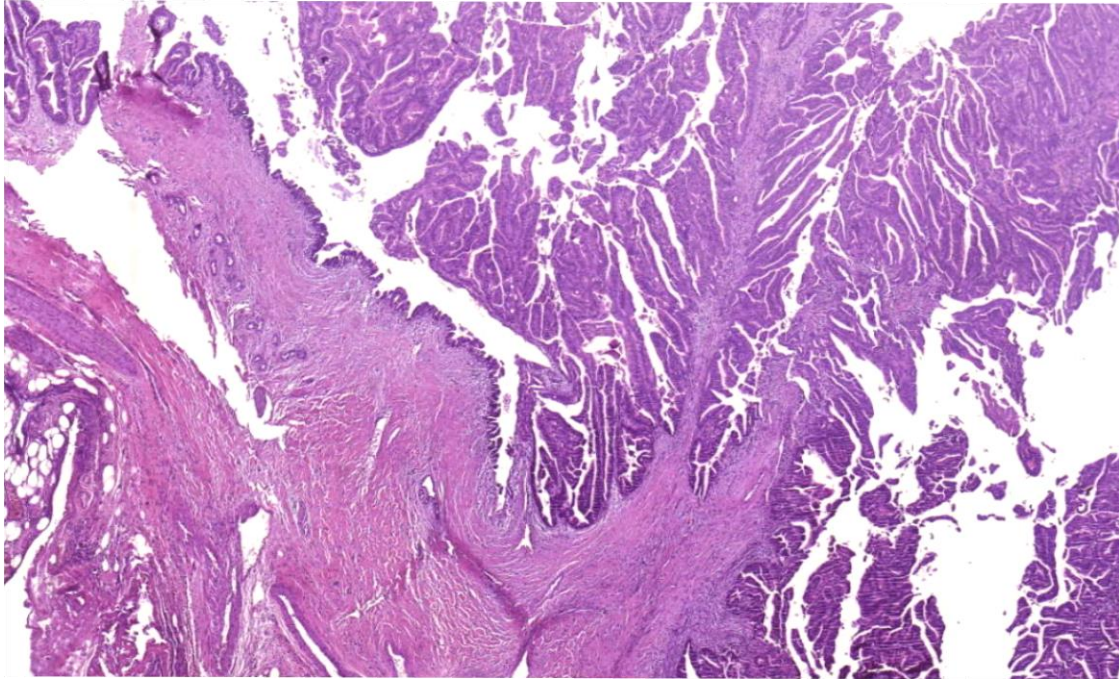


Figura 10. Análise microscópica: subtipo papilífero (HE aumento 100x).

3.8 Técnica histológica convencional (coloração H&E)

As lâminas de H&E originais quando disponíveis foram utilizadas para revisão, ou então foram realizados novos cortes utilizando os blocos parafinados em arquivo e seguindo o protocolo abaixo:

- Cortes histológicos com espessura de 03 μm dispostos em lâminas de vidro e colocados em estufa 80°C por 20 minutos.
- Desparafinização em quatro banhos de xilol por 30 segundos cada.
- Desidratação em quatro banhos de álcool absoluto por 30 segundos cada.
- Lavagem em água corrente por 2 minutos.
- Coloração do núcleo em corante Hematoxilina de *Harris* por 5 minutos.
- Lavagem em água corrente por 2 minutos.
- Coloração do citoplasma em corante Eosina amarelada por 30 segundos.

-Lavagem em quatro banhos de álcool absoluto por 30 segundos cada.

-Finalização em três banhos de xilol por 30 segundos cada.

-Montagem com verniz (meio de montagem).

3.9 Arranjos em matriz tecidual (TMA)

O arranjo em matriz tecidual (do inglês, *tissue microarray*- TMA) é uma técnica útil muito utilizada para o estudo imunohistoquímico em larga escala, consiste em um método que redistribui numerosos fragmentos cilíndricos teciduais dos blocos de parafina provenientes do exame anatomopatológico (blocos doadores) em um novo bloco (receptor).⁶⁹

Após a revisão histológica das lâminas de H&E de cada espécime, foram selecionadas de duas a seis áreas com maior representatividade tumoral. Primeiramente a marcação foi realizada na lâmina e posteriormente pareada com o bloco de parafina correspondente. Foram extraídos do bloco doador fragmentos cilíndricos de 1,0 mm de diâmetro das áreas tumorais selecionadas e transferidos para o bloco receptor com espaçamento de 0,3 mm entre as amostras. Cada cilindro tecidual foi alocado numa posição no bloco receptor definida por uma ordem pré-determinada através de uma planilha-mapa elaborada no Excel, sendo as primeiras posições compostas por tecido renal (controle). A confecção dos dois blocos de TMA (T0239 e T0430) foi realizada através de um equipamento MTA1 (Manual Tissue Microarrayer, Beecher Instruments, EUA), localizado no laboratório de investigação médica LIM-14.

Cada bloco de TMA foi submetido a uma sessão de microtomia obtendo cortes com espessura de 03 µm dispostos em 60 lâminas silanizadas que foram submetidas a banho de parafina e arquivadas em estojo escuro. Três lâminas de níveis diferentes foram submetidas à coloração H&E para validação da representatividade tumoral e posteriormente as demais lâminas foram utilizadas para as reações de IHQ.

3.10 Estudo Imuno-histoquímico

As reações foram realizadas para a pesquisa do perfil imuno-histoquímico do colangiocarcinoma utilizando os seguintes anticorpos: EGFR, MUC1, MUC2,

MUC5AC, MUC6, B-catenina, E-caderina, CD56, CD133, Vimentina, Arginase e Hep-Par, cujas especificações estão no quadro 1. O procedimento técnico foi realizado no LIM-14 da FMUSP seguindo o protocolo abaixo:

- Desparafinização dos cortes de 3µm de espessura, incubação com xilol a 60° C por 20 minutos seguido de outra incubação com xilol à temperatura ambiente por 20 minutos.

- Hidratação dos cortes em concentrações de Etanol a 100% com 3 banhos de 30 segundos cada, Etanol a 95%, 80% e 70% por 30 segundos, lavagem em água corrente e água destilada.

- Recuperação antigênica mediante incubação das lâminas em solução de tampão citrato pH 6.0 (PMB1-125) Spring Bioscience, ou solução tampão Tris-EDTA, pH 9.0 (PMB4-125) Spring Bioscience, ou solução tampão EDTA 10mM Invitrogen, pH 8.0, em panela a vapor, após a fervura da água da panela com a cuba de solução de recuperação foi colocado o suporte de lâminas por 35 minutos. Após esfriamento por 20 minutos à temperatura ambiente, seguidos de lavagens em água corrente e água destilada.

-Bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada (H₂O₂) a 6% diluída v/v em metanol, em três banhos de 10 minutos cada, seguidos de lavagens em água corrente e água destilada, em seguida, lavagem com solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 10 mM pH 7,4 por 5 minutos.

- Bloqueio de proteínas com Cas Block™ (Invitrogen by Life Technologies) cat. n° 00-8120 por 10 minutos a 37° C e incubação com o anticorpo primário.

- Incubação das lâminas com anticorpo primário (específico para o antígeno) diluído em solução de albumina bovina (BSA) (SIGMA, E.U.A.) a 1,0% e azida sódica NaN₃ (Inlab, São Paulo) 0,1% em PBS, em câmara úmida: 30 minutos a 37° C, em seguida, 18 horas (overnight) a 4° C, lavagens em tampão PBS com três trocas de 5 minutos cada.

-Incubação com o bloqueador pós-primário (Post Primary Block, NovoLink Max Polymer Detection System, Leica Biosystems, Newcastle Ltd), Ref. RE7 159, por 30 minutos a 37° C, lavagens com tampão PBS com três trocas de 5 minutos cada.

- Incubação com NovoLink (Polimer) Leica Biosystems, Newcastle Ltd), Ref. RE7 161, por 30 minutos a 37^o C, lavagens com tampão PBS com 3 trocas de 5 minutos cada.

- Revelação com solução de substrato cromogênico contendo diaminobenzidina (Sigma, E.U.A.) a 0,10%, peróxido de hidrogênio a 0,06%, dimetil sulfóxido (Labsynth) a 1% em PBS, em banho de 5 minutos, a 37 °C, lavagens em água corrente e água destilada.

- Contra-coloração com Hematoxilina de Harris por 1 minuto, lavagens em água corrente e água destilada. Imersão rápida em água amoniacal (sol. de hidróxido de amônia 0,5%), lavagens em água corrente e água destilada.

- Desidratação dos cortes em banhos de etanol a 50%, 80%, 95% e etanol absoluto (3 trocas de 1 minuto cada), diafanização em banhos de xilol (3 trocas de 1 minuto cada) e montagem em meio permanente (Entellan, Merck, cod. 1.07961.0100) com lamínula.

Os controles utilizados na reação imuno-histoquímica compreendem, um controle sabidamente positivo para o anticorpo em estudo e um controle negativo com incubação em PBS e eliminação do anticorpo primário, sendo efetuados todos os demais procedimentos imuno-histoquímicos. Características dos AC utilizados (Quadro 1):

Quadro 1: Especificações das reações imuno-histoquímicas para cada marcador.

Anticorpo	Clone	Espécie	Marca	Título	Recup. Antig.
MUC-1	VU-4-H5	mouse Mab	Zymed	400	pv, pH 8
MUC-2	CCP58	mouse Mab	Zymed	800	pv, pH 8
MUC-5AC	45M1	mouse Mab	Zymed	800	pv, pH 9
MUC-6	MRQ-20	mouse mAb	Cell Marque	500	pv, pH 6 3+
Arginase	EP261	Rabbit poli	Sigma Life Science	1000	pv, pH 6 3+
B- catenina	MAB 14	mouse mAb	BD	200	pv, pH 6 3+
E- caderina	NCH - 38	mouse mAb	DAKO	200	pv, pH 6 3+
Vimentina (V9)	V9	mouse mAb	Cell Marque	300	pv, pH 9 3+
CD56	123C3-D5	mouse mAb	Cell Marque	5.000	pv, pH 6 3+
CD133 poli	2F8	rabbit polyclonal	Abcam	100	pv, pH 9 3+
Hep-Par	OCH1E5	mouse mAb	Cell Marque	50	pv, pH 9 3+
EGFR - DX	2-18C19	mouse mAb	DAKO	Pronto uso	Proteinase K

3.10.1 Interpretação das reações imuno-histoquímicas

Todas as reações imuno-histoquímicas foram primeiramente avaliadas pela pós-graduanda em microscópio óptico utilizando inicialmente o aumento de 40x para delimitação dos spots e pareamento com a planilha-mapa e posteriormente utilizando o aumento de 100x e 200x para avaliação da reação. Posteriormente os resultados foram reavaliados em microscópio de dupla observação juntamente com o orientador para validação dos resultados. Foram avaliados todos os casos que tiveram pelo menos um spot tumoral.

3.10.2 Interpretação da reação imuno-histoquímica para o EGFR

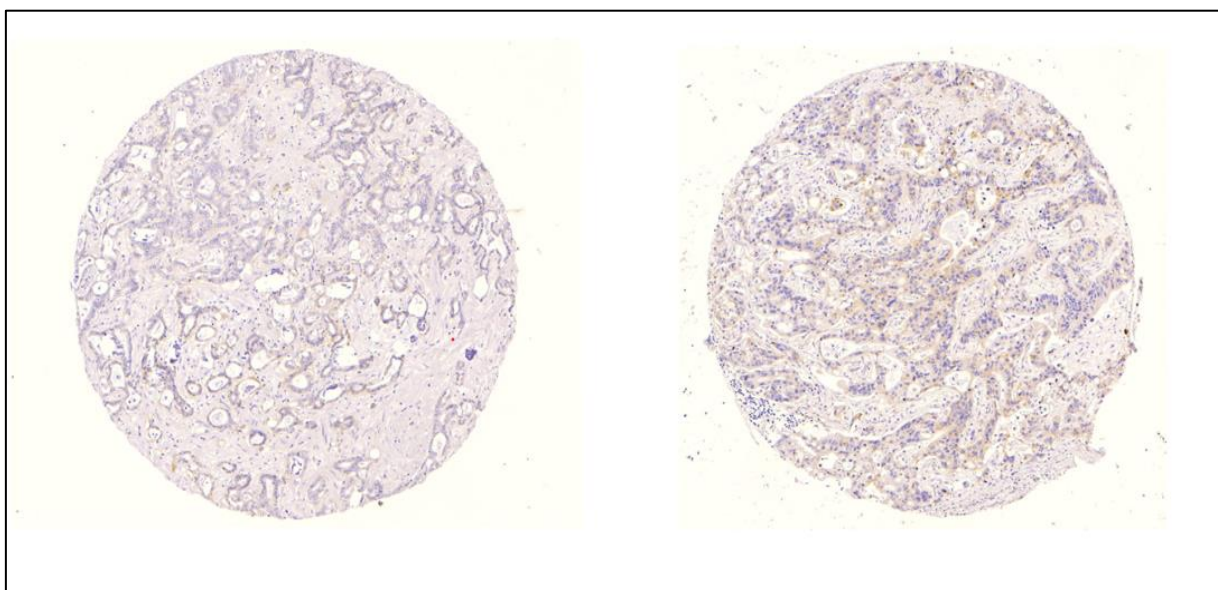
Cada spot foi interpretado individualmente levando em consideração três aspectos da marcação da membrana celular: extensão das áreas tumorais marcadas, intensidade dessa marcação e marcação completa ou incompleta da membrana.

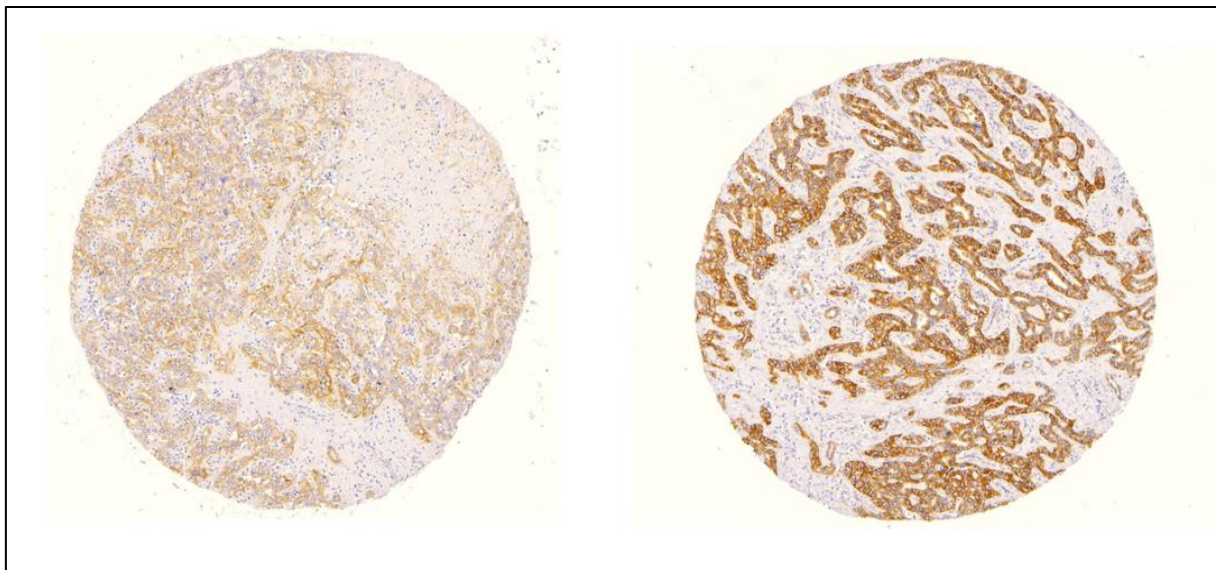
A quantidade de marcação tumoral foi inicialmente avaliada de forma quantitativa em uma escala de 0 a 100%. A intensidade da marcação foi atribuída entre 0 a 3+, onde 0 foi considerado como ausência de reatividade, 1+ marcação fraca apenas visível com a objetiva de 20x, 2+ marcação moderada visível com objetiva de 10x e 3+ marcação forte visível com objetiva de 4x. A marcação da membrana foi considerada completa quando toda a circunferência da célula estava corada e facilmente observada com a objetiva de 10x, já a marcação incompleta foi considerada quando havia marcação em qualquer região da membrana celular tumoral. (Figuras 11, 12 e 13).

Para cada caso o valor final foi obtido através da média dos spots. Nos casos com apenas um spot o valor foi considerado o da quantificação. Os casos sem nenhuma marcação ou marcação de intensidade fraca 1+ foram considerados negativos. (Quadro 2).

Quadro 2: Resumo da interpretação da reação imuno-histoquímica para o EGFR.

EGFR		
Variáveis	Escala	Resultado
% de células tumorais marcadas	0-100	Média dos spots
Intensidade	0	Negativo
	1+	Negativo
	2+	Positivo
	3+	Positivo
Marcação da membrana		Completa
		Incompleta

**A)** EGFR negativo (0)**B)** EGFR negativo (1+)



C) EGFR positivo (2+)

D) EGFR positivo (3+)

Figura 11. Exemplo da classificação da reatividade IHQ para o EGFR. (aumento 100x).

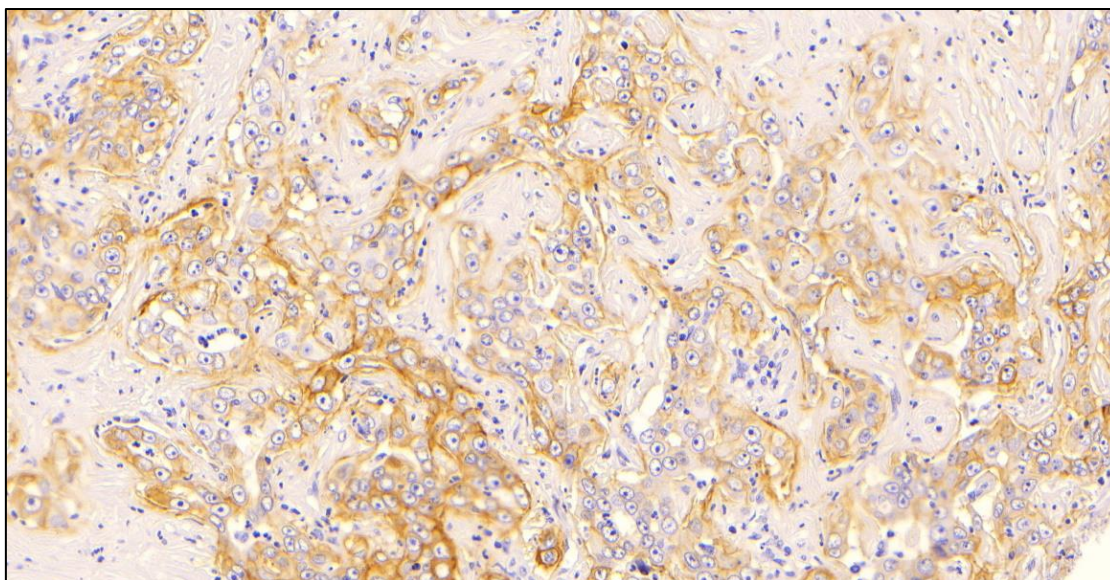


Figura 12. Exemplo da classificação positiva do EGFR 2+ (IHQ aumento 200x).

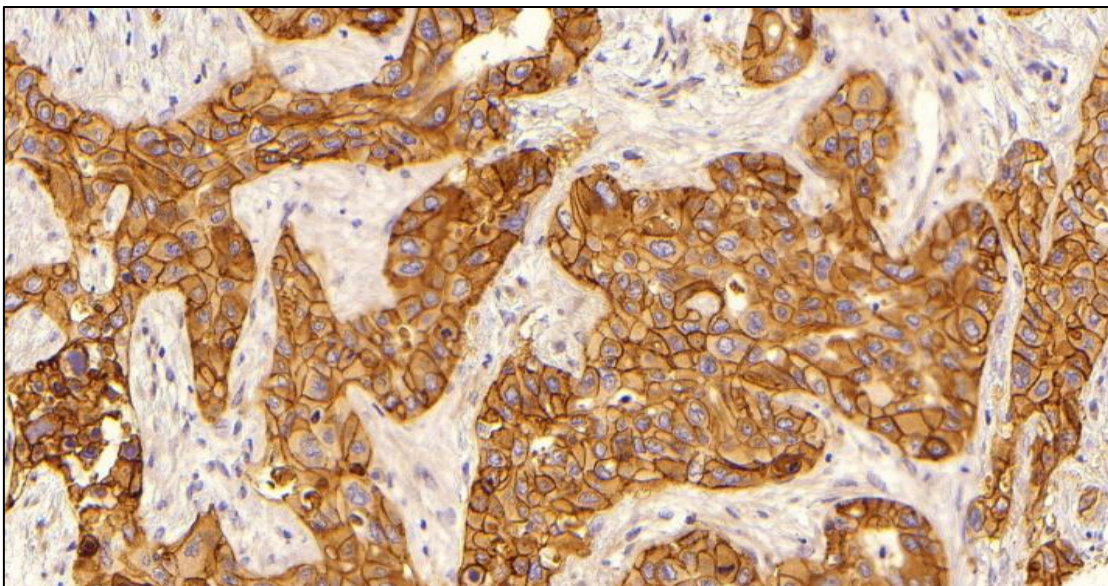


Figura 13. Exemplo da classificação positiva do EGFR 3+ (IHQ aumento 200x).

3.10.3 Interpretação imuno-histoquímica dos demais anticorpos

A reação para os anticorpos MUC1, MUC2, MUC5AC e MUC6 (Figura 14) foi considerada positiva quando a marcação se deu na membrana e no citoplasma das células tumorais, para os anticorpos Vimentina e Hep-Par foi considerada a marcação citoplasmática (Figura 15), nos casos dos anticorpos CD56 e CD133 foi avaliada apenas a marcação da membrana (Figura 16), para a B-catenina foi considerada a marcação nuclear (Figura 17), na avaliação da E-caderina foi considerada apenas a marcação da membrana (Figura 18), já na avaliação da Arginase (Figura 19) foi considerada a marcação citoplasmática e nuclear. Todas as avaliações estão resumidas no Quadro 3.

Cada spot foi interpretado individualmente levando em consideração a quantidade da área tumoral marcada, a avaliação foi realizada de forma quantitativa em uma escala de 0 a 100%. Posteriormente foi calculada a média dos spots para obtenção do valor final para cada caso. Casos com valor da média igual ou acima de 10% foram considerados positivos, abaixo desse valor foram considerados negativos.

O anticorpo E-caderina também foi avaliado de forma quantitativa, porém a interpretação é antagônica aos demais marcadores. Quando o valor da média dos spots

foi igual ou abaixo de 10% o caso foi considerado positivo para perda da expressão proteica.

O anticorpo B-catenina foi avaliado pela presença ou ausência de marcação nuclear, quando a marcação nuclear estava presente o caso foi considerado positivo para mutação. Marcação de membrana e/ou citoplasmática foi considerada negativo para mutação.

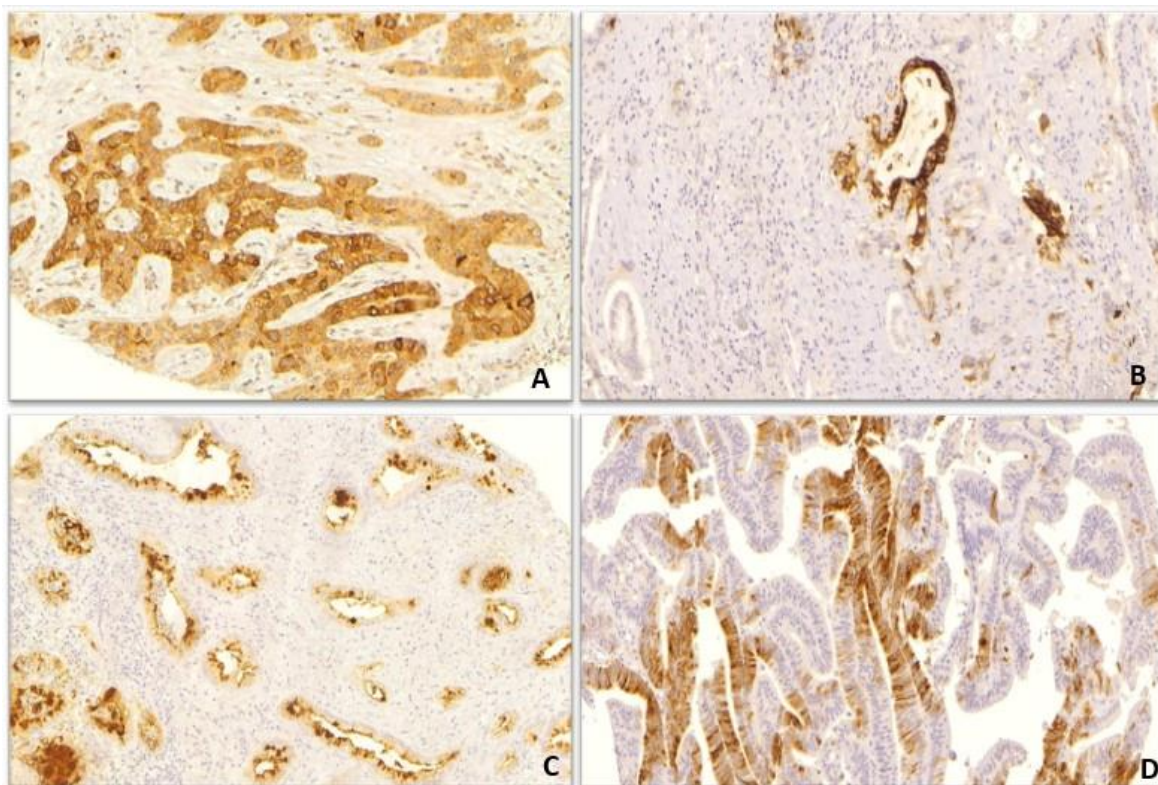


Figura 14. Exemplo da reatividade positiva das mucinas A) MUC1; B) MUC2; C) MUC5AC e D) MUC6 (IHQ aumento 100x).

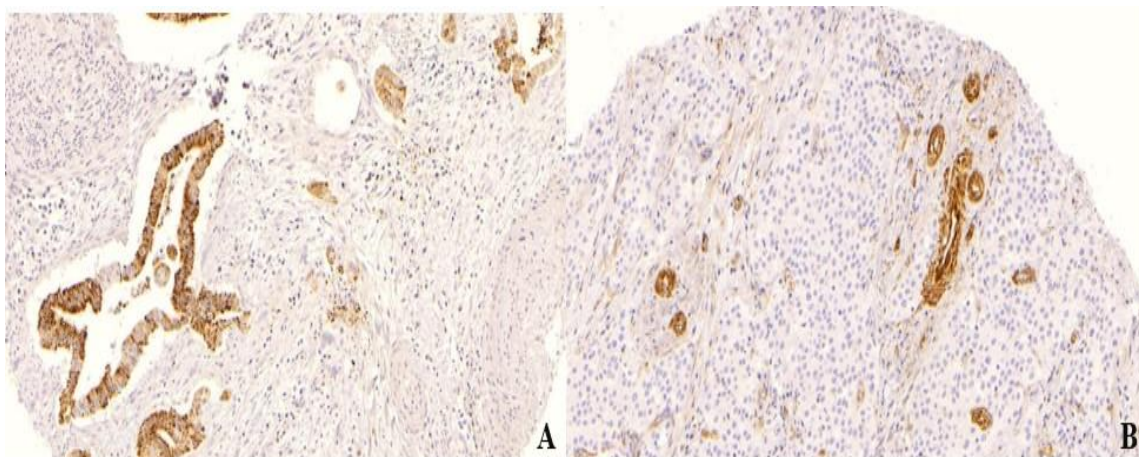


Figura 15. Exemplo da reatividade positiva: A) Hep-par e B) Vimentina (IHQ aumento 100x).

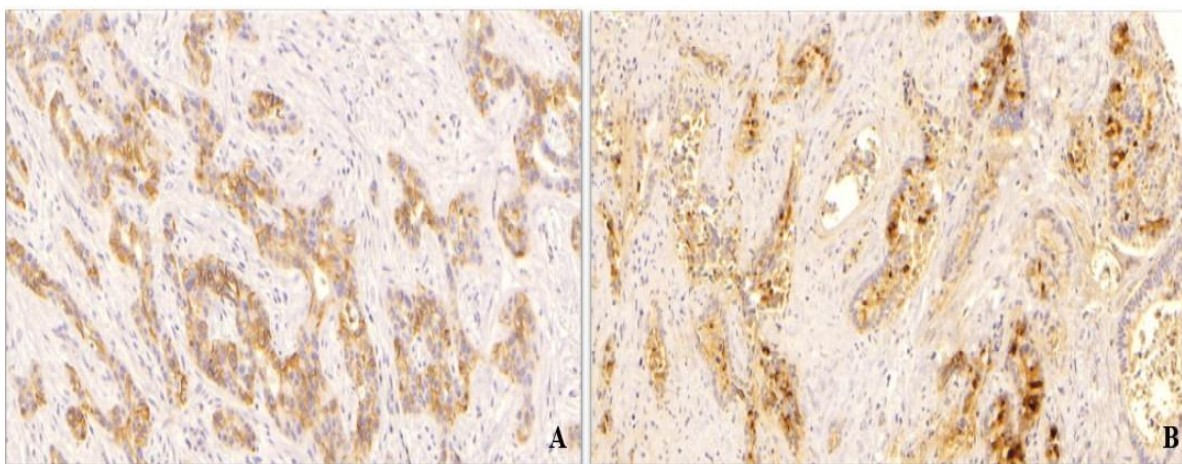


Figura 16. Exemplo da reatividade positiva: A) CD56 e B) CD133 (IHQ aumento 100x).

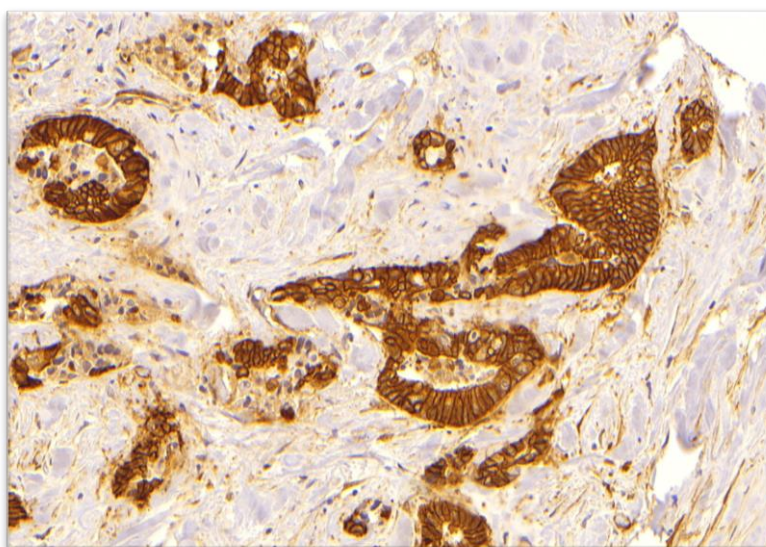


Figura 17. Exemplo da mutação da B-catenina (IHQ aumento 100x).

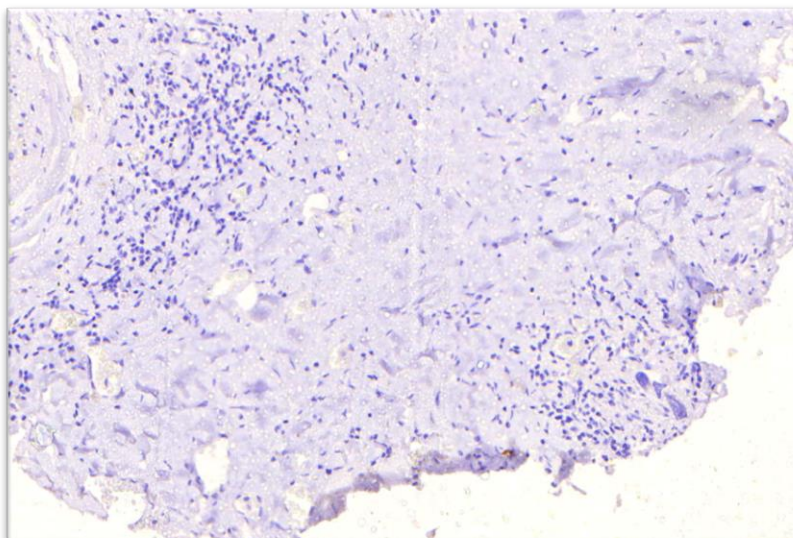


Figura 18. Exemplo da perda da expressão da E-caderina (IHQ aumento 100x).

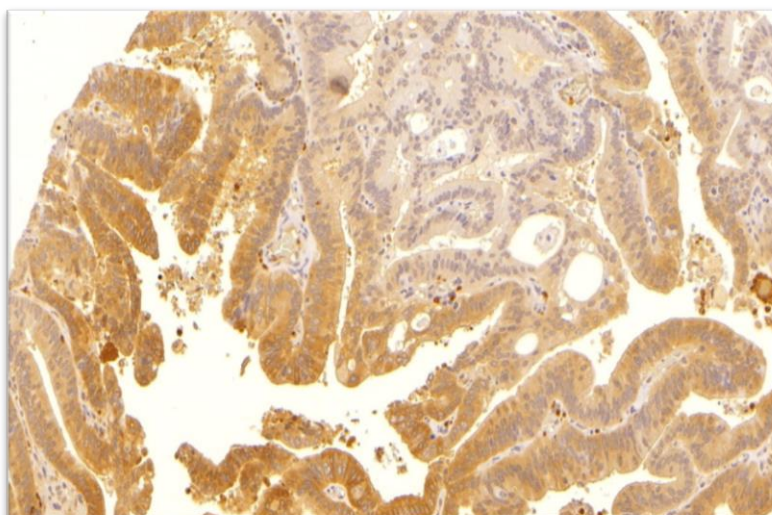


Figura 19. Exemplo da reatividade positiva da Arginase (IHQ aumento 100x).

Quadro 3. Resumo da interpretação da reatividade imuno-histoquímica para os demais anticorpos.

Anticorpo	Marcação	Resultado
MUC 1	Membrana e citoplasma	Positivo/Negativo
MUC 2	Membrana e citoplasma	Positivo/Negativo
MUC 5AC	Membrana e citoplasma	Positivo/Negativo
MUC 6	Membrana e citoplasma	Positivo/Negativo
Vimentina	Citoplasma	Positivo/Negativo
Hep-Par	Citoplasma	Positivo/Negativo
Arginase	Citoplasma e núcleo	Positivo/Negativo
CD56	Membrana	Positivo/Negativo
CD133 poli	Membrana	Positivo/Negativo
E- caderina	Membrana	Perda da expressão/ Expresso
B- catenina	Núcleo	Padrão mutado/Negativo

3.11 Hibridização em situ por fluorescência (FISH)

A reação de FISH é um método onde uma sonda específica para a região do DNA de interesse hibridiza-se com o DNA da amostra, quando esta amostra apresenta DNA correspondente ao da sonda utilizada. Com o uso de filtros adequados, o centrômero do cromossomo 7 é marcado pelo fluorocromo vermelho, já o gene EGFR, que se encontra na região 7p11.2, é marcado pelo fluorocromo verde. Em uma célula com amplificação do gene EGFR, será observada várias cópias ou agrupamentos de sinais verdes.

3.11.1 Reação de FISH

As lâminas de H&E foram utilizadas para seleção das áreas tumorais mais representativas, foi confeccionada uma lâmina em branco silanizada de cada caso, com cortes de 3µm de espessura. A reação foi realizada no Laboratório de Patologia Molecular do ICESP seguindo o protocolo abaixo:

-Desparafinação em xilol quente (60 a 80 °C) por 20 minutos, segundo banho de xilol a temperatura ambiente por 20 minutos, hidratação em dois banhos de álcool etílico absoluto por 2 minutos cada, dois banhos de álcool 70% por dois minutos cada, lavagem em dois banhos em água destilada por dois minutos cada.

-Pré-tratamento em solução tampão MES (ácido Z [N – morfolino] etassulfônico) por 20 minutos em banho-maria pré-aquecido em 120°C. Resfriamento das lâminas por 18 minutos em temperatura ambiente. Lavagens em dois banhos tampão por 3 minutos cada. Secagem das lâminas no hibridizador a 37 °C.

-Digestão enzimática com aplicação da enzima pepsina por 30 segundos, duas lavagens em tampão de lavagem por dois minutos cada. Seguindo para desidratação em banhos de álcool com concentrações crescentes (70%, 80% e 100%) dois minutos cada, com secagem em temperatura ambiente por 20 minutos.

- Aplicação de três microlitros da sonda Zytovision SPEC EGFR/CEN7 Dual Color Probe sobre o fragmento, cobertura com lamínula e cola FIXO GUN, essa etapa é feita sem a presença de luz no ambiente. Utilização do equipamento Hybridizer por 10 minutos a 66 °C e hibridização por 2 horas a 45 °C.

-Após hibridização, foi retirada a cola e a lamínula, em seguida lavagem por 10 minutos em solução tampão pré-aquecida em banho-maria aquecido a 45 °C, seguido de duas lavagens em solução tampão por 3 minutos em temperatura ambiente.

-Desidratação em álcool em concentrações crescentes (70%, 80% e 100%) por dois minutos cada. Secagem das lâminas em temperatura ambiente por 20 minutos, contracoloração com três microlitros de DAPI, cobertura com lamínula e vedação com esmalte. Após secagem por 1 hora, as lâminas foram guardadas em estojo escuro na geladeira até a interpretação.

3.11.2 Interpretação da reação de FISH

A interpretação do FISH foi realizada através do microscópio de fluorescência Nikon *eclipse 80i* em sala escura, sendo avaliada pelo patologista juntamente com pós-graduanda, sem conhecimento prévio dos dados clínicos dos pacientes.

No microscópio de fluorescência foi utilizado o filtro na cor azul para selecionar o campo visual a ser avaliado, após focar os núcleos celulares os filtros na cor vermelha e verde foram utilizados alternadamente para contagem dos sinais fluorescentes. Considerando o sinal verde refere-se ao número de cópias do gene EGFR e o sinal vermelho refere-se ao centrômero 7.

Para cada caso foram selecionados cinco campos visuais, em cada campo foram avaliados cinco núcleos celulares. Após a contagem dos cinco campos visuais foi calculada a razão EGFR/CEP7, quando a razão foi ≥ 2 o caso foi considerado EGFR amplificado, abaixo desse valor foi considerado negativo. Em seguida, foi feita a média dos sinais verdes (EGFR), casos com média acima de 3 foram considerados amplificados pelo ganho no número de cópias do gene EGFR.

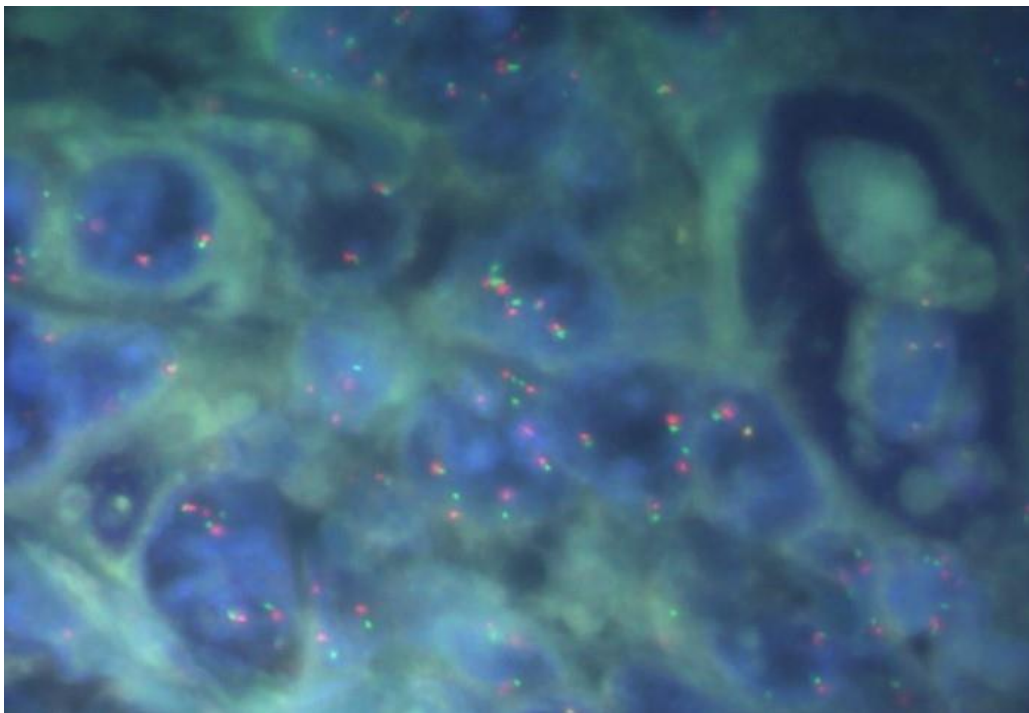


Figura 20. Exemplo da amplificação do EGFR pela técnica de FISH.

3.12 Análise estatística

Os dados foram expressos em média e desvio padrão (\pm DP) e mediana e intervalo interquartil (IIQ) para variáveis contínuas, e em número absoluto e porcentagem para dados categóricos.

A comparação entre os grupos foi realizada utilizando o *teste t* e ANOVA, ou o *teste U de Mann-Whitney* e Kruskal-Wallis, para variáveis contínuas. O teste qui-quadrado ou Teste Exato de *Fisher* foi utilizado para variáveis categóricas.

A correlação entre a expressão proteica do EGFR e os demais marcadores avaliados foi analisada através do coeficiente de correlação de *Pearson*.

Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. As análises foram realizadas utilizando o software estatístico SPSS (versão 20.0, Chicago, IL. EUA).

4. RESULTADOS

4.1 Casuística, aspectos gerais e aspectos anatomopatológicos.

Tabela 1- Sumário dos aspectos gerais de 74 pacientes com diagnóstico de colangiocarcinoma.

Características clínicas e anatomopatológicas

Casuística		N= 74 (%)
Variáveis		
Sexo		
	Masculino	41 (55,5)
	Feminino	33 (44,5)
Idade (anos)		
	Média ± DP	57,2 ± 12,1
	Mínimo-máximo	23-86
	Mediana	59
Tamanho da lesão no maior eixo (cm)*		
	Média	4,49
	Mínimo-máximo	1,0 - 13,0
Topografia		
	Peri-hilar	40 (54,0)
	Extra-hepático	20 (27,0)
	Intra-hepático	14 (19,0)
Padrão de crescimento		
	Infiltrativo periductal	45 (60,9)
	Formador de massa	25 (33,7)
	Intraductal	4 (5,4)
Subtipo histológico		
	Grandes ductos	49 (66,2)
	Colangiocarcinoma	16 (21,7)
	Papilífero	6 (8,1)
	Células intermediárias	3 (4,0)

*N=58, já que em 16 casos não foi possível obter o tamanho da neoplasia.

A tabela 1 apresenta as características clínicas e anatomopatológicas gerais dos pacientes com colangiocarcinoma. Foram incluídos neste estudo 74 pacientes ressecados com o diagnóstico de colangiocarcinoma. A idade média foi de 57,2 anos e a mediana de 59 anos com predomínio do sexo masculino 55,5% (41/74). A idade dos pacientes variou entre 23 e 86 anos.

O tamanho da lesão variou entre 1,0 e 13,0 cm, com tamanho médio de 4,49 cm. A maior parte das lesões acometia a topografia peri-hilar da árvore biliar 54% (40/74), seguido pela porção extra-hepática 27% (20/74) e a região menos frequente foi a intra-hepática 19,0% (14/74). Dentre a casuística total, 16 (21,6%) laudos anatomopatológicos foram emitidos pela DAP sem as dimensões das lesões.

Os padrões de crescimento macroscópico infiltrativo periductal 60,9% (45/74) e o formador de massa 33,7% (25/74) foram os padrões predominantes, já o padrão intraductal 5,4% (4/74) apresentou uma menor frequência.

A avaliação histológica apresentou o subtipo grandes ductos 66,2% (49/74) como o mais frequente, seguido do subtipo colangiolo carcinoma 21,7% (16/74). O subtipo papilífero 8,1% (6/74) e o subtipo células intermediárias 4,0% (3/74) apresentaram menor frequência.

4.2 Aspectos anatomopatológicos

Tabela 2 – Relação entre as variáveis anatomopatológicas e os subtipos histológicos.

Características anatomopatológicas						
Variáveis	Subtipo Histológico N (%)					p**
	GD (N=37)	CLC (N=14)	PL (N=5)	CCI (N=2)	Total (N=58) *	
Lesão (cm)						<0.001
≤ 3	24 (64,9)	3 (21,5)	3 (60,0)	0 (0,0)	30 (51,8)	
> 3	13 (35,1)	11 (78,5)	2 (40,0)	2 (100,0)	28 (48,2)	
Média (DP)	3,5 (2,2)	7,1 (3,7)	3,1 (2,2)	8 (2,8)		
Sexo	GD (N=49)	CLC (N=16)	PL (N=6)	CCI (N=3)	Total (N=74)	p**
						0.727
Masculino	29 (59,1)	7 (43,8)	3 (50,0)	2 (66,7)	41 (55,5)	
Feminino	20 (40,9)	9 (56,2)	3 (50,0)	1 (33,3)	33 (44,5)	
						p**
Idade						0.831
Média (DP)	56,5(13,3)	59,4(10,1)	56,7(10,4)	60,3(5,1)		
						p**
Topografia						<0.001
Peri-hilar	29 (59,2)	7 (43,8)	4 (66,7)	0 (0,0)	40 (54,0)	
Extra-hepático	18 (36,8)	0 (0,0)	2 (33,3)	0 (0,0)	20 (27,1)	
Intra-hepático	2 (4,0)	9 (56,2)	0 (0,0)	3 (100,0)	14 (18,9)	
						p**
Padrão de crescimento						<0.001
Infiltrativo periductal	42 (85,8)	2 (12,5)	1 (16,6)	0 (0,0)	45 (60,8)	
Formador de massa	7 (14,2)	14 (85,5)	1 (16,6)	3 (100,0)	25 (33,7)	
Intraductal	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (66,8)	0 (0,0)	4 (5,5)	

GD: grandes ductos; CLC: colangiocarcinoma; PL: papilífero; CCI: carcinoma de células intermediárias.

* N=58, já que em 16 casos não foi possível obter o tamanho da neoplasia.

**Nível de significância inferior a 0,05

A tabela 2 resume os dados anatomopatológicos em relação aos subtipos histológicos. O subtipo histológico grandes ductos apresentou na maior parte das vezes lesão menor ou igual a 3,0 cm (24/37 casos, 64,9%), acometendo a porção peri-hilar (29/49 casos, 59,2%) e com padrão de crescimento infiltrativo periductal (42/49 casos, 85,8%). O subtipo colangiocarcinoma apresentou na sua maioria lesão maior que 3,0 cm (11/14 casos, 78,5%), localizada frequentemente na porção intra-hepática (9/16

casos, 56,2%) e com padrão de crescimento formador de massa (14/16 casos, 85,5%). O subtipo papilífero apresentou lesão menor ou igual 3 cm (3/5 casos, 60%), com acometimento da região peri-hilar (4/6 casos, 66,7%) e padrão de crescimento intraductal (4/6 casos, 66,8%). Já os três casos do subtipo células intermediárias (100,0%) eram lesões maiores que 3,0 cm e tinham acometimento intra-hepático, com padrão de crescimento formador de massa.

Os subtipos histológicos apresentaram diferenças estatisticamente significativas quanto ao tamanho da lesão, topografia e padrão de crescimento ($p < 0,01$). O sexo ($p = 0,727$) e idade ($P = 0,831$) não apresentam diferenças estatisticamente significativas relacionadas aos subtipos histológicos.

4.3 Análise da reatividade imuno-histoquímica do EGFR

Tabela 3 – Distribuição da reatividade imuno-histoquímica do EGFR em relação aos subtipos histológicos.

EGFR	Subtipo Histológico n (%)				
	GD (N=48)	CLC (N=15)	PL (N=5)	CCI (N=3)	Total (N=71)*
Variáveis					
Negativo	11 (23,0)	2 (13,3)	1 (20,0)	0 (0,0)	14 (19,8)
Positivo	37 (77,0)	13 (86,7)	4 (80,0)	3 (100,0)	57 (80,2)
Intensidade					
0	3 (6,2)	1 (6,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (5,7)
1+	8 (16,7)	1 (6,7)	1 (20,0)	0 (0,0)	10 (14,0)
2+	27 (56,2)	7 (46,6)	3 (60,0)	2 (66,7)	39 (55,0)
3+	10 (20,9)	6 (40,0)	1 (20,0)	1 (33,3)	18 (25,3)
Membrana**					
Completa	10 (20,8)	6 (40,0)	1 (20,0)	1 (33,3)	18 (25,3)
Incompleta	27 (56,2)	7 (46,6)	3 (60,0)	2 (66,6)	39 (54,9)

GD: grandes ductos; CLC: colangiolo carcinoma; PL: papilífero; CCI: carcinoma de células intermediárias.

*Da casuística total 3 casos (N=1 GD; N=1 CLC; N=1 PL) não foram avaliados por perda do spot no TMA.

**Membrana: contabilizado somente os casos positivos (2+ e 3+).

Tabela 4 – Distribuição da reatividade imuno-histoquímica do EGFR em relação aos aspectos anatomopatológicos.

Variáveis		Negativo EGFR (0/1+)	Positivo EGFR (2+/3+)	p*
		n = 14 (%)	n = 57 (%)	
Sexo				0,853
	Masculino	8 (57,1)	31 (54,4)	
	Feminino	6 (42,9)	26 (45,6)	
Idade (anos)				0,134
	Média (DP)	60,8 (9,8)	55,6 (11,8)	
Tamanho da lesão (cm)				0,731
	Média (DP)	5,0 (4,6)	4,4 (2,8)	
Topografia				0,122
	Peri-hilar	10 (71,4)	29 (50,9)	
	Extra-hepático	4 (28,6)	15 (26,3)	
	Intra-hepático	0	13 (22,8)	
Padrão de Crescimento				0,169
	Infiltrativo periductal	11 (78,6)	32 (56,1)	
	Formador de massa	2 (14,3)	22 (38,6)	
	Intraductal	1 (7,1)	3 (5,3)	
Tipo Histológico				0,934
	Grandes Ductos	11 (78,6)	37 (64,9)	
	Colangiolo carcinoma	2 (14,3)	13 (22,8)	
	Papilífero	1 (7,1)	4 (7,0)	
	Células intermediárias	0 (0)	3 (5,3)	
Tipo Histológico				0,525
	Grandes Ductos	11 (78,6)	37 (64,9)	
	Outros	3 (21,4)	20 (35,1)	

* Nível de significância inferior a 0,05.

Após a avaliação microscópica da reação IHQ através das lâminas de TMA, resumidos na tabela 3, o EGFR apresentou positividade em 80,2% dos casos (57/71), apresentando intensidade moderada 2+ em 55,0% (39/71) dos casos e intensidade forte 3+ em 25,3% (18/71) dos casos. Dentre os casos positivos, a marcação da membrana foi na sua maioria incompleta 54,9% (39/71), já a marcação completa da membrana foi de 25,3% (18/71). Dos casos avaliados 14 foram detectados como negativos 19,8% (14/71), com intensidade mínima 1+ 14,0 (10/71), e sem nenhuma marcação 5,7% (4/71).

O subtipo histológico que apresentou maior positividade imuno-histoquímica para o EGFR foi o carcinoma de células intermediárias, em 100% (3/3) dos casos sendo a intensidade 2+ 66,7% (2/3) o mais presente. O subtipo colangiolo carcinoma foi o segundo com maior expressão positiva em 86,7% (13/15) dos casos com intensidade 2+ em 46,6% (7/15) dos casos. O subtipo papilífero revelou positividade de 80,0% dos casos (4/5) com intensidade 2+ 60% em (3/5). Por fim, o subtipo grandes ductos apresentou positividade em 77,0% (37/48) dos casos com intensidade 2+ em 56,2 % (27/48).

A intensidade 3+ foi maior no subtipo colangiolo carcinoma em 40,0% (6/15), seguido do carcinoma de células intermediárias com 33,3% (1/3), grandes ductos 20,9% (10/48) e papilífero com 20,0 % (1/5). Os casos identificados como não avaliáveis, 4% (3/74), foram devidos à perda do spot na lâmina do TMA.

Não houve diferença estatisticamente significativas (tabela 4) entre a distribuição da reatividade do EGFR e os subtipos histológicos ($p=0,934$), quando comparado o subtipo grandes ductos com os demais em relação a distribuição da reatividade do EGFR também não foi observado diferença significativa ($p=0,525$). Não foi detectado diferenças estatisticamente significativas em relação as demais variáveis anatomopatológicas, sexo ($p=0,853$), idade ($p=0,134$), tamanho da lesão ($p=0,731$), topografia ($p=0,122$) e padrão de crescimento ($p=0,169$).

4.4 Análise da reação de FISH do EGFR.

Tabela 5 – Distribuição da reação de FISH do EGFR em relação aos subtipos histológicos.

Reação de FISH	Subtipo Histológico n (%)				Total*
	GD (N=32)	CLC (N=8)	PL (N=5)	CCI (N=3)	
EGFR					
Amplificado	4 (12,5)	1 (12,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	5 (10,5)
Negativo	28 (87,5)	7 (87,5)	5 (100,0)	3 (100,0)	43 (89,5)
* Total	GD (N=7)	CLC (N=5)	PL (N=1)	CCI (N=0)	Total (N=13)
Sem bloco disponível	(N=10)	(N=3)	(N=0)	(N=0)	(N=13)
Não avaliável					

Após a avaliação microscópica por fluorescência resumidos na Tabela 5, dos 48 casos avaliados, 10,5% (5/48) foram considerados amplificados pelo ganho no número de cópias do gene EGFR e 89,5% (43/48) foram considerados negativos. Os casos amplificados foram distribuídos em 12,5 % (4/32) do subtipo grandes ductos e 12,5% (1/8) do subtipo colangiocarcinoma. Os demais subtipos histológicos não apresentaram amplificação do gene EGFR. Nenhum caso estava amplificado pelo cálculo da razão (EGFR/CEP7).

Da casuística total do estudo, 13 casos não disponibilizavam de blocos de parafina para realização da reação e 13 casos não apresentaram sinais fluorescentes suficientes para interpretação, mesmo depois de repetir a reação, esses casos foram considerados como não avaliáveis.

Tabela 6 – Relação entre a distribuição do status da amplificação com a reatividade IHQ do EGFR.

Variáveis	EGFR FISH (-)	EGFR FISH (+)	p*
	n = 43 [89,5%] (%)	n = 5 [10,5%] (%)	
EGFR (%)			0,916
Média	63,1 (34,6)	62,3 (38,0)	
Mediana	75 (47,5 - 95)	65 (14,6 - 79)	
EGFR (intensidade)			0,136
0	1 (2,3)	1 (20)	
1+	7 (16,3)	0 (0)	
2+	27 (62,8)	4 (80)	
3+	8 (18,6)	0 (0)	
EGFR membrana			0,768
Completa	10 (23,3)	1 (20,0)	
Incompleta	29 (67,4)	3 (60,0)	
Ausente	4 (9,3)	1 (20,0)	

*Nível de significância inferior a 0,05

Tabela 7 – Distribuição do status da amplificação do EGFR em relação aos aspectos anatomopatológicos.

Variáveis	EGFR FISH (-) n = 43 [89,5%] (%)	EGFR FISH (+) n = 5 [10,5%] (%)	p*
Sexo			0,660
	Masculino	23 (53,5)	2 (40,0)
	Feminino	20 (46,5)	3 (60,0)
Idade (anos)			0,630
	Média (DP)	57,1 (12,3)	59,8 (7,9)
Tamanho da lesão (cm)			0,453
	Média (DP)	4,1 (2,6)	5,0 (1,8)
Topografia			0,487
	Peri-hilar	23 (53,5)	4 (20,0)
	Extra-hepático	11 (25,6)	0 (0,0)
	Intra-hepático	9 (20,9)	1 (20,0)
Padrão de Crescimento			0,776
	Infiltrativo periductal	25 (58,1)	4 (80,0)
	Formador de massa	14 (32,6)	1 (20,0)
	Intraductal	4 (9,3)	0 (0,0)
Tipo Histológico			0,885
	Grandes Ductos	28 (65,1)	4 (80,0)
	Colangiolo carcinoma	7 (16,3)	1 (20,0)
	Papilífero	5 (11,6)	0 (0,0)
	Células intermediárias	3 (7)	0 (0,0)
Tipo Histológico			0,652
	Grandes Ductos	28 (65,1)	1 (20,0)
	Outros	14 (34,9)	4 (80,0)

*Nível de significância inferior a 0,05

Não houve diferença estatisticamente significativa (Tabela 6) entre a distribuição da amplificação do EGFR e a reatividade IHQ ($p= 0,916$), tampouco com a intensidade ($p=0,136$) e marcação da membrana ($p=0,768$).

Não houve diferença estatisticamente significativa (Tabela 7) entre a distribuição da amplificação do EGFR e os subtipos ($p= 0,885$). Não foi detectada diferença estatisticamente significativa em relação as demais variáveis anatomopatológicas, sexo ($p=0,660$), idade ($p=0,630$), tamanho da lesão ($p=0,453$), topografia ($p=0,487$), e padrão de crescimento ($p=0,776$).

4.5 Análise do status da expressão e da amplificação do EGFR em relação aos demais marcadores.

Tabela 8 – Análise da relação entre a distribuição da reatividade do EGFR e os demais marcadores.

Variáveis	Negativo EGFR (0/1+)		Positivo EGFR (2+/3+)		P*
	n = 14 (%)		n = 57 (%)		
MUC 1 (%)					0,688
	Média	86,7	89,4		
	Mediana	100	96,8		
MUC 1					1,000
	Negativo	0 (0)	2 (3,7)		
	Positivo	13 (100)	52 (96,3)		
MUC 2 (%)					0,442
	Média	6,4	3,5		
	Mediana	0	0		
MUC 2					1,000
	Negativo	12 (85,7)	48 (85,7)		
	Positivo	2 (14,3)	8 (14,3)		
MUC 5AC (%)					0,28
	Média	17,3	28,6		
	Mediana	0	3,5		
MUC 5AC					0,471
	Negativo	9 (64,3)	30 (53,6)		
	Positivo	5 (35,7)	26 (46,4)		
MUC 6 (%)					0,922
	Média	12,3	11,6		
	Mediana	0	0		
MUC 6					0,699
	Negativo	9 (64,3)	39 (69,6)		
	Positivo	5 (35,7)	17 (30,4)		
Arginase (%)					0,331
	Média	5,6	2,4		
	Mediana	0	0		
Arginase					0,186
	Negativo	9 (64,3)	53 (94,6)		
	Positivo	5 (35,7)	3 (5,4)		
Hep-Par (%)					0,974
	Média	7,7	7,6		
	Mediana	0	0		
Hep-Par					0,673
	Negativo	10 (90,9)	44 (81,5)		
	Positivo	1 (9,1)	10 (18,5)		

CD133 (%)				0,966
	Média	11,7	11,4	
	Mediana	0	0	
CD133				1,000
	Negativo	8 (72,7)	42 (75,0)	
	Positivo	3 (27,3)	14 (25,0)	
CD56 (%)				0,419
	Média	1,9	5,6	
	Mediana	0	0	
CD56				1,000
	Negativo	12 (92,3)	50 (87,7)	
	Positivo	1 (7,7)	7 (12,3)	
Vimentina (%)				0,452
	Média	6,7	13,1	
	Mediana	0	0	
Vimentina				0,719
	Negativo	9 (75,0)	44 (78,6)	
	Positivo	3 (25,0)	12 (21,4)	
B-catenina				0,668
	Negativo	11 (100,0)	51 (91,0)	
	Positivo	0 (0)	5 (9,0)	
E-caderina				0,381
	Negativo	1 (11,1)	2 (3,8)	
	Positivo	8 (88,9)	51 (96,2)	

* Nível de significância inferior a 0,05.

Não houve relação estatisticamente significativa entre a distribuição da reatividade imuno-histoquímica do EGFR com os anticorpos da presente pesquisa apresentados na Tabela 8. MUC1 (p=1,000), MUC2 (p=1,000), MUC5AC (p=0,471), MUC6 (p=0,699), Arginase (p=0,186), Hep-Par (p=0,673), CD133 (p=1,000), CD56 (p=1,000), Vimentina (p=0,719), B-catenina (p=0,668) e E-caderina (p=0,381).

Tabela 9 - Análise da relação entre o status da amplificação do EGFR e os demais marcadores.

Variáveis	EGFR FISH (-) n = 43 [89,5%] (%)	EGFR FISH (+) n = 5 [10,5%] (%)	p*
MUC 1 (%)			0,118
Média	91 (18,3)	68,8 (42,2)	
Mediana	98,6 (87,5 - 100)	84,3 (25 - 97,1)	
MUC 1			0,168
Negativo	1 (2,4)	1 (25,0)	
Positivo	41 (97,6)	3 (75,0)	
MUC 2 (%)			0,755
Média	4 (13,8)	6,3 (14,2)	
Mediana	0 (0 - 0)	0 (0 - 23,8)	
MUC 2			0,503
Negativo	38 (88,4)	4 (80,0)	
Positivo	5 (11,6)	1 (20,0)	
MUC 5AC (%)			0,225
Média	30,6 (35,0)	12,2 (25,8)	
Mediana	20 (0 - 60)	1,5 (0 - 44,5)	
MUC 5AC			0,348
Negativo	20 (46,5)	4 (80,0)	
Positivo	23 (53,5)	1 (20,0)	
MUC 6 (%)			0,442
Média	17,6 (27,5)	0,8 (0,8)	
Mediana	0 (0 - 20)	1,2 (0,2 - 1,7)	
MUC 6			0,142
Negativo	24 (55,8)	5 (100,0)	
Positivo	19 (44,2)	0 (0,0)	
Arginase (%)			0,556
Média	3,3 (10,5)	0,5 (1,1)	
Mediana	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	
Arginase			0,740
Negativo	37 (90,2)	5 (100,0)	
Positivo	4 (9,8)	0 (0,0)	
Hep-Par (%)			0,001
Média	5,4 (17,4)	10,7 (35,9)	
Mediana	0 (0 - 0)	33,1 (6,3 - 75,8)	
Hep-Par			0,033
Negativo	35 (87,5)	2 (40,0)	
Positivo	5 (12,5)	3 (60,0)	
CD133 (%)			0,190
Média	13,5 (23,8)	22,3 (31,2)	
Mediana	0 (0 - 23,8)	16,6 (4,1 - 62,9)	
CD133			0,612
Negativo	30 (73,2)	3 (60,0)	
Positivo	11 (26,8)	2 (40,0)	

CD56 (%)				0,824
	Média	3,8 (13,1)	13 (29,1)	
	Mediana	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	
CD56				0,438
	Negativo	39 (90,7)	4 (80,0)	
	Positivo	4 (9,3)	1 (20,0)	
Vimentina (%)				0,323
	Média	10,2 (25,9)	0 (0,0)	
	Mediana	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	
Vimentina				1,000
	Negativo	34 (82,9)	5 (100,0)	
	Positivo	7 (17,1)	0 (0,0)	
B-catenina				0,515
	Negativo	36 (87,8)	4 (80,0)	
	Positivo	2(4,9)	1 (20,0)	
	Inconclusivo	3 (7,3)	0 (0,0)	
E-caderina				1,000
	Negativo	3 (7,7)	0 (0,0)	
	Positivo	36 (92,3)	5 (100,0)	

*Nível de significância inferior a 0,05

Na Tabela 9 foi possível observar que dos casos EGFR amplificados, 60% (3/5) foram positivos para o marcador Hep-Par, todos esses do subtipo grandes ductos. Houve uma correlação estatística entre a amplificação do EGFR e a reatividade IHQ positiva do anticorpo Hep-Par (p=0,033).

Não houve relação estatisticamente significativa entre a distribuição da amplificação do EGFR com os anticorpos da presente pesquisa apresentados na Tabela 9. MUC1 (p=0,168), MUC2 (p=0,503), MUC5AC (p=0,348), MUC6 (p=0,142), Arginase (p=0,740), CD133 (p=0,612), CD56 (p=0,438), Vimentina (p=1,000), B-catenina (p=0,515) e E-caderina (p=1,000).

4.6 Aspectos etiológicos do colangiocarcinoma

Tabela 10 – Relação entre as doenças de base e os subtipos histológicos.

Doença de base	Subtipo Histológico n (%)					P*
	GD (N=34)	CLC (N=10)	PL (N=4)	CCI (N=3)	Total (N=51)**	
Colangite crônica						0,349
Presente	24 (70,5)	5 (50,0)	2 (50,0)	1 (33,3)	32 (62,8)	
Ausente	10 (29,5)	5 (50,0)	2 (50,0)	2 (66,7)	19 (37,2)	
Mal formação de placa ductal						0,262
Presente	11 (32,3)	1 (10,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	12 (23,5)	
Ausente	23 (67,7)	9 (90,0)	4 (100,0)	3 (100,0)	39 (76,5)	
Esteatose hepática						0,137
Presente	5 (14,8)	3 (30,0)	1 (25,0)	2 (66,7)	11 (21,5)	
Ausente	29 (85,2)	7 (70,0)	3 (75,0)	1 (33,3)	40 (78,5)	
Cirrose						0,802
Presente	5 (14,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	5 (9,9)	
Ausente	29 (85,2)	10 (100,0)	4 (100,0)	3 (100,0)	46 (90,1)	
Litíase intra-hepática						0,065
Presente	1 (3,0)	0 (0,0)	1 (25,0)	1 (33,3)	3 (5,9)	
Ausente	33 (97,0)	10 (100,0)	3 (75,0)	2 (66,7)	48 (94,1)	
Hepatite B						0,190
Presente	1 (3,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (33,3)	2 (4,0)	
Ausente	33 (97,0)	10 (100,0)	4 (100,0)	2 (66,7)	49 (96,0)	
No. de Doenças de Base						0,157
0 - 1	20 (58,8)	9 (90,0)	3 (75,0)	1 (33,3)	33 (64,8)	
>2	14 (41,2)	1 (10,0)	1 (25,0)	2 (66,7)	18 (35,2)	

GD: grandes ductos; CLC: colangiocarcinoma; PL: papilífero; CCI: carcinoma de células intermediárias.

*Nível de significância inferior a 0,05.

**23 casos não avaliáveis da casuística total (74), por indisponibilidade da lâmina/bloco HE.

A Tabela 10 apresenta as doenças de base identificadas neste estudo e a sua relação com os subtipos histológicos. O presente estudo identificou a colangite crônica 62,8% (32/51) como a principal doença de base associada ao colangiocarcinoma, seguida pela presença de mal formação de placa ductal 23,5% (12/51), esteatose hepática 21,5% (11/51) e cirrose hepática 9,9% (5/71). A litíase intra-hepática 5,9% (3/51) e a hepatite B 4,0% (2/51) foram as doenças de base que apresentaram menor frequência.

Em relação aos subtipos histológicos, podemos destacar que a colangite crônica foi mais observada no subtipo grandes ductos 70,5% (24/34) e menos no subtipo células intermediárias 33,3% (1/3). Já nos subtipos colangiocarcinoma 50% (5/10) e papilífero 50% (2/4) a colangite crônica foi observada na metade dos casos.

A malformação de placa ductal, condição raramente detectada na população em geral, foi evidenciada em elevada frequência no subtipo grandes ductos, 32,3% (11/34) dos casos, e menor no subtipo colangiocarcinoma, estando presente em 10% (1/10) dos casos. Já nos subtipos papilífero e células intermediárias não foi detectado nenhum caso.

A presença de esteatose hepática foi heterogênea, sendo 66,7 % (2/3) presente no subtipo células intermediárias, 30% (3/10) no subtipo colangiocarcinoma, 25% (1/4) no subtipo papilífero e 14,8% (5/34) no subtipo grandes ductos.

A cirrose hepática foi detectada apenas no subtipo grandes ductos 14,8% (5/34), estando ausente nos subtipos colangiocarcinoma, papilífero e células intermediárias. A litíase intra-hepática foi observada nos subtipos células intermediárias 33,3% (1/3), papilífero 25% (1/4) e grandes ductos 3,0% (1/34). Já a hepatite B foi detectada apenas nos subtipos grandes ductos 3,0% (1/34) e células intermediárias 33,3% (1/3).

Os casos mencionados como não avaliáveis foi devido à indisponibilidade de lâminas e/ou blocos do parênquima hepático fora da neoplasia.

Não houve relação significativa estatisticamente entre as doenças de base com os subtipos histológicos: colangite crônica ($p=0,349$), mal formação de placa ductal ($p=0,262$), esteatose hepática ($p=0,137$), cirrose ($p=0,802$), litíase intra-hepática ($p=0,065$), hepatite B ($p=0,190$). Também não foi detectada relação estatística significativa entre o número de doenças de base com os subtipos histológicos ($p=0,157$).

Tabela 11 – Relação entre as doenças de base e a imunexpressão do EGFR.

Variáveis	Negativo EGFR (0/1+)		Positivo EGFR (2+/3+)		P*
	n = 14 (%)		n = 57 (%)		
Mal Formação de Placa Ductal					0,087
	Ausente	2 (40,0)	35 (79,5)		
	Presente	3 (60,0)	9 (20,5)		
Colangite crônica					0,646
	Ausente	1 (20,0)	16 (36,4)		
	Presente	4 (80,0)	28 (63,6)		
Esteatose hepática					1,000
	Ausente	4 (80,0)	34 (77,3)		
	Presente	1 (20,0)	10 (22,7)		
Litíase intra-hepática					0,281
	Ausente	4 (80,0)	42 (95,5)		
	Presente	1 (20,0)	2 (4,5)		
Hepatite B					1,000
	Ausente	5 (100,0)	42 (95,5)		
	Presente	0 (0)	2 (4,5)		
Cirrose					0,075
	Ausente	3 (60,0)	41 (93,2)		
	Presente	2 (40,0)	3 (6,8)		

*Nível de significância inferior a 0,05.

Não foi detectado associação estatística significativa entre a imunexpressão do EGFR com as doenças de base presentes nesse estudo, apresentados na Tabela 11. colangite crônica (p=0,646), mal formação de placa ductal (p=0,087), esteatose hepática (p=1,000), cirrose (p=0,075), litíase intra-hepática (p=0,281), hepatite B (p=1,000).

Tabela 12 - Relação entre as doenças de base e o status da amplificação do EGFR.

Variáveis		EGFR FISH (-) n = 43 [89,5%] (%)	EGFR FISH (+) n = 5 [10,5%] (%)	p*
Colangite crônica				1,000
	Ausente	10 (30,3)	1 (25,0)	
	Presente	23 (69,7)	3 (75,0)	
Mal Formação de Placa Ductal				1,000
	Ausente	24 (72,7)	3 (75,0)	
	Presente	9 (27,3)	1 (25,0)	
Esteatose hepática				0,570
	Ausente	26 (78,8)	4 (100,0)	
	Presente	7 (21,2)	0 (0,0)	
Cirrose				0,380
	Ausente	30 (90,9)	3 (75,0)	
	Presente	3 (9,1)	1 (25,0)	
Litíase intra-hepática				1,000
	Ausente	30 (90,9)	4 (100,0)	
	Presente	3 (9,1)	0 (0,0)	
Hepatite B				1,000
	Ausente	31 (93,9)	4 (100,0)	
	Presente	2 (6,1)	0 (0,0)	

*Nível de significância inferior a 0,05

Não foi detectado associação estatística significativa entre a amplificação do EGFR com as doenças de base presentes nesse estudo, apresentados na Tabela 12. colangite crônica (p=1,000), mal formação de placa ductal (p=1,000), esteatose hepática (p=0,570), cirrose (p=0,380), litíase intra-hepática (p=1,000), hepatite B (p=1,000).

4.7 Análise da reatividade imuno-histoquímica dos demais anticorpos

Tabela 13 – Distribuição da reatividade imuno-histoquímica dos demais anticorpos em relação aos subtipos histológicos.

Anticorpo**	Subtipo Histológico n (%)					P*
	GD (N=48)	CLC (N=16)	PL (N=6)	CCI (N=3)	Total (N=73)	
MUC 1						0,159
Positivo	47 (98,0)	13 (81,2)	6 (100,0)	2 (66,7)	68 (93,2)	
Negativo	1 (2,0)	3 (18,8)	0 (0,0)	1 (33,3)	5 (6,8)	
	GD (N=48)	CLC (N=15)	PL (N=5)	CCI (N=3)	Total (N=71)	
MUC 5AC						0,428
Positivo	24 (50,0)	3 (20,0)	3 (60,0)	1 (33,3)	31 (43,7)	
Negativo	24 (50,0)	12 (80,0)	2 (40,0)	2 (66,7)	40 (56,3)	
	GD (N=48)	CLC (N=15)	PL (N=6)	CCI (N=3)	Total (N=72)	
MUC 2						0,367
Positivo	9 (18,8)	0 (0,0)	2 (33,3)	0 (0,0)	11 (15,2)	
Negativo	39 (81,2)	15 (100,0)	4 (66,7)	3 (100,0)	61 (84,8)	
	GD (N=48)	CLC (N=15)	PL (N=6)	CCI (N=3)	Total (N=72)	
MUC 6						0,008
Positivo	18 (37,5)	0 (0,0)	3 (50,0)	1 (33,3)	22 (30,5)	
Negativo	30 (62,5)	15 (100,0)	3 (50,0)	2 (66,7)	50 (69,5)	
	GD (N=44)	CLC (N=15)	PL (N=6)	CCI (N=3)	Total (N=68)	
Arginase						0,380
Positivo	1 (2,2)	3 (20,0)	1 (16,7)	0 (0,0)	5 (7,3)	
Negativo	43 (97,8)	12 (80,0)	5 (83,3)	3 (100,0)	63 (92,7)	
	GD (N=42)	CLC (N=15)	PL (N=5)	CCI (N=3)	Total (N=65)	
Hep-Par						0,462
Positivo	8 (19,0)	1 (6,7)	2 (40,0)	0 (0,0)	11 (17,0)	
Negativo	34 (81,0)	14 (93,3)	3 (60,0)	3 (100,0)	54 (83,0)	
	GD (N=44)	CLC (N=15)	PL (N=5)	CCI (N=3)	Total (N=67)	
CD133						0,448
Positivo	9 (20,5)	7 (46,7)	1 (20,0)	0 (0,0)	17 (25,3)	
Negativo	35 (79,5)	8 (53,3)	4 (80,0)	3 (100,0)	50 (74,7)	

	GD (N=47)	CLC (N=15)	PL (N=5)	CCI (N=3)	Total (N=70)	
CD56						0,128
Positivo	3 (6,3)	4 (26,7)	1 (20,0)	0 (0,0)	8 (11,5)	
Negativo	44 (93,7)	11 (73,3)	4 (80,0)	3 (100,0)	62 (88,5)	
	GD (N=45)	CLC (N=15)	PL (N=6)	CCI (N=3)	Total (N=69)	
Vimentina						0,078
Positivo	7 (15,5)	6 (40,0)	0 (0,0)	2 (66,7)	15 (21,8)	
Negativo	38 (84,5)	9 (60,0)	6 (100,0)	1 (33,3)	54 (78,2)	
	GD (N=44)	CLC (N=15)	PL (N=6)	CCI (N=3)	Total (N=68)	
B-catenina						0,715
Mutado	2 (4,5)	1 (6,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (4,5)	
Negativo	42 (95,5)	14 (93,3)	6 (100,0)	3 (100,0)	65 (95,5)	
	GD (N=39)	CLC (N=15)	PL (N=6)	CCI (N=3)	Total (N=63)	
E-caderina						0,133
Perda de expressão	1 (2,5)	1 (6,7)	0 (0,0)	1 (33,3)	3 (4,8)	
Expresso	38 (97,5)	14 (93,3)	6 (100,0)	2 (66,7)	60 (95,2)	

GD: grandes ductos; CLC: colangiocarcinoma; PL: papilífero; CCI: carcinoma de células intermediárias.

*Nível de significância inferior a 0,05.

** (perda spot)	GD (N)	CLC (N)	PL (N)	CCI (N)	Total (N)
MUC 1	1	0	0	0	1
MUC 5AC	1	1	1	0	3
MUC 2	1	1	0	0	2
MUC 6	1	1	0	0	2
Arginase	5	1	0	0	6
Hep-Par	7	1	1	0	9
CD133	5	1	1	0	7
CD56	2	1	1	0	4
Vimentina	4	1	0	0	5
B-catenina	5	1	0	0	6
E-caderina	10	1	0	0	11

Após a avaliação microscópica da reação IHQ através das lâminas de TMA, resumidos na tabela 13, foi observado que a maior parte dos CC expressa MUC1 93,2% (68/73). Sendo mais presente nos subtipos papilífero 100% (6/6) e grandes ductos 98,0% (47/48), seguido dos subtipos colangiocarcinoma 81,2% (13/16) e células intermediárias 66,7% (2/3).

A expressão da mucina MUC5AC estava presente em 43,7% (31/71) dos casos, sendo mais predominante no subtipo papilífero 60% (3/5), seguido dos subtipos grandes ductos 50% (24/48), células intermediárias 33,3% (1/3) e colangiolo carcinoma 20% (3/15).

A presença de MUC2 foi detectada em 15,2% (11/72) dos casos, sendo expressa apenas nos subtipos papilífero 33,3 % (2/6) e grandes ductos 18,8% (9/48). Já nos subtipos colangiolo carcinoma (15/15) e células intermediárias (3/3) todos os casos foram negativos para MUC2.

A expressão de MUC6 foi observada em 30,5% (22/72) dos casos, sendo mais presente no subtipo papilífero 50% (3/6), seguido do subtipo grandes ductos 37,5% (18/48) e células intermediárias 33,3% (1/3), já o subtipo colangiolo carcinoma não apresentou nenhum caso positivo (0/15).

De maneira geral, dentre o grupo das mucinas podemos destacar que a expressão de MUC1 estava presente em todos os tipos histológicos, já a expressão de MUC2 foi ausente nos subtipos colangiolo carcinoma e carcinoma de células intermediárias. Não houve expressão de MUC6 no subtipo colangiolo carcinoma e a expressão de MUC 5AC foi heterogenia dentre os subtipos histológicos.

O anticorpo Arginase apresentou baixa expressão na casuística geral, estando presente em apenas 7,3% (5/68), o subtipo histológico que apresentou maior positividade foi o subtipo colangiolo carcinoma 20% (3/15), seguido do subtipo papilífero com 16% (1/6) dos casos. O subtipo grandes ductos apresentou baixa positividade para o anticorpo Arginase 2,2% (1/44). Nenhum caso do subtipo células intermediárias apresentou expressão para Arginase.

A expressão do anticorpo Hep-Par foi detectada em 17,0% (11/65) dos casos, sendo mais observada no subtipo papilífero 40% (2/5) e no subtipo grandes ductos 19,0% (8/42), já o subtipo colangiolo carcinoma apresentou baixa positividade para o anticorpo Hep-Par 6,7% (1/15). O subtipo células intermediárias não apresentou nenhum caso positivo.

O anticorpo CD133 foi expresso em 25,3% (17/67) dos casos, sendo mais presente no subtipo colangiolo carcinoma 46,7% (7/15), seguido do subtipo grandes

ductos 20,5% (9/44) e papilífero 20% (1/5). O subtipo células intermediárias não apresentou nenhum caso positivo.

A presença do CD56 foi observada em 11,5% (8/70) dos casos, sendo mais expresso nos subtipos colangiolo carcinoma 26,7% (4/15) e papilífero 20% (1/5), e pouco expresso no subtipo grandes ductos 6,3% (3/47). O subtipo células intermediárias não apresentou nenhum caso positivo.

A expressão da Vimentina foi detectada em 21,8 % (15/69) dos casos, sendo mais predominante no subtipo células intermediárias 66,7% (2/3), seguido do subtipo colangiolo carcinoma 40% (6/15) e por fim, o subtipo grandes ductos 15,5 % (7/45). O subtipo papilífero não apresentou nenhum caso positivo para Vimentina.

A mutação da B-catenina foi detectada em 4,5% (3/68) dos casos, sendo observados em um caso no subtipo colangiolo carcinoma 6,7% (1/15) e dois casos no subtipo grandes ductos 4,5% (2/44). Os subtipos papilífero e células intermediárias não apresentaram mutação da B-catenina.

A perda de expressão da E-caderina foi observada em 4,8% (3/63) dos casos, sendo detectada nos subtipos células intermediárias 33,3% (1/3), colangiolo carcinoma 6,7% (1/15) e grandes ductos 2,5% (1/39). O subtipo papilífero não apresentou perda de expressão para E-caderina.

Houve significância estatística para diferenciar os subtipos histológicos pelo padrão de imunoexpressão de MUC6 ($p=0,008$). Já os demais anticorpos não apresentaram significância estatística na diferenciação dos subtipos histológicos: MUC1 ($p=0,159$), MUC5AC ($p=0,428$), MUC2 ($p=0,367$), Arginase ($p=0,380$), Hep-Par ($p=0,462$), CD133 ($p=0,448$), CD56 ($p=0,128$), Vimentina ($p=0,078$), B-catenina ($p=0,715$) e E-caderina ($p=0,133$).

Pelo teste de correlação de Pearson, houve correlação negativa entre: o tamanho da lesão e a expressão de MUC1 ($p=0,006$); CD56 e MUC1 ($P=0,004$); Vimentina e MUC5AC ($p=0,007$). Houve correlação positiva entre: MUC2 e HepPar ($p=0,049$); MUC 6 e MUC5AC ($p=0,034$).

5. DISCUSSÃO

De maneira geral, a nossa casuística representa pacientes com CC que apresentaram neoplasia localizada nos vários segmentos da arvore biliar com diferentes subtipos histológicos, parte deles com doença de base identificável.

Diante dos avanços observados no tratamento dos diversos tipos de câncer, a terapia alvo tem se mostrado muito promissora, como é o caso do uso dos medicamentos anti-EGFR no câncer de pulmão⁷⁰. Considerando este aspecto com os desafios no manejo do CC, tal como a falta da padronização histológica e tratamento dessa patologia, realizamos esse estudo retrospectivo na busca de elucidar parte do perfil molecular do CC através do estudo do EGFR e de outros marcadores, utilizando a técnica de imuno-histoquímica e FISH, buscando estabelecer relação de tais achados com os diferentes fenótipos do CC apresentados nos seus subtipos histológicos.

A escolha das duas técnicas moleculares para detecção das alterações no EGFR foi encorajada com base no protocolo da análise do HER2 em câncer de mama. No câncer de mama os pacientes que apresentam o status do HER2 “equivoco” na IHQ (2+) são confirmados pelo FISH quanto à amplificação do gene e os casos amplificados têm indicado o tratamento com terapia alvo anti-HER2. Ainda não existe nenhum protocolo desse tipo para o CC.⁷¹

5.1 Status do EGFR no colangiocarcinoma

Na nossa revisão bibliográfica não foi localizada nenhuma pesquisa do status do EGFR através das técnicas IHQ e FISH associado aos subtipos histológicos do CC. A maioria dos estudos utilizam técnicas de sequenciamento do DNA na busca de mutações do EGFR e faz relação apenas com a localização da neoplasia na arvore biliar e não com o seu subtipo histológico.

O presente estudo revelou que a expressão proteica do EGFR pesquisada através de imuno-histoquímica se mostrou frequente em mais da metade de todos os subtipos histológicos. Dos 71 casos em que foi possível realizar a análise, apenas 14 foram considerados totalmente negativos, sendo que 10 deles apresentaram expressão fraca (1+) do receptor. Já os 57 casos positivos (2+ e 3+) apresentaram na sua maioria expressão moderada (39 casos 2+) com marcação incompleta da membrana. Os casos

com marcação forte (18 casos 3+) apresentaram marcação completa da membrana. Não houve diferenças significativas na distribuição da intensidade entre os subtipos histológicos, porém a intensidade 2+ foi maior no subtipo células intermediárias (66,6%) e menor no subtipo colangiolo carcinoma (46,6%). Já a intensidade 3+ foi maior no subtipo colangiolo carcinoma (40%) e menor no subtipo papilífero (20%). Da casuística total, 61 casos foram submetidos a realização do FISH para o estudo da amplificação do EGFR, porém somente 48 casos apresentaram sinais fluorescentes possíveis de serem avaliados, mesmo após a repetição da técnica nos casos que não apresentaram sinais fluorescentes da primeira vez. Dos 48 casos, nenhum apresentou amplificação do EGFR pelo cálculo da razão, porém 05 casos foram considerados amplificados pelo ganho de cópias do EGFR (igual ou mais que três cópias por célula). Dos 5 casos amplificados, 4 são do subtipo grandes ductos, sendo 3 deles positivos na IHQ (2+) e 1 caso negativo. O outro caso considerado amplificado foi do subtipo colangiolo carcinoma, sendo positivo na IHQ (2+).

Yoshikawa e colaboradores⁷² conduziram um estudo que analisou a significância clínico-patológica e prognóstica da expressão do EGFR, VGFR e HER2 em 236 pacientes com diagnóstico de CC, com 106 casos intra-hepáticos e 130 casos extra-hepáticos. A análise do EGFR foi realizada através da técnica de IHQ utilizando o anticorpo monoclonal de camundongo anti-EGFR clone 31G7 (Zymed, 1: 100). Os casos foram classificados de acordo com a intensidade da marcação nas seguintes categorias 0, 1+, 2+ e 3+ levando em consideração o valor de corte de 10% das células tumorais marcadas. O EGFR foi expresso em 54 (22,8%) casos, distribuídos em 29 (27,4%) intra-hepáticos e 25 (19,2%) extra-hepáticos. No estudo citado não houve associação significativa entre a expressão do EGFR e quaisquer fatores clínico-patológicos. Os casos extra-hepáticos que apresentaram expressão do EGFR foram significativamente associados ao tipo macroscópico (0% tipo polipóide e 24,0% tipo não polipóide; $p = 0,0120$).

Uma pesquisa conduzida por Harder e colaboradores⁷³ avaliou a expressão do EGFR e HER2 em 124 biópsias que apresentavam câncer avançado no trato biliar. Em 47 (37,9%) casos a lesão era intra-hepática, em 43 (34,7%) casos a lesão foi observada na topografia extra-hepática ou peri-hilar e 34 (27,4%) casos tinham câncer de vesícula biliar. O kit utilizado na reação IHQ foi o PharmDX e a expressão do EGFR foi

examinada em um subconjunto de 56 amostras escolhidas de forma aleatória. Estes casos foram classificados em categorias de acordo com a intensidade da marcação (1+, 2+ e 3+), e casos em que a coloração foi observada em menos de 1% das células tumorais foram considerados negativos. Dos 56 casos, a expressão do EGFR foi observada em 34 (60,7%), sendo que a expressão foi pontuada como 1+ em 12 (21,5%) casos, 2+ em 13 (23,2%) casos e 3+ em 9 (16%) casos. A reação de FISH para pesquisa da amplificação foi realizada apenas para o gene HER2.

Shafizadeh e colaboradores⁷⁴ analisaram a expressão e amplificação do EGFR e do gene HER2 em 51 casos classificados como adenocarcinoma de vias biliares. O estudo foi composto por 26 casos intra-hepáticos, 19 casos extra-hepáticos e 6 casos localizados na vesícula biliar. Para realização da técnica de IHQ foi utilizado o kit EGFR PharmDx anticorpo monoclonal (clone 2-18C9). Na avaliação IHQ os casos foram considerados positivos quando apresentaram expressão de membrana em pelo menos 1% das células tumorais e foram classificados em fraco (1+), moderado (2+) e forte (3+). Dos 51 casos, 41 (80%) foram considerados positivos, sendo 30 (59%) classificados como 2+ e 3+ e estes distribuídos em topografia intra-hepática 15/26 (58%), extra-hepática 13/19 (68%) e vesícula biliar 2/6 (33%). Para realização da técnica de FISH foi utilizada a sonda Vysis, Downer's Grove e a reação foi realizada em 37 casos. Para avaliação final foi realizada a contagem dos sinais fluorescentes em 50 núcleos tumorais e calculada a razão entre o sinal EGFR/CEP7. Os casos foram considerados amplificados quando apresentaram média superior a 3 ou número médio (15 células /100 células com 3 ou mais sinais do EGFR). Dos 37 casos, 17 (46%) apresentaram um aumento no número de cópias do EGFR, com um caso considerado amplificado pelo cálculo da razão, os 16 casos restantes apresentaram polissomia do cromossomo 7, justificando o ganho no número de cópias do EGFR. Os 17 casos foram distribuídos em 11 (44%) intra-hepáticos, 4 (40%) extra-hepáticos, incluindo o caso amplificado e 2 (100%) adenocarcinomas da vesícula. Todos os casos que apresentaram um ganho no número de cópias também apresentaram expressão do EGFR na IHQ, sendo 13 casos com expressão moderada (2+) e 4 casos com expressão forte (3+). Porém, vale ressaltar que 14 casos (70%) com 2+ e 3+ não apresentaram ganho no número de cópias e a diferença não foi significativa mesmo quando apenas as expressões moderada e forte foram consideradas positivas ($p=0,09$).

Yang e colaboradores⁷⁵ conduziram um estudo cuja casuística foi composta por 175 casos com diagnóstico de CC, analisando a expressão do EGFR e dos demais membros da sua família (HER2, HER3 e HER4), além da amplificação do gene EGFR e HER2. A casuística foi dividida em 65 casos intra-hepáticos e 110 casos extra-hepáticos. Na análise da expressão do EGFR por IHQ os casos foram classificados em 0, 1+, 2+ e 3+, sendo que os casos 2+ e 3+ foram considerados positivos. Dos 175 casos, 43 (24,5%) foram considerados positivos, sendo distribuídos em 20 intra-hepáticos (30,8%) e 23 extra-hepáticos (20,9%). O estudo da amplificação do EGFR foi realizado em 169 casos, através da sonda GLP EGFR/CSP 7. Para avaliação foi realizada a contagem de 50 células tumorais e o caso foi considerado amplificado quando mais de 10% das células tumorais apresentavam aumento de sinal fluorescente do EGFR ou pelo cálculo da razão EGFR/CEP7 >2. A amplificação foi observada em 4 (2,3%) dos casos, sendo 1 (1,6 %) dos 63 casos intra-hepáticos e 3 (2,8%) dos 106 casos extra-hepáticos. Houve uma correlação estatística entre a expressão e a amplificação do EGFR (p=0,002).

Jung e colaboradores⁷⁶ em 2017 analisaram a expressão e amplificação do EGFR e HER2 em 84 casos de CC extra-hepáticos. Foi utilizado o anticorpo monoclonal 3C6 do kit Ventana e os casos foram classificados em 0 e 1+ (negativos), 2+ (equivoco) e 3+ (positivo), considerando o valor de corte de 10% das células tumorais marcadas. A avaliação da expressão do EGFR através da IHQ revelou 5 (5,9%) casos classificados como 2+ e 5 (5,9%) casos como 3+. A reação de FISH para pesquisa da amplificação do EGFR foi realizada em 21 casos através da sonda ZytoLigth SPEC EGFR/CEN7 dual color probe e os casos foram considerados amplificados quando apresentavam razão EGFR/CEN7 ≥ 2 ou 15 cópias de EGFR por célula em 10% de células analisadas. Na avaliação do FISH, quando considerados casos com alta e baixa polissomia, a amplificação foi observada em 8 (38%) casos, sendo 5 casos classificados como 3+, dentre eles 1 caso estava amplificado pelo cálculo da razão e 4 casos apresentaram um ganho no número de cópias do EGFR. Dos 5 casos classificados como 2+, 3 casos apresentaram um ganho no número de cópias do EGFR. O estudo relatou que a expressão e amplificação alterada do EGFR se relacionaram a um pior prognóstico (p=0,015).

A pesquisa realizada em 2017 por Peraldo-Neia e colaboradores⁷⁷ investigou o papel prognóstico e preditivo das alterações da via do EGFR de 89 pacientes com câncer na via biliar tratados com anti-EGFR e quimioterapia. O status da amplificação do EGFR

foi estudada em 37 tumores através da sonda LSI *EGFR/CEP7* (Vysis, Abbott Laboratories, USA), os casos com ≥ 4 cópias de *EGFR* ou amplificação genética em $\geq 40\%$ das células tumorais foram classificados como FISH positivo. A análise revelou que 19 (51,4%) casos apresentaram amplificação do *EGFR*, sendo distribuídos nas seguintes topografias, 9 intra-hepáticos, 5 extra-hepáticos e 5 na vesícula biliar. Os autores descreveram que a amplificação do *EGFR* não afetou a sobrevida do paciente.

Algumas semelhanças e diferenças entre o nosso estudo e dos demais autores citados puderam ser observadas, a começar pela composição e classificação da casuística. A nossa série foi composta apenas por amostras de ressecções cirúrgicas (74 casos), assim como as casuísticas de Yoshikawa⁷² (236 casos), Shafizadeh⁷⁴ (45 casos), e Jung⁷⁶ (84 casos), diferentemente das amostras selecionadas por Yang⁷⁵ (175 casos) e Harder⁷³ (124 casos), que incluíram amostras de biópsias nas suas coortes, já na pesquisa de Peraldo-Neia⁷⁷ (89 casos) o tipo de amostra não foi informada. Harder⁷³ e Shafizadeh⁷⁴ também incluíram os tumores da vesícula biliar nas suas casuísticas. O nosso tamanho amostral foi mais parecido com os de Jung⁷⁶ e Peraldo-Neia⁷⁷. Todos os autores classificaram o CC com base na topografia acometida, basicamente os casos foram divididos em intra e extra-hepáticos, com exceção da série de Jung⁷⁶ que só incluiu CC extra-hepáticos, e esse é um grande ponto de diferença em relação ao nosso estudo, que além da classificação topográfica e macroscópica os subtipos histológicos foram usados para caracterizar o CC e também para correlacioná-los a expressão e amplificação do *EGFR*.

Em relação ao estudo molecular, nossa pesquisa utilizou as técnicas de IHQ e FISH para avaliar o status da expressão e amplificação do *EGFR*, métodos também escolhidos por Shafizadeh⁷⁴, Yang⁷⁵ e Jung⁷⁶. Yoshikawa⁷² e Harder⁷³ estudaram apenas a expressão do *EGFR* através da IHQ, e Peraldo-Neia⁷⁷ utilizou a técnica de FISH para avaliar a amplificação do gene, além do sequenciamento para pesquisa de mutações.

Os resultados obtidos através da análise da expressão do *EGFR* foram heterogêneos, onde a expressão do *EGFR* nos trabalhos citados variou entre 11,9% e 80%. Tais achados se devem provavelmente a escolha de diferentes clones utilizados na técnica de IHQ. Outro fator que pode explicar essa variabilidade são as diferentes metodologias adotadas na interpretação dos resultados. A expressão do *EGFR* apresentada por Shafizadeh⁷⁴ foi similar à nossa (cerca de 80%), sendo que nesse estudo

foi feita a utilização do mesmo clone de anticorpo primário (2-18C9), mas diferentemente da nossa pesquisa os casos 1+ foram também considerados positivos. Harder⁷³ também utilizou o mesmo clone, porém a expressão estava presente em (60,7%) dos casos. A expressão do EGFR descrita por Jung⁷⁶ (11,9%) foi a que mais diferiu do nosso trabalho (80,2%), o que talvez possa ser explicado pelo uso de kits de IHQ diferentes e ainda devido a casuística do trabalho citado contemplar apenas casos extra-hepáticos. Nosso estudo incluiu além da topografia extra-hepática, casos intra-hepáticos e peri-hilares. A intensidade 2+ foi a mais frequente em todos os estudos, e a topografia não se correlacionou com a expressão do EGFR em nenhum dos trabalhos, incluindo o nosso.

No estudo da amplificação do EGFR por FISH foram observadas algumas diferenças nas metodologias adotadas, incluindo as sondas utilizadas e a forma pela qual os resultados foram interpretados. Um ponto em comum de todos os trabalhos foi a disponibilidade apenas parcial de material adequado para a realização da técnica. Nas pesquisas conduzidas por Shafizadeh⁷⁴, Yang⁷⁵, Jung⁷⁶ e Peraldo-Neia⁷⁷ os fatores pré-analíticos impediram que a reação fosse realizada em parte dos casos. Esses fatores também foram sentidos na nossa análise, impactando os resultados. Os autores tentaram correlacionar os achados da amplificação do EGFR com a topografia acometida pela lesão, enquanto no nosso estudo essa relação foi realizada com os subtipos histológicos.

Nos diversos estudos a amplificação do EGFR estava presente em uma baixa frequência: Shafizadeh⁷⁴ (2,7%), Yang⁷⁵ (2,3%) e Jung⁷⁶ (4,7%). A única exceção foi o estudo liderado por Peraldo-Neia⁷⁷ (51,4%), onde essa diferença provavelmente ocorreu pelos parâmetros adotados no momento de classificar os casos amplificados *versus* os casos negativos. Shafizadeh⁷⁴ observou um aumento no número de cópias do EGFR em (45,9%) dos casos, porém classificou apenas um caso como amplificado, já que os demais casos apresentaram polissomia do cromossomo 7. Na série de Jung⁷⁶, se todos os casos que apresentaram polissomias fossem considerados positivos, a amplificação do EGFR estaria presente em 38%. No estudo de Peraldo-Neia⁷⁷ não fica clara a justificativa para a amplificação estar presente em mais da metade dos casos avaliados.

De maneira geral, a amplificação do EGFR no CC parece ser um fenômeno mais raro quando comparado ao status da expressão, dados esses observados em todos os trabalhos que utilizaram o mesmo desenho de estudo. Outra semelhança é que o EGFR

não se relacionou à topografia da neoplasia e tampouco às demais variáveis anatomopatológicas estudadas nessas pesquisas. Não encontramos uma relação entre a expressão e amplificação do EGFR, diferentemente de Yang⁷⁵ e Jung⁷⁶. Comparando todos os estudos foi possível notar que não existe uma padronização de técnica e tampouco de interpretação quanto ao status do EGFR em CC, as pesquisas são heterogêneas, com diferentes critérios de positividade e variações de metodologia e resultados. A escassa literatura e a falta de um consenso para classificação resultam nos diferentes achados apresentados aqui.

5.2 Subtipos histológicos do CC

Até há algum tempo o CC era apenas classificado de acordo com o seu acometimento nas diferentes topografias da árvore biliar e a sua classificação histológica se restringia em classificá-lo em adenocarcinoma e variantes raras. Mais recentemente houve um interesse crescente nessa neoplasia e os estudos foram desenvolvendo diferentes propostas de subclassificação. Porém, a padronização histológica do CC ainda é desafiadora, muito provavelmente por ser uma neoplasia rara, heterogênea e frequentemente apresentar fenótipos diferentes dentro do mesmo tumor.

A classificação histológica do presente estudo foi baseada na morfologia das células tumorais. Os casos que apresentaram semelhança ao ducto biliar não neoplásico com núcleos polarizados em direção a base da célula, com citoplasma abundante e polarizado em direção ao lúmen, com aparente produção de mucina, foram classificados como colangiocarcinoma subtipo grandes ductos. Os casos que apresentaram morfologia em forma de cordões e padrão anastomosante, ausência de polarização nuclear, citoplasma escasso, escassa produção de mucina e por vezes com aspectos de letras chinesas foram classificados como colangiocarcinoma subtipo colangiolo carcinoma. Os casos que apresentaram células com fenótipo entre hepatócitos e colangiócitos, sem lúmen, escasso citoplasma e células em meio ao estroma fibroso, foram classificados como células intermediárias. Os casos que apresentaram fenótipo de projeções papilares crescendo para dentro do lúmen do ducto dilatado, podendo apresentar epitélio do tipo biliar, gástrico ou intestinal, foram classificados como colangiocarcinoma subtipo papilífero.

Nakanuma e colaboradores⁶ propuseram uma subclassificação para o CC intra-hepático e extra-hepático (incluindo o peri-hilar dentro do polo intra-hepático) em vários subtipos histológicos: subtipo convencional (grandes ductos e pequenos ductos), subtipo ductular, variante mal formação de placa ductal, neoplasia papilífera intraductal, neoplasia tubular intraductal, tipo disseminação superficial e variantes raras. Em 2018 Nakanuma⁷⁸ participou de novos estudos sobre carcinoma combinado, onde o subtipo células intermediárias foi proposto. Embora Nakanuma seja possivelmente hoje o patologista que mais intensamente estuda CC e um dos autores dos capítulos da classificação da OMS, nem todos esses subtipos foram contemplados dentro da classificação oficial.

A última edição da OMS⁷⁹ de 2019, classifica o CC em subtipos de grandes ductos e de pequenos ductos. Dentro do polo pequenos ductos existe outra subclassificação, incluindo colangiocarcinoma (componente ductular acima de 80%), padrão mal formação de placa e subtipos raros. O carcinoma de células intermediárias, originalmente um subtipo de colangiocarcinoma, agora aparece no capítulo de tumores combinados (apesar de não ser um tumor bifásico conforme o próprio capítulo propõe que esses tumores sejam e de apresentar um imunofenótipo claramente biliar). O próprio Nakanuma continua considerando este tumor como um subtipo de colangiocarcinoma em suas publicações.⁶ No polo extra-hepático está a neoplasia papilífera intraductal, onde é subdividida entre tipo I e tipo II e deve obedecer ao critério das papilas serem maiores do que 3mm, e de onde importante parte dos colangiocarcinomas se originam, especialmente no oriente.⁷⁹

Jesus Banales e colaboradores⁷, em um consenso europeu de 2020, reconhece a classificação histológica do CC intra-hepático como grandes ductos e pequenos ductos, citando sem muito aprofundamento o colangiocarcinoma e os demais subtipos histológicos.

No nosso entendimento, a classificação histológica do colangiocarcinoma está ainda em desenvolvimento, especialmente no subtipo pequenos ductos. No nosso estudo reconhecemos o subtipo pequenos ductos e colangiocarcinoma como sendo a mesma entidade, e parte dos casos realmente apresentam um marcante padrão do fenótipo mal formação de placa ductal. O subtipo de células intermediárias reconhecemos como um CC intra-hepático que pode ser identificado pela imuno-histoquímica.

5.3 Aspectos anatomopatológicos

No nosso estudo foi possível observar uma relação entre a topografia, o padrão de crescimento e o subtipo histológico ($p=0,01$). As neoplasias localizadas na região intra-hepática apresentaram predominantemente padrão de crescimento formador de massa e o subtipo mais presente foi o colangiocarcinoma. Mesmo assim, 2 dos 14 casos de tumores intra-hepáticos correspondiam a colangiocarcinoma de grandes ductos, e 3 ao subtipo células intermediárias. As neoplasias localizadas na topografia peri-hilar revelaram um padrão de crescimento infiltrativo periductal, sendo o subtipo grandes ductos o mais observado. Ainda assim, 11 dos 40 casos de tumores peri-hilares correspondiam a outros subtipos: 7 colangiocarcinomas e 4 papilíferos. Por fim, as neoplasias que acometeram a topografia extra-hepática foi mais associada ao padrão de crescimento infiltrativo periductal e ao subtipo grandes ductos. O subtipo papilífero apresentou um padrão de crescimento na sua maioria intraductal e acometeu os ductos peri-hilares e extra-hepáticos. O subtipo células intermediárias foi exclusivamente intra-hepático com padrão de crescimento formador de massa.

Komuta e colaboradores,²⁴ em um estudo dos diversos fenótipos do CC obteve uma casuística de 85 pacientes, 46 eram homens e 39 mulheres. Da casuística total, 14,5% eram peri-hilares e 83,5% intra-hepáticos. Dos casos intra-hepáticos 28,2% eram do subtipo colangiocarcinoma, 60,8% do subtipo que a autora chamou de produtores de mucina e 39,2% eram tumores combinados. Todos os colangiocarcinomas eram do tipo formador de massa e o subtipo grandes ductos apresentou o padrão formador de massa e infiltrativo periductal. Vinte por cento das neoplasias intra-hepáticas apresentaram tumores múltiplos.

Liau e colaboradores²⁵ realizaram um estudo para caracterização histológica, etiológica e molecular de 189 CC intra-hepáticos. Os CC foram classificados histologicamente como: ducto biliar 59,0% e colangiolar 41,0%, e o critério de exclusão foram os casos de carcinoma combinado. Da casuística total, 35 pacientes apresentaram padrão de crescimento intraductal e periductal e eram do subtipo ducto biliar, os outros 154 pacientes apresentaram padrão de crescimento formador de massa e metade eram do subtipo ducto biliar e a outra metade do subtipo colangiolar.

Comparando a nossa pesquisa com os estudos citados podemos observar alguns achados diferentes: ambos os estudos se restringiram a topografia intra-hepática e peri-

hilar, não incluíram o segmento extra-hepático como no nosso estudo; no estudo de Komuta²⁴ os hepatocolangiocarcinomas foram incluídos, mas essa entidade foi um critério de exclusão do nosso estudo. Ambos os autores utilizaram nomenclaturas diferentes quanto a classificação histológica. Komuta²⁴ utiliza a nomenclatura “produtores de mucina” para se referir ao subtipo grandes ductos, enquanto Liao²⁵ se refere ao subtipo grandes ductos como “ducto biliar” e o subtipo colangiolo carcinoma como “colangiolar”. Na nossa casuística a topografia mais frequente foi a peri-hilar (54,0%) e a menos frequente foi a intra-hepática (18,9%), enquanto no estudo de Komuta²⁴ foi observado o contrário. Isso também aconteceu se compararmos os tipos histológicos apenas da topografia intra-hepática, o subtipo mais presente da nossa pesquisa foi o colangiolo carcinoma com 64,2%, 21,4% do subtipo células intermediárias e 14,2% do subtipo grandes ductos, enquanto para Komuta²⁴ o colangiolo carcinoma apareceu numa frequência menor (28,2%) e o subtipo grandes ductos com 60,8 %. Outra diferença que chama a atenção é que na nossa casuística, até onde foi possível estudar, não observamos mais que uma lesão, já no estudo de Komuta²⁴ 20% dos tumores intra-hepáticos apresentaram múltiplos nódulos. As semelhanças que pudemos encontrar foi a maior incidência no sexo masculino e o padrão formador de massa sendo do subtipo colangiolo carcinoma. No estudo de Liao²⁵ o subtipo histológico mais presente foi o ducto biliar seguido do colangiocelular - isso também foi observado no nosso estudo, considerando que o subtipo ducto biliar equivale ao subtipo grandes ductos e o colangiocelular ao subtipo colangiolo carcinoma.

5.4 Aspectos etiológicos

Algumas doenças de base parecem ter um papel na carcinogênese do CC, um dos mecanismos pelo qual isso ocorre é através da inflamação crônica do ducto biliar. Dentre essas doenças podemos destacar a colangite esclerosante primária, a litíase intra-hepática, as infecções virais, a esteatose hepática e as mal formações da placa ductal. No presente estudo, todas essas doenças foram observadas com certa frequência - a colangite crônica (62,7%) e a mal formação de placa ductal (23,5%) foram as doenças mais frequentes.

Pacientes com colangite crônica possuem um alto risco para o desenvolvimento de CC, e alguns estudos apontam o CC como sendo a maior causa de mortalidade entre os pacientes com colangite crônica. A associação entre a colangite crônica e o CC possui incidência anual de 0,5% e 1,5%.⁸⁰ sendo no norte da Europa e nos Estados

Unidos a maior incidência já observada⁸¹. Boberg e colaboradores⁸² avaliaram a incidência de CC em 394 pacientes portadores de colangite esclerosante primária de 5 países europeus. O CC estava presente em 48 casos (12,2%) da casuística total, dentre estes 24 pacientes (50%) receberam o diagnóstico de CC após um ano do diagnóstico de colangite esclerosante primária.

Um aspecto importante que deve ser levado em consideração em relação a colangite crônica é o possível efeito secundário do tumor, ou seja, algumas vezes é a presença do tumor que provoca o quadro de colangite, isso ocorre devido ao efeito obstrutivo da lesão. A real relação entre as duas doenças é mais sustentada quando encontramos evidências histológicas da colangite crônica no tecido hepático distante da lesão.

As mal formações biliares são lesões histopatológicas compostas de pequenos ductos biliares irregulares ou que apresentam estruturas ductulares dilatadas. A doença de Caroli, a fibrose hepática congênita e os complexos de von Meyenburg são exemplos de entidades que caracterizadas por mal formações biliares.⁸³

Fahrner e colaboradores⁸⁴ realizaram uma revisão com 561 pacientes provenientes de 16 estudos que eram portadores da síndrome de Caroli ou da doença de Caroli, e a presença de CC nesses pacientes variou de 2,7% a 37,5% com incidência global de 6,6%.

O complexo de von Meyenburg é considerado uma lesão benigna, porém parece estar associado a um potencial de malignidade para o desenvolvimento do CC. Bhalla e colaboradores⁸⁵ revisaram 86 amostras de hepatectomias com diagnóstico de CC. Em 35% dos casos havia aparentemente uma progressão neoplásica do complexo de von Meyenburg, apresentando displasia do epitélio biliar e posteriormente evoluindo para o CC.

Embora a litíase intra-hepática seja considerada uma doença benigna, ela causa episódios recorrentes de colangite pela obstrução das vias biliares causada pelos cálculos, sendo considerada um fator de risco para o desenvolvimento do CC. Su e colaboradores⁸⁶ realizaram uma pesquisa que acompanhou 816 pacientes com litíase intra-hepática, onde 33 pacientes desenvolveram CC devido à presença de cálculos nas vias biliares.

A relação entre a esteatose hepática e o CC ainda não é compreendida, Wongiarupong e colaboradores⁸⁷ realizaram uma meta-análise incluindo sete estudos caso-controle com uma casuística total de 9.102 pacientes com CC e 129.111 pacientes no grupo controle, onde foi observado que a presença de esteatose hepática aumentou o risco para o desenvolvimento de CC com um OR de 1,95, quando classificada por subtipos, a esteatose foi associada tanto ao CC intra-hepático quanto ao CC extra-hepático, com OR de 2,22.

Outra doença de base que ainda não se sabe exatamente o mecanismo pelo qual ocorre o desenvolvimento do CC é a hepatite viral. A relação entre o HBV e o HCV é bem conhecida no CHC, porém no CC esta relação ainda é conflitante na literatura. Matsumoto e colaboradores⁸⁸ realizaram um estudo com 145 japoneses para revelar a prevalência do HBV e do HCV no CC intra-hepático e extra-hepático. A prevalência geral do HBV foi entre 0,8 e 2,2%, já a prevalência do HCV foi entre 1% e 2%. O estudo também comparou a prevalência entre as topografias, o CC intra-hepático apresentou uma prevalência de 10% para o HBV e 20% para HCV, o CC extra-hepático apresentou uma prevalência de 4,2% para o HBV e 7,4% para HCV.

Apesar dos estudos citados serem diferentes metodologicamente em relação ao nosso, todos de maneira geral observaram uma relação entre as doenças de base e o desenvolvimento do CC. Até onde foi possível pesquisar, não foram encontrados na literatura nenhum estudo que tenha analisado as doenças de base em relação aos subtipos histológicos e ao EGFR.

5.5 Outros aspectos moleculares

O presente estudo utilizou os marcadores MUC1, MUC2, MUC5AC, MUC6, Arginase, Hep-par, CD133, CD56, Vimentina, B-catenina e E-caderina para caracterizar o perfil molecular dos diferentes subtipos histológicos do CC, feito através da expressão proteica detectada pela técnica de imuno-histoquímica. Em tumores agressivos e heterogêneos como é o caso do CC, é importante a existência de marcadores que contribuam com o diagnóstico e manejo do tumor, no CC isso ainda é um desafio.

Park e colaboradores³⁸ conduziram uma pesquisa com o objetivo de determinar a relação da expressão das mucinas MUC1, MUC2, MUC5AC e MUC6 com o prognóstico do CC, verificando se esses achados são uteis para diferenciar o CC do

adenocarcinoma de pâncreas e da vesícula biliar. A técnica de imuno-histoquímica foi realizada em 85 espécimes com diagnóstico de CC, divididos em 34 casos intra-hepáticos e 51 casos extra-hepáticos, além de 14 casos de adenocarcinoma pancreático e 11 casos de adenocarcinoma da vesícula biliar. A positividade dos diferentes marcadores foi variada no colangiocarcinoma, sendo MUC1 (65,8%), MUC5AC (61,1%), MUC2 (23,5%) e MUC6 (14,1%). Os autores constataram que a expressão de MUC1 estava relacionada à progressão tumoral e uma pior sobrevida, diferentemente das demais mucinas estudadas. Não houve diferença significativa entre os padrões de expressão das mucinas do CC com os tumores do pâncreas e da vesícula biliar. No nosso estudo a frequência relativa de expressão das mucinas foi similar, apesar de mais alta para a maior parte destes marcadores - MUC1 (93,2%) e MUC5AC (43,7%) foram as mais expressas, seguidas por MUC6 (30,5%) e MUC2 (15,2%). Adicionalmente, avaliamos a expressão das mucinas nos diferentes tipos histológicos do CC e relacionamos essa distribuição com a expressão e amplificação do EGFR.

Na prática de um laboratório de Anatomia Patológica, algumas vezes é necessário algum marcador que ajude a diferenciar o CHC do CC intra-hepático, desafio encontrado principalmente nos casos de pequenas biópsias por agulha, utilizadas rotineiramente. Com base nisso, Radwan e colaboradores⁴⁰ realizaram um estudo comparando os marcadores Hep-par e Arginase, a fim de responder qual deles é o mais indicado para essa diferenciação, já que se espera que ambos sejam expressos no CHC, pois eles são positivos nos hepatócitos e negativos no epitélio biliar. A imuno-histoquímica foi realizada em 50 casos de CHC, 38 casos de carcinomas metastáticos de locais variados do fígado, 12 casos de CC e 10 espécimes de tecidos hepáticos normais. Nos casos de CHC, a Arginase demonstrou imunorreatividade em 84%, contra 70% no marcador Hep-Par. Apenas 2,6% casos de carcinoma metastático e 8,3% casos de CC apresentaram imunorreatividade positiva para Arginase. Em contraste, a imunorreatividade para Hep-Par foi detectada em 15,8% dos casos de carcinoma metastático e em 16,7% dos casos de CC. Os autores concluíram que a Arginase tem maior sensibilidade e especificidade do que a Hep-Par para o diagnóstico de CHC. Na nossa casuística, composta exclusivamente por casos de CC, obtivemos resultados bastante semelhantes, já que a positividade encontrada foi de 17% para Hep-Par e 7,3% para Arginase.

Um estudo conduzido por Leelawat e colaboradores⁴² pesquisou o papel do CD133 na progressão do CC. A reação imuno-histoquímica foi realizada em 34 espécimes, a expressão de CD133 foi observada em 67,6% dos casos. Os autores detectaram que a expressão de CD133 associou-se significativamente com metástase nodal e status positivo da margem cirúrgica, concluindo que o CD133 pode ser um potencial fator prognóstico do colangiocarcinoma. Na nossa pesquisa o CD133 demonstrou positividade em apenas 25,3% dos 67 casos pesquisados. Como em nossos casos o CD133 foi mais positivo no subtipo histológico colangiocarcinoma (46,7%) (7/15), é possível que a casuística de Leelawat e colaboradores⁴² tenha maior proporção desse subtipo histológico, mas de fato a subclassificação não foi mencionada no estudo.

Gütgemann e colaboradores⁴³ examinaram a expressão de CD56 em 98 tumores provenientes da árvore biliar, sendo que 32 casos eram CC. O estudo por imuno-histoquímica revelou que 12,5% dos casos de CC foram positivos para CD56. Para os autores o CD56 pode ser usado para diferenciar proliferações intra-hepáticas não neoplásicas de neoplásicas, o que é uma ferramenta diagnóstica útil em biópsias hepáticas pequenas. Nos nossos casos, o CD56 apresentou positividade em 11,5%, resultado muito semelhante à pesquisa de Gütgemann e colaboradores⁴³ (12,5%).

Korita e colaboradores⁴⁴ realizaram um estudo para verificar o valor prognóstico da expressão de vimentina em 21 pacientes com CC intra-hepático. A imuno-histoquímica demonstrou que 23,8% dos casos eram positivos para vimentina. Para os autores, a expressão positiva afetou negativamente a sobrevida. A expressão de vimentina da nossa pesquisa (21,8%) foi semelhante ao estudo citado, e estava correlacionada ao subtipo histológico colangiocarcinoma.

Fujikura e colaboradores⁴⁶ conduziram um estudo pesquisando a via Wnt/B-catenina através das técnicas de sequenciamento e imuno-histoquímica, com o objetivo de elucidar o perfil genético de 28 neoplasias papilares biliares. O estudo revelou mutações nos genes APC e CTNNB1, ambos pertencentes à via Wnt/B-catenina. Na imuno-histoquímica, a expressão citoplasmática e/ou nuclear da B-catenina foi encontrada 79% dos casos. Este estudo demonstrou mutações recorrentes nos genes APC e CTNNB1, sugerindo que a ativação da via de sinalização Wnt/B-catenina é relevante para o desenvolvimento e progressão das neoplasias papilares biliares. No

nosso estudo utilizamos apenas a técnica de imuno-histoquímica para detecção da mutação da B-catenina e consideramos apenas a marcação nuclear, que foi de 4,8%.

Endo e colaboradores⁴⁷ realizaram uma pesquisa que investigou a presença de mutações no gene E-caderina e a expressão proteica através da técnica de imuno-histoquímica em 34 casos de CC intra-hepáticos. A mutação da E-caderina estava presente em 11,8% dos casos, e os mesmos casos mutados também apresentaram perda da expressão na imuno-histoquímica. A pesquisa demonstrou que as mutações do gene E-caderina correlacionaram-se significativamente com a perda da expressão da proteína E-caderina. Segundo os autores, esses achados estão associados à redução da adesividade celular. Na nossa avaliação a perda da expressão da E-caderina estava presente em apenas 4,8% dos 63 casos estudados.

6. CONCLUSÕES

- O nível de expressão imuno-histoquímica de EGFR na membrana de células tumorais é alto em todos os subtipos histológicos aqui estudados de colangiocarcinoma. Já a amplificação do EGFR, evidenciada por FISH, ocorreu em pequena parcela dos casos do subtipo grandes ductos e colangiocarcinoma. Não houve uma clara correlação entre o padrão de expressão imuno-histoquímica da proteína e a amplificação do gene. Estes achados são importantes pois indicam um possível alvo terapêutico nesse pequeno número de casos, a serem testados diretamente por FISH.
- Não houve correlação da expressão imuno-histoquímica e da amplificação do EGFR com os achados clínicos, etiológicos ou anatomopatológicos.
- Não houve correlação da expressão imuno-histoquímica e da amplificação do EGFR com os diversos marcadores imuno-histoquímicos usados para caracterizar o colangiocarcinoma.

7. REFERÊNCIAS

1. Maroni L, Haibo B, Ray D, Zhou T, Wan Y, Meng F, Marzioni M, Alpini G. Functional and Structural Features of Cholangiocytes in Health and Disease. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2015 Jul 1;1 (4): 368-380.
2. Roskams T, Desmet V. Embryology of extra-and intrahepatic bile ducts, the ductal plate. *Anat Rec (Hoboken)*. 2008 Jun;291(6):628-35.
3. Kendall T, Verheij J, Gaudio E, Evert M, Guido M, Goeppert B, Carpino G. Anatomical, histomorphological and classification of molecular cholangiocarcinoma. *Liver Int*. 2019 May;39 Suppl 1:7-18.
4. Crawford JM, Chen L. The liver and the tract biliary. 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.
5. Nakanuma Y, Hosono M, Sanzen T, Sasaki M. Microstructure and development of the normal and pathologic biliary tract in humans, including blood supply. *Microsc Res Tech* 1997;38: 552–570.
6. Nakanuma Y, Kakuda Y. Pathologic classification of cholangiocarcinoma: New concepts. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2015; 29:277-293.
7. Banales JM, Cardinale V, Carpino G, Marzioni M, Andersen JB, Invernizzi P, Lind GE, Folseraas T, Forbes SJ, Fouassier L, Geier A, Calvisi DF, Mertens JC, Trauner M, Benedetti A, Maroni L, Vaquero J, Macias RI, Raggi C, Perugorria MJ, Gaudio E, Boberg KM, Marin JJ, Alvaro D. Expert consensus document: Cholangiocarcinoma: current knowledge and future perspectives consensus statement from the European Network for the Study of Cholangiocarcinoma (ENS-CCA). *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 2020 Sep;17(9):557-588.
8. Fitzmaurice C, Dicker D, Pain A, Hamavid H, Moradi-Lakeh M, MacIntyre MF, Allen C. Global Burden of Disease Cancer Collaboration. The global burden of cancer 2013. *JAMA Oncol*. 2015 Jul;1(4):505-27.
9. Bridgewater J, Galle PR, Khan SA, Llovet JM, Park JW, Patel T, Pawlik TM, Gores GJ. Guidelines for the diagnosis and management of intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol*. 2014 Jun;60(6):1268-89.

10. Cardinale V, Semeraro R, Torrice A, Gatto M, Napoli C, Bragazzi MC, Gentile R, Alvaro D. Intra-hepatic and extra-hepatic cholangiocarcinoma: new insight into epidemiology and risk factors. *World J Gastrointest Oncol.* 2010 Nov 15;2(11):407-16.
11. Plentz RR, Malek NP. Clinical presentation, risk factors and staging systems of cholangiocarcinoma. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 2015 Abr;29(2):245-52.
12. Henley SJ, Weir HK, Jim MA, Watson M, Richardson LC. Gallbladder Cancer Incidence and Mortality, United States 1999-2011. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology.* 2015;24(9):1319-26.
13. Kobayashi M, Ikeda K, Saitoh S, Suzuki F, Tsubota A, Suzuki Y, Arase Y, Murashima N, Chayama K, Kumada H. Incidence of primary cholangiocellular carcinoma of the liver in Japanese patients with hepatitis C virus-related cirrhosis. *Cancer* 2000 Jun 1;88(11):2471-7.
14. Lee TY, Lee SS, Jung SW, Jeon SH, Yun SC, Oh HC, Kwon S, Lee SK, Seo DW, Kim MH, Suh DJ. Hepatitis B virus infection and intrahepatic cholangiocarcinoma in Korea: a case-control study. *Sou J Gastroenterol.* 2008 Jul;103(7):1716-20.
15. Burak K, Angulo P, Pasha TM, Egan K, Petz J, Lindor KD. Incidence and risk factors for cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis. *Sou J Gastroenterol.* 2004 Mar;99(3):523-6.
16. Carpio G, Cardinale V, Renzi A, Hov JR, Berloco PB, Rossi M, Karlsen TH, Alvaro D, Gaudio E. Activation of biliary tree stem cells within peribiliary glands in primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol.* 2015 Nov;63(5):1220-8.
17. Nakanuma Y, Terada T, Ohta G, Kurachi M. Caroli's disease in congenital hepatic fibrosis and infantile polycystic disease. *Liver.* 1982 Dez;2(4):346-54.
18. Mori T, Suzuki Y, Abe N, Sugiyama M, Atomi Y. Epidemiology of hepatolithiasis in Japan. *Tan to Sui.* 2007; 28:479-82.
19. Grainge MJ, West J, Solaymani-Dodaran M, Aithal GP, Card TR. The antecedents of biliary cancer: a primary care case-control study in the United Kingdom. *Br. J. Cancer.* 2009;100: 178-180.

20. Welzel TM, Graubard BI, Zeuzem S, El-Serag HB, Davila JA, McGlynn KA. Metabolic syndrome increases the risk of primary liver cancer in the United States: a study in the SEER-Medicare database. *Hepatology*. 2011;54, 463–471.
21. Nakanuma Y, Kida T, Minato H, Terada T. Pathology of cholangiocellular carcinoma. In: Primary liver cancer in Japan. Tobe T, Kameda H, Okudaira M, Ohto M, Endo Y, Mito M, Okamoto E, Tanikawa K, Kojiro M, editors. Springer-Verlag: Tokyo, 1992: 39-50.
22. Nakanuma Y, Curado MP, Franceschi S, Gores G, Paradis V, Sripa B. Intrahepatic cholangiocarcinoma. In: Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND eds. WHO Classification of tumours of the digestive system. IARC: Lyon, 2010. pp: 217-224.
23. Komuta M, Spree B, Vander Borgh S, De Vos R, Verslype C, Aerts R, Yano H, Suzuki T, Matsuda M, Fujii H, Desmet VJ, Kojiro M, Roskams T. Clinicopathological study on cholangiocarcinoma suggesting hepatic progenitor cell origin. *Hepatology* 2008; 47: 1544-1556.
24. Komuta M, Govaere O, Vandecaveye V. Histological diversity in cholangiocellular carcinoma reflects the different cholangiocyte phenotypes. *Hepatology* 2012; 55(6): 1876-88.
25. Liao J Y, Tsai J H, Yuan R H, Chang C N, Lee H J, Jeng Y M. Morphological subclassification of intrahepatic cholangiocarcinoma: etiological, clinicopathological, and molecular features. *Modern pathology* 2014; 27(8): 1163-73.
26. Kozaka K, Sasaki M, Fujii T, Harada K, Zen Y, Sato Y, Sawada S, Minato H, Matsui O, Nakanuma Y. A subgroup of intrahepatic cholangiocarcinoma with an infiltrating replacement growth pattern and a resemblance to reactive proliferating bile ductules: 'bile ductular carcinoma'. *Histopathology* 2007;51: 390-400.
27. Komuta M, Spree B, Vander Borgh S, De Vos R, Verslype C, Aerts R, Yano H, Suzuki T, Matsuda M, Fujii H, Desmet VJ, Kojiro M, Roskams T. Clinicopathological study on cholangiocarcinoma suggesting hepatic progenitor cell origin. *Hepatology* 2008; 47: 1544-1556.
28. Sato Y, Sasaki M, Harada K, Aishima S, Fukusato T, Ojima H, Kanai Y, Kage M, Nakanuma Y, Tsubouchi H. Pathological diagnosis of flat epithelial lesions

- of the biliary tract with emphasis on biliary intraepithelial neoplasia. *J Gastroenterol.* 2014 Jan;49(1):64-72.
29. Patel T, Singh P. Cholangiocarcinoma: emerging approaches to a challenging cancer. *Curr Opin Gastroenterol.* 2007;23(3):317-23.
 30. Davidson BR, Gurusamy K. Is preoperative histological diagnosis necessary for cholangiocarcinoma? *HPB (Oxford).* 2008;10(2):94-7.
 31. Ho J, Curley SA. Diagnosis and Management of intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer Treat Res.* 2016; 168:121-63.
 32. Oliveira IS, Kilcoyne A, Everret JM, Mino-Kenudson M, Harisinghani MG, Ganesan K. Cholangiocarcinoma: classification, diagnosis, staging, imaging features, and management. *Abdom Radiol (NY).* 2017;42(6):1637-49.
 33. Nagino M, Ebata T, Yokoyama Y, Igami T, Sugawara G, Takahashi Y, Nimura Y. Evolution of surgical treatment for perihilar cholangiocarcinoma: a single-center 34-year review of 574 consecutive resections. *Ann. Surg.* 2013 Jul;258(1):129-40.
 34. Rosen CB, Heimbach JK, Gores GJ. Liver transplantation for cholangiocarcinoma. *Transpl. Int.* 2010 Jul;23(7):692-7.
 35. Friman S, Foss A, Isoniemi H, Olausson M, Höckerstedt K, Yamamoto S, Karlsen TH, Rizell M, Ericzon BG. Liver transplantation for cholangiocarcinoma: selection is essential for acceptable results. *Scand. J. Gastroenterol.* 2011 Mar;46(3):370-5.
 36. Darwish Murad S, Kim WR, Harnois DM, Douglas DD, Burton J, Kulik LM, Botha JF, Mezrich JD, Chapman WC, Schwartz JJ, Hong JC, Emond JC, Jeon H, Rosen CB, Gores GJ, Heimbach JK. Efficacy of neoadjuvant chemoradiation, followed by liver transplantation, for perihilar cholangiocarcinoma at 12 US centers. *Gastroenterology.* 2012 Jul;143(1):88-98.
 37. 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. 1982 Nov;31(1):11-24.
 38. Park Sy, Roh SJ, Kim YN, Kim SZ, Park HS, Jang KY. Expression of MUC1, MUC2, MUC5AC and MUC6 in cholangiocarcinoma: prognostic impact. *Oncol Rep.* 2009;22(3): 649-57.
 39. Higashi M, Yonezawa S, Ho JJ, Tanaka S, Irimura T, Kim YS. Expression of MUC1 and MUC2 mucin antigens in intrahepatic bile duct tumors: its

- relationship with a new morphological classification of cholangiocarcinoma. *Hepatology*. 1999;30(6):1347-55.
40. Radwan N, Ahmed NS. The diagnostic value of Arginase-1 immunostaining in differentiating hepatocellular carcinoma from metastatic carcinoma and cholangiocarcinoma as compared to Hep-Par1. *Diagn Pathol*. 2012 Oct 30;7(1):149.
 41. Lau SK, Prakash S, Geller SA, Alsabeh R. Comparative immunohistochemical profile of hepatocellular carcinoma, cholangiocarcinoma, and metastatic adenocarcinoma. *Hum Pathol*. 2002 Dez;33(12):1175-81.
 42. Leelawat K, Thongtawee T, Narong S, Subwongcharoen S, Treepongkaruna SA. Strong expression of CD133 is associated with increased cholangiocarcinoma progression. *World J. Gastroenterol*. 2011 Mar 7;17(9):1192-8.
 43. Gütgemann I, Haas S, Berg JP, Zhou H, Büttner R, Fischer HP. CD56 expression aids in the differential diagnosis of cholangiocarcinomas and benign cholangiocellular lesions. *Virchows Arch*. 2006 Abr;448(4):407-11.
 44. Korita PV, Wakai T, Ajioka Y, Inoue M, Takamura M, Shirai Y, Hatakeyama K. Aberrant Expression of Vimentin Correlates with Dedifferentiation and Poor Prognosis in Patients with Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Anticancer Reserarch*. 2010 Jun;30(6):2279-85.
 45. Boulter L, Guest RV, Kendall TJ, Wilson DH, Wojtacha D, Robson AJ, Ridgway RA, Samuel K, Van Rooijen N, Barry ST, Wigmore SJ, Sansom OJ, Forbes SJ. WNT signaling drives cholangiocarcinoma growth and can be pharmacologically inhibited. *J. Clin. Invest*. 2015 Mar 2;125(3):1269-85.
 46. Fujikura K, Akita M, Ajiki T, Fukumoto T, Itoh T, Zen Y. Recurrent mutations in APC and CTNNB1 and activated Wnt/ β -catenin signaling in intraductal papillary neoplasms of the bile duct. *Am J Surg Pathol*. 2018 Dez;42(12):1674-1685.
 47. Endo K, Ashida K, Miyake N, Terada T. E-cadherin gene mutations in human intrahepatic cholangiocarcinoma. *Journal of Pathology*. 2001 Mar;193(3):310-7.
 48. Nakamura H, Arai Y, Totoki Y, Shirota T, Elzawahry A, Kato M, Hama N, Hosoda F, Urushidate T, Ohashi S, Hiraoka N, Ojima H, Shimada K, Okusaka T, Kosuge T, Miyagawa S, Shibata T. Genomic spectra of biliary tract cancer. *Nat. Genet*. 2015 Set;47(9):1003-10.

49. Borad MJ, Campeão MD, Egan JB, Liang WS, Fonseca R, Bryce AH. Integrated genomic characterization reveals novel, therapeutically relevant drug targets in FGFR and EGFR pathways in sporadic intrahepatic cholangiocarcinoma. *PLoS Genet.* 2014.
50. Jiao Y, Pawlik TM, Anders RA, Selaru FM, Streppel MM, Lucas DJ. Exome sequencing identifies frequent inactivating mutations in BAP1, ARID1A and PBRM1 in intrahepatic cholangiocarcinomas. *Nat. Genet.* 2013 Dez;45(12):1470-1473.
51. Lui VW, Grandis JR. EGFR-mediated cell cycle regulation. *Anticancer research.* 2002; 22:1–11.
52. Herbst RS. Review of epidermal growth factor biology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004; 59:21-26
53. Riese DJ, Stern DF. Specificity within the EGF family/ ErbB receptor family signaling network. *Bioessays.* 1998; 20:41-8.
54. Wells A: EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 1999, 31(6):637–643.
55. Yarden Y: The EGFR family and its ligands in human cancer signaling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer.* 2001 Set;37 Suppl 4:S3-8.
56. Liu W, Wu X, Zhang W, Montenegro RC, Fackenthal DL, Spitz JA, Huff LM, Innocenti F, Das S, Cook EH Jr, Cox NJ, Bates SE, Ratain MJ: Relationship of EGFR mutations, expression, amplification, and polymorphisms to epidermal growth factor receptor inhibitors in NCI60 cell lines. *Clin Cancer Res* 2007, 13(22 Pt 1):6788–6795.
57. Sabbah DA, Hajjo R, Sweidan K. Review on epidermal growth factor receptor (EGFR) structure, signaling pathways, interactions, and recent updates of EGFR inhibitors. *Curr Top Med Chem.*2020;20(10):815-834.
58. Harrison PT, Vyse S, Huang PH. Rare epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in non-small cell lung cancer. *Semin Cancer Biol.* 2020 Abr; 61:167-179.
59. Santos G, Pastor F, Tsao M. EGFR mutations and small lung cancer. *Annu Rev Pathol.* 2011; 6:49-69.
60. Roskoski R. All molecule inhibitors targeting the EGFR/ErbB family of protein tyrosine kinases in human cancers. *Pharmacological Research.*2019; 139:395-411.

61. Chang P, Cheng M, Lee H. Preliminary Experience of Cetuximab in the Treatment of Advanced-Stage Biliary Tract Cancer. *kargermedical and scientific publishers* 2010; 01-02.
62. Aishima SI, Taguchi KI, Sugimachi K, Shimada M, Sugimachi K, Tsuneyoshi M C-erbB-2 and c-Met expression relates to cholangiocarcinogenesis and progression of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Histopathology*. 2002 Mar;40(3):269-78
63. Ito Y, Takeda T, Sasaki Y, Sakon M, Yamada T, Ishiguro S, Imaoka S, Tsujimoto M, Higashiyama S, Monden M, Matsuura N. Expression and clinical significance of the erbB family in intrahepatic cholangiocellular carcinoma. *Pathol Res Pract*. 2001;197(2):95-100.
64. Audrey C, Martine M, Tchanh H. EGF/EGFR axis contributes to the progression of cholangiocarcinoma through the induction of an epithelial-mesenchymal transition. *J Hepatology* 2014; 01-30.
65. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009; 139:871-890.
66. Jimme K. Wiggers, Anthony T, Bas Groot Koerkamp, Thomas M. Differences in immunohistochemical biomarkers between intra- and extrahepatic cholangiocarcinoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Gastroenterology Hepatology* 2014; 01-30
67. Yu-Ting Chang, Ming-Chu Chang, Kai-Wen Huang. Clinicopathological and prognostic significances of EGFR, KRAS and BRAF mutations in biliary tract carcinomas in Taiwan. *J Gastroenterology Hepatology* 2014; 29: 1119-1125.
68. Chang P, Cheng M, Lee H. Preliminary Experience of Cetuximab in the Treatment of Advanced-Stage Biliary Tract Cancer. *kargermedical and scientific publishers* 2010; 01-02.
69. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M., Schrami P., Leighton S., et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*. 1998;4(7):844-7.
70. Baraibar I, Mezquita L, Planchard D. Novel drugs targeting EGFR and HER2 exon 20 mutations in metastatic NSCLC. *Crit Rev Oncol Hemato*. 2020 Abr;148:102906.
71. Lin L, Sirohi D, Coleman J, Gulbahce H. American Society of Clinical Oncology/Faculty of American Pathologists 2018 Focused Update on Breast

- Cancer HER2 FISH Guidelines Results from a National Reference Laboratory. *Sou J Clin Pathol*. 2019 9.152(4):479-485.
72. Yoshikawa D, Ojima H, Iwasaki M, Hiraoka N, Kosuge T, Kasai S, Hirohashi S, Shibata T. Clinicopathological and prognostic significance of EGFR, VEGF, and HER2 expression in cholangiocarcinoma. *Br J Câncer*. 2008 Jan 29;98(2):418-25.
73. Harder J, Waiz O, Otto F, Geissler M, Olschewski M, Weinhold B, Blum HE, Schmitt-Graeff A, Opitz OG. EGFR and HER2 expression in advanced biliary tract cancer. *Mundo J Gastroenterol*. 2009 Set 28;15(36):4511-7.
74. Shafizadeh N, Grenert JP, Sahai V, Kakar S. Epidermal growth factor receptor and HER-2/neu status by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization in adenocarcinomas of the biliary tree and gallbladder. *Hum Pathol*. 2010 Apr;41(4):485-92.
75. Yang X, Wang W, Wang C, Wang L, Yang M, Qi M, Su H, Sun X, Liu Z, Zhang J, Qin X, Han B. Characterization of EGFR Family gene aberrations in cholangiocarcinoma. *Oncol Rep*. 2014 Ago;32(2):700-8.
76. Jung MJ, Woo CG, Lee S, Chin S, Kim HK, Kwak JJ, Koh ES, Lee B, Jang KT, Moon A. Gene copy number variation and protein overexpression of EGFR and HER2 in distal extrahepatic cholangiocarcinoma. *Pathology*. 2017 Oct;49(6):582-588.
77. Peraldo-Neia C, Cavalloni G, Fenocchio E, Cagnazzo C, Gammaitoni L, Cereda S, Nasti G, Satolli MA, Aprile G, Reni M, Avallone A, Spadi R, Venesio T, Martin V, Doglioni C, Frattini M, Aglietta M, Leone F. Prognostic and predictive role of EGFR pathway alterations in biliary cancer patients treated with chemotherapy and anti-EGFR. *PLos Um*. 2018 Jan 19;13(1):0191593.
78. Brunt E, Aishima S, Clavien PA, Fowler K, Goodman Z, Gores G, Gouw A, Kagen A, Klimstra D, Komuta M, Kondo F, Miksad R, Nakano M, Nakanuma Y. cHCC-CCA: Consensus terminology for primary liver carcinomas with both hepatocytic and cholangiocytic differentiation. *Hepatology*. 2018 Jul;68(1):113-126.
79. Nakanuma Y, Klimstra DS, Komuta M, Zen Y. WHO Classification of Tumours of the Digestive System, Five Edition. Intrahepatic Cholangiocarcinoma. 2019 256: 254-259.

80. Bergquist A, Ekblom A, Olsson R, Kornfeldt D, Lööf L, Danielsson A. Hepatic and extrahepatic malignancies in primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol*. 2002 Mar;36(3):321-7.
81. Okolicsanyi L, Fabris L, Viaggi S, Carulli N, Podda M, Ricci G. Primary sclerosing cholangitis: clinical presentation, natural history and prognostic variables: an Italian multicentre study. The Italian PSC Study Group. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1996 Jul;8(7):685-91.
82. Boberg KM, Bergquist A, Mitchell S, Pares A, Rosina F, Broomé U, Chapman R, Fausa O, Egeland T, Rocca G, Schrupf E. Cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis: risk factors and clinical presentation. *Scand J Gastroenterol*. 2002 Oct;37(10):1205-11.
83. Nakanuma Y, Tsutsui A, Ren XS, Harada K, Sato Y, Sasaki M. What are the precursor and early lesions of peripheral intrahepatic cholangiocarcinoma? *Int J Hepatol*. 2014;2014:805973.
84. Fahrner R, Dennler SGC, Dondorf F, Ardelt M, Rauchfuss F, Settmacher U. Liver resection and transplantation in Caroli disease and syndrome. *Journal of Visceral Surgery*. 2019 Abr;156(2):91-95.
85. Bhalla A, Mann SA, Chen S, Cummings OW, Lin J. Histopathological evidence of neoplastic progression of von Meyenburg complex to intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hum Pathol*. 2017 Set;67:217-224.
86. Su CH, Shyr YM, Lui WY, P'Eng FK. Hepatolithiasis associated with cholangiocarcinoma. *Frei J Surg*. 1997 Jul;84(7):969-73.
87. Wongjarupong N, Assavapongpaiboon B, Susantitaphong P, Cheungpasitporn W, Treeprasertsuk S, Rerknimitr R, Chaiteerakij R. Non-alcoholic fatty liver disease as a risk factor for cholangiocarcinoma: a systematic review and meta-analysis. *BMC Gastroenterol*. 2017 Dec 8;17(1):149.
88. Matsumoto K, Onoyama T, Kawata S, Takeda Y, Harada K, Ikebuchi Y, Ueki M, Miura N, Yashima K, Koda M, Sakamoto T, Endo M, Horie Y, Murawaki Y. Hepatitis B and C virus infection is a risk factor for the development of cholangiocarcinoma. *Intern Med*. 2014;53(7):651-4.

ANEXO

A. XXXII Congresso Brasileiro de Patologia, 2019

Modalidade: apresentação oral

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho

ANÁLISE DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DO RECEPTOR DE FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO (EGFR) E PERFIL MUTACIONAL NOS DIFERENTES TIPOS HISTOLÓGICOS DE COLANGIOCARCINOMA

dos autores: VANESSE MARIA DA COSTA; MARINA ALESSANDRA PEREIRA; ALINE RAMOS; RODRIGO PESSÔA; VENÂNCIO AVANCINI FERREIRA ALVES; EVANDRO SOBROZA DE MELLO, foi apresentado, na modalidade Categoria Apresentação Oral, no evento 32º Congresso Brasileiro de Patologia ocorrido de 02 a 05 de maio de 2019 no Centro de Eventos do Ceará em Fortaleza/CE.

Fortaleza, 05 de maio de 2019

Dr Clóvis
Clock
Presidente da
Sociedade Brasileira
de Patologia

Dr. Cleto
Nogueira
Presidente do 32º
Congresso Brasileiro de
Patologia

Dra. Katia Ramos
Moreira Leite
Presidente da Comissão
Científica do 32º
Congresso Brasileiro de
Patologia



B. XXXII Congresso Brasileiro de Patologia, 2019

Modalidade: poster

