

Expressão do receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR) em colangiocarcinomas: fatores preditivos e sobrevida

Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in cholangiocarcinomas: predictive factors and survival

RODRIGO VIEIRA GOMES¹; MICHELE ÂNGELA RODRIGUES²; JOÃO BERNARDO SANCIO ROCHA RODRIGUES, ACBC-MG¹; PAULA TEIXEIRA VIDIGAL³; KARINE ARAÚJO DAMASCENO²; HENRIQUE ARAÚJO LIMA¹; DAWIDSON ASSIS GOMES⁴; CARLA JORGE MACHADO⁵; VIVIAN RESENDE, TCBC-MG¹

R E S U M O

Objetivo: avaliar a expressão do receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR) por meio de imuno-histoquímica, e verificar sua associação com fatores prognósticos e com a sobrevida dos pacientes operados por colangiocarcinoma. **Métodos:** a expressão imuno-histoquímica de EGFR foi verificada em 35 peças cirúrgicas de colangiocarcinomas (CCA). Curvas de sobrevida foram obtidas pelo método de Kaplan-Meier. **Resultados:** expressão significativa de EGFR foi encontrada em dez (28,6%) de 35 CCA, oito com escore 3 e dois com escore 2. Estágios avançados (III e IV) apresentaram maior expressão de EGFR ($p=0,07$). As características clínicas que mais estiveram associadas com a expressão positiva de EGFR foram o sexo feminino ($p=0,06$) e ausência de comorbidades ($p=0,06$). A sobrevida global aos 12, 24, 36 e 48 meses foi de 100%, 82,5%, 59% e 44,2%, respectivamente. A sobrevida de pacientes EGFR positivos aos 12, 24, 36 e 48 meses foi de 100%, 75%, 50% e 0%, enquanto que para EGFR negativos foi de 100%, 87,5%, 65,6% e 65,6%, respectivamente. **Conclusão:** a expressão do EGFR ocorreu em 28,6% dos casos estudados e esteve associada a menor sobrevida.

Descritores: Colangiocarcinoma. Genes erbB-1. Prognóstico. Análise de Sobrevida.

INTRODUÇÃO

O colangiocarcinoma (CCA) é a segunda neoplasia maligna primária mais frequente no fígado e representa cerca de 3% de todos os cânceres gastrointestinais¹. Tem origem do epitélio dos ductos biliares intra ou extra-hepáticos². Foi descrito pela primeira vez por Durand-Fardel em 1840 e pode ser dividido, de acordo com sua localização, em intra-hepáticos, perihilares (tumores de Klatskin) e distais³. Na histologia, geralmente, são adenocarcinomas e se apresentam com graus de diferenciação e fenótipos variáveis⁴. Alguns fatores de risco para os colangiocarcinomas já foram estabelecidos, como infecções parasitárias, colangite

esclerosante primária, cistos dos ductos biliares, hepatolitíase e algumas toxinas. Outros potenciais fatores de risco incluem doença inflamatória intestinal, vírus da hepatite B e C, cirrose hepática, diabetes *mellitus*, obesidade, alcoolismo, tabagismo e mutações genéticas⁵. A incidência do CCA vem crescendo nos últimos anos⁶.

Maior atenção tem sido dedicada ao CCA devido ao mau prognóstico, somado à pouca eficácia das modalidades terapêuticas, especialmente, para pacientes com doença avançada⁷. Quimioterapia tem sido amplamente utilizada, porém, com baixa taxa de resposta^{7,8}. O estadiamento, tamanho e grau de diferenciação do tumor, margens de ressecção e

1 - Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Cirurgia, Belo Horizonte, MG, Brasil. 2 - Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Patologia Geral, Belo Horizonte, MG, Brasil. 3 - Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Anatomia Patológica e Medicina Legal, Belo Horizonte, MG, Brasil. 4 - Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Bioquímica e Imunologia, Belo Horizonte, MG, Brasil. 5 - Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Medicina Preventiva e Social, Belo Horizonte, MG, Brasil.

invasão angiolinfática e perineural são descritos como fatores prognósticos⁹. Entre os fatores que contribuem para o mau prognóstico, destaca-se o diagnóstico em fase avançada da doença, o que diminui a chance de cura pelo tratamento cirúrgico¹⁰. Mais de 50% dos casos são diagnosticados em fase avançada, levando à sobrevida média geral de, aproximadamente, sete a oito meses¹⁰. Pacientes que são submetidos à ressecção cirúrgica apresentam melhor prognóstico, com índice de sobrevida em cinco anos de 30% e sobrevida média de 30 meses¹¹⁻¹³.

O receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) é um receptor tirosina quinase da membrana celular codificado por proto-oncogenes. Diferentes ligantes, como o fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento de ligação à heparina (HB-EGF) e a anfirregulina, se acoplam nos domínios extracelulares desses receptores e iniciam uma cascata de sinalização intracelular, aumentando o potencial de proliferação celular, angiogênese e resistência à apoptose. A ativação do EGFR também prejudica a adesão célula-célula, por meio da desestabilização dos complexos juncionais (E-caderina, beta-catenina), o que contribui para a aquisição de motilidade e fenótipo invasivo^{14,15}.

Inibidores de fator de crescimento epidérmico, anticorpos e outras moléculas, como o erlotinib, gefitinib, cetuximab, panitumumab, trastuzumab e lapatinib, vêm sendo utilizados no tratamento dos cânceres colorretais, mama, pulmão e cabeça e pescoço, com resultados promissores, tendo como alvo o EGFR ou o receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2)^{11,16}. A superexpressão do EGFR em células tumorais esteve relacionada a pior prognóstico em alguns estudos, sendo encontrada em até 80% dos colangiocarcinomas, fazendo com que esse receptor seja um potencial alvo terapêutico nos portadores desse tipo de neoplasia¹⁶⁻¹⁹.

O papel do EGFR em doenças hepáticas malignas ainda é pouco entendido. A identificação de grupos de pacientes com subtipos mais agressivos e com risco de menor sobrevida poderia contribuir para o

desenvolvimento de opções terapêuticas mais eficazes. Para melhor entendimento sobre o significado clínico do EGFR no colangiocarcinoma, o objetivo principal do presente trabalho foi avaliar o grau de expressão imunohistoquímica do EGFR e verificar sua associação com fatores clínico-patológicos e sobrevida de pacientes submetidos a tratamento cirúrgico.

MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética institucional com o seguinte número de referência: CAAE - 37156714.6.0000.5149. No período de janeiro de 2008 a dezembro de 2015 foram selecionados pacientes submetidos a tratamento cirúrgico e com diagnóstico histológico de colangiocarcinoma. Foram coletados os seguintes dados dos pacientes: sexo, idade, história pregressa, história de tabagismo ou etilismo, presença de cálculos biliares, história familiar para neoplasia, tipo histológico, estadiamento dos tumores e sobrevida após o tratamento. Os exames laboratoriais analisados foram bilirrubinas e Ca19.9. A classificação quanto à localização anatômica dos tumores e o estadiamento foram baseados na descrição dos estudos radiológicos (Tomografia Computadorizada, Ressonância Magnética e/ou Colangiopancreatografia por Ressonância Magnética) associados aos achados da descrição cirúrgica e estudo anatomopatológico. As lâminas, coradas em hematoxilina e eosina (HE), foram revisadas para obter-se a classificação histológica em polipoide e não polipoide. A classificação e estadiamento seguiram o padrão TNM da AJCC/UICC (American Joint Cancer Committee/Union for International Cancer Control - 7ª edição)^{20,21}.

Foram incluídos pacientes cujas amostras de tecido foram obtidas de peças de ressecção cirúrgica ou de biópsias cirúrgicas de colangiocarcinomas. Consideraram-se como critérios de exclusão, amostras de câncer de vesícula biliar e da ampola hepatopancreática (de Vater) e casos de biópsias nas quais o material foi insuficiente para análise (seis casos). Todas as amostras foram fixadas em formaldeído a 10%, embebidas em parafina, cortadas em fragmentos

com espessura de quatro micrômetros e coradas com hematoxilina e eosina.

A análise histológica e imuno-histoquímica foram realizadas em tecido representativo do sítio primário do tumor, constituídos por 30 peças de ressecção cirúrgica com intenção curativa e cinco biópsias. As lâminas foram, inicialmente, processadas com pepsina e ácido clorídrico a 37°C durante 30 minutos para a recuperação antigênica e, logo após, foi feito o bloqueio da peroxidase endógena e de proteínas. Em seguida, foi realizada a incubação com o anticorpo primário (EGFR - clone 3G7 - Invitrogen - diluição 1:100) por 16 a 18 horas (incubação *overnight*). Na sequência, o anticorpo foi retirado, colocado o polímero e as lâminas foram incubadas em câmara úmida por 30 minutos, à temperatura ambiente. Após a retirada do polímero, prosseguiu-se com a adição do cromógeno 3,3' Diaminobenzidina tetrahydrocloroeto (DAB) que foi retirado após a reação. Quando a reação foi positiva, observou-se coloração marrom no sítio do antígeno. Em seguida, fez-se contra-coloração em HE e montagem das lâminas com meio transparente.

Todas as lâminas foram avaliadas por um patologista com experiência em análise imuno-histoquímica, sem conhecimento prévio das informações clínicas e patológicas dos pacientes. A intensidade da expressão do EGFR foi definida conforme escore previamente descrito, baseado no trabalho de Yoshikawa *et al.*²²:

- **0**: sem marcação da membrana celular ou marcação da membrana em 10% ou menos das células tumorais;
- **1+**: marcação fraca e parcial da membrana em mais de 10% das células tumorais;
- **2+**: marcação moderada e completa da membrana em mais de 10% das células tumorais;
- **3+**: marcação forte e membrana completa em mais de 10% das células tumorais.

Nos casos com intensidade variável, a intensidade predominante foi selecionada para o escore final. Escores 2+ e 3+ foram definidos como positivos para expressão da proteína.

A análise estatística foi realizada utilizando-se o pacote estatístico Stata para o Mac 2016. Para comparar-se a distribuição das categorias das variáveis do estudo segundo a expressão de EGFR (negativo e positivo), foi realizado o teste t de *Student* para as variáveis contínuas, e o teste do Qui-quadrado ou Teste de Fisher para as variáveis categóricas. A análise de sobrevida teve como variável dependente a ocorrência de óbito em relação ao tempo, o qual foi mensurado em meses. Foram excluídos os casos de óbitos de pacientes ocorridos em até 30 dias do pós-operatório. Constituíram-se curvas de sobrevida para as variáveis pelo método de Kaplan-Meier; na comparação entre grupos para cada variável, utilizou-se o teste Logrank. Em todas as análises, o nível de significância considerado foi de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Não houve diferença significativa na proporção entre homens ($n=17$) e mulheres ($n=18$). A média de idade dos pacientes foi de 58 anos, variando de 28 a 83 anos. Houve menor proporção de tabagistas, de etilistas e de cálculos biliares (Tabela 1).

Os seguintes procedimentos com intenção curativa foram realizados em 30 pacientes: oito (26,66%) hepatectomias direitas, duas (6,66%) trisegmentectomias direitas e nove (30%) hepatectomias esquerdas, associadas à ressecção do segmento um, quatro (13,33%) bissegmentectomias (três incluindo os segmentos dois e três e uma dos segmentos seis e sete). Foram realizadas ainda, seis (20%) duodenopancreatetectomias e uma (3,33%) ressecção isolada da via biliar extra-hepática.

Tabela 1. Expressão do EGFR em relação às variáveis clinicopatológicas.

Variáveis	EGFR		Total 35 (100)	Valor p 0,017
	Negativo (n=25; 71,4%)	Positivo (n=10; 28,6%)		
Idade (média; DP) (n=35)	59,5 (12,6)	56,2 (13,7)		0,496
Sexo (n; %)				
Masculino	15 (88,2)	2 (11,8)	17 (100)	0,060
Feminino	10 (55,6)	8 (44,4)	18 (100)	
Tabagismo (n; %)				
Não	14 (63,6)	8 (36,4)	22 (100)	0,440
Sim	8 (80,0)	2 (20,0)	10 (100)	
Etilismo (n; %)				
Não	17 (65,4)	9 (34,6)	26 (100)	0,637
Sim	5 (83,3)	1 (16,7)	6 (100)	
Comorbidades (n; %)				
Não	10 (55,5)	8 (44,5)	18 (100)	0,070
Sim	13 (86,7)	2 (13,3)	15 (100)	
História familiar (n; %)				
Não	10 (71,4)	4 (28,6)	14 (100)	0,683
Sim	7 (58,3)	5 (41,7)	12 (100)	
Cálculos (n; %)				
Não	17 (65,4)	9 (34,6)	26 (100)	0,637
Sim	5 (83,3)	1 (16,7)	6 (100)	
Classificação (n; %)				
Intra-hepático	6 (60,0)	4 (40,0)	10 (100)	0,185
Peri-hilar	15 (83,3)	3 (16,7)	18 (100)	
Distal	4 (57,1)	3 (42,9)	7 (100)	
CA19.9 (n; %)				
>37U/ml	5 (55,5)	4 (44,4)	9 (100,0)	0,999
<37U/ml	8 (61,5)	5 (38,5)	13 (100,0)	
Bilirrubina (n; %)				
0 a 4 mg/dl	8 (57,1)	6 (42,9)	14 (100,0)	0,151
4 a 10 mg/dl	5 (71,4)	2 (28,6)	7 (100,0)	
>10mg/dl	8 (88,8)	1 (11,1)	9 (100,0)	
Tratamento (n; %)				
Paliativo	4 (80,0)	1 (20,0)	5 (100,0)	0,999
Ressecção	21 (70,0)	9 (30,0)	30 (100,0)	
T (n; %)				
1 e 2	15 (83,3)	3 (16,7)	18 (100,0)	0,146
3 e 4	10 (58,8)	7 (41,2)	17 (100,0)	
N				
Negativo	15 (75)	5 (25)	20 (100)	0,331
Positivo	6 (60)	4 (40)	10 (100)	
Estadiamento (n; %)				
I e II	14 (87,5)	2 (12,5)	16 (100,0)	0,071
III e IV	11 (57,9)	8 (42,1)	19 (100,0)	
Tipo de crescimento (n; %)				
Polipoide	12 (70,6)	5(29,4)	17 (100,0)	0,999
Não-polipoide	13 (72,2)	5 (27,7)	18 (100,0)	

A tabela 1 mostra a expressão do EGFR em relação às variáveis de interesse nos 35 casos de colangiocarcinomas. Houve expressão significativa do EGFR em dez (28,6%) dos 35 colangiocarcinomas, sendo escore 3+ em oito pacientes e escore 2+ em dois pacientes. Em 25 pacientes (71,4%), a expressão do EGFR foi negativa, sendo escore 1+ em cinco pacientes e escore 0 em 20 pacientes.

As características clínicas dos pacientes que tiveram maior associação com a expressão positiva foram sexo feminino ($p=0,06$) e ausência de comorbidades ($p=0,07$). Quanto ao estadiamento TNM, aqueles com CCA em estádios mais avançados, III e IV, tiveram maior expressão do EGFR ($p=0,071$). A figura 1 mostra, em conjunto, as intensidades e escores atribuídos aos colangiocarcinomas.

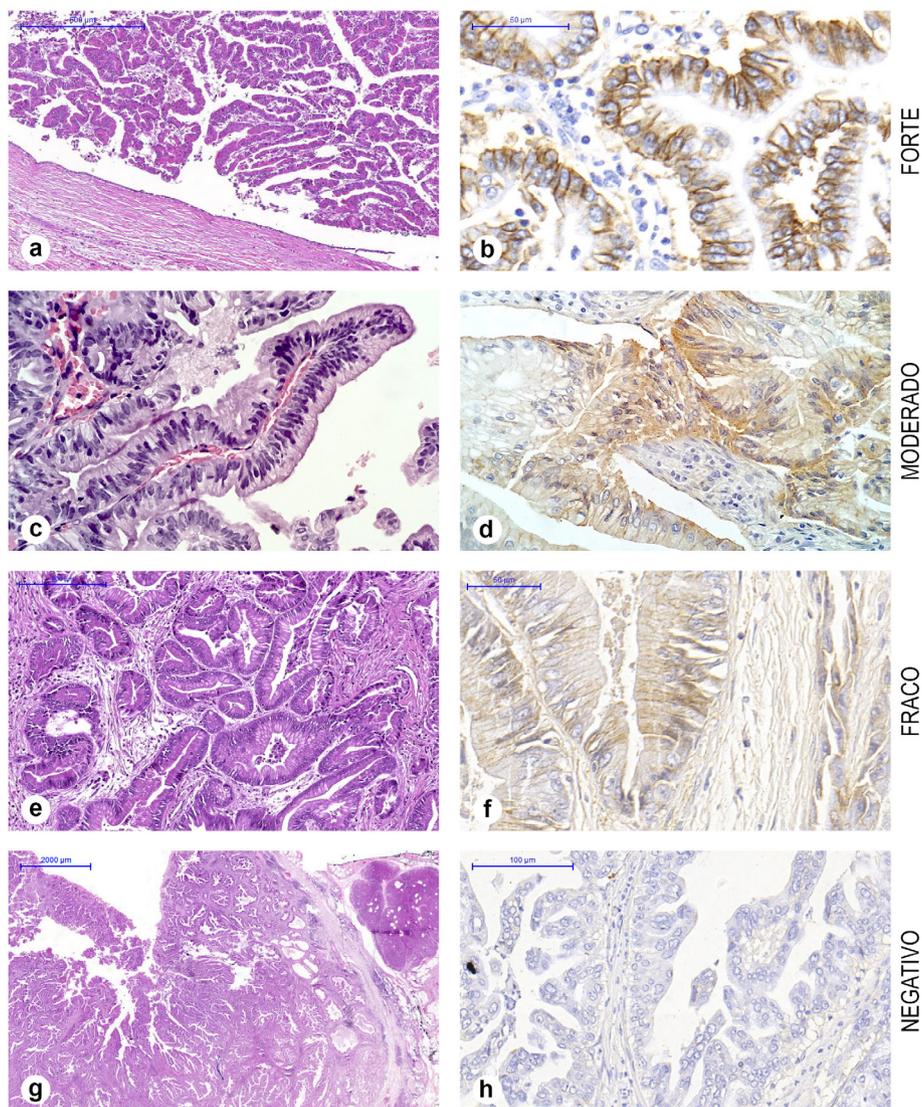


Figura 1. Intensidade do EGFR nos colangiocarcinomas. Coloração pela HE à esquerda (a, c, e, g) e imuno-histoquímica para EGFR à direita (b, d, f, h). (b) Membrana completa, forte, escore 3. (d) Membrana completa, moderado, escore 2. (f) Membrana incompleta, fraco, escore 1. (h) Negativo, escore 0.

A sobrevida global dos pacientes aos 12, 24, 36 e 48 meses foi de 100%, 82,5% (IC: 45,1-95,5), 59% (IC: 22,9-82,8) e 44,2% (IC: 11,9-73,2), respectivamente. A sobrevida dos pacientes com tumores EGFR-positivos

aos 12, 24, 36 e 48 meses foi de 100%, 75% (IC: 12,8-96,1), 50% (IC: 5,8-84,5%), e 0%, enquanto a dos pacientes EGFR-negativos foi de 100%, 87,5% (IC: 38,7-98,1), 65,6% (IC: 15,7-90,9) e 65,6% (IC: 15,7-90,9%),

respectivamente. A sobrevida dos pacientes com tumores EGFR positivos foi inferior à dos pacientes EGFR negativos, sem significância estatística ($p=0,328$) (Figura 2).

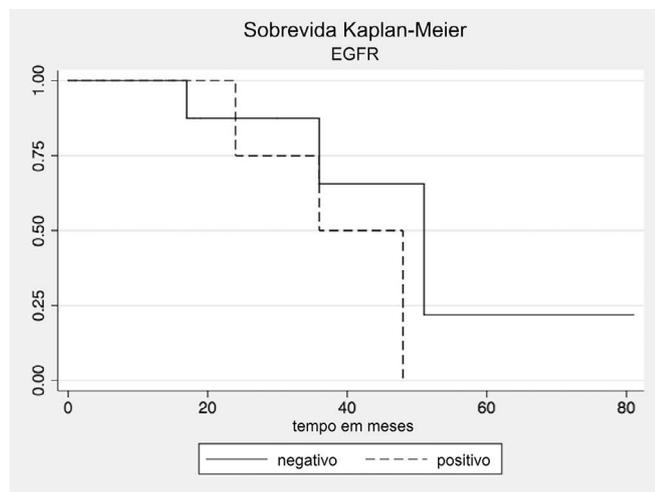


Figura 2. Curvas de sobrevida obtidas pelo método de Kaplan-Meier ($p=0,328$), em pacientes com colangiocarcinomas positivos e negativos para o EGFR.

DISCUSSÃO

A expressão dos receptores dos dois fatores de crescimento, EGFR e HER2, da família ErbB, tem sido estudada em diferentes tipos tumorais e já levou à utilização de terapias-alvo com inibidores ou anticorpos específicos destes receptores no câncer colorretal, mama, pulmão e cabeça e pescoço¹⁶. Até o momento, a utilização de anticorpos monoclonais e inibidores da tirosina quinase, tais como cetuximab, trastuzumab, erlotinib, gefitinib, ainda está sendo pesquisada em outros tipos de câncer. No câncer do trato biliar, a expressão de EGFR, em geral, ocorre em pequenos grupos de pacientes. Yoshikawa *et al.*, recentemente, descreveram a expressão desses receptores em neoplasias malignas do trato biliar ressecadas²². Harder *et al.* estudaram a expressão de EGFR e HER2 em um grupo de pacientes com tumores avançados e irresssecáveis do trato biliar. Os resultados desses autores sugerem que o teste de rotina e direcionamento terapêutico do HER2 parece não ser útil em pacientes com câncer do trato biliar, enquanto o EGFR como alvo, pode ser promissor¹¹. Chiorean *et al.*, em estudo de fase II, testaram Erlotinib e Docetaxel em carcinoma hepatocelular e câncer avançado do trato

biliar e concluíram que, para que haja uma melhoria significativa na sobrevida, o tratamento, provavelmente, deverá ser individualizado de acordo com o perfil molecular e genético dos tumores²³.

A expressão do EGFR em CCA, em estudos prévios, ocorreu com variabilidade de 8,1% a 81% e tem sido associada com a maior agressividade desses tumores¹⁶⁻¹⁹. Em nosso estudo, a expressão do EGFR foi considerada positiva em 28,6% dos casos e, apesar de não ter havido significância estatística, constatamos maior índice de expressão nos tumores em estádios avançados, ocorrendo em 42,1% dos tumores estádios III/IV *versus* 12,5% dos tumores estádios I/II ($p=0,071$), traduzindo característica de fenótipo agressivo na vigência de doença invasiva. Uma hipótese é de que o tumor passe a expressar mais o EGFR ao atingir estádios avançados. A análise de sobrevida também corroborou com a hipótese de que a expressão do EGFR se relaciona a pior prognóstico, já que os pacientes considerados positivos tiveram menor sobrevida em relação aos negativos.

Esses achados, previamente apontados, podem ser explicados pelo trabalho de Clapéron *et al.* que demonstraram que o eixo do EGF/EGFR é um potente indutor da transição epitélio-mesenquimal, um dos principais fatores moleculares associados à progressão do colangiocarcinoma²⁴. Sabe-se que a ativação do EGFR interfere na adesão intercelular, desestabilizando o complexo E-caderina/beta-catenina, promovendo a transição epitélio-mesenquimal, o que contribui para aumentar a capacidade de migração, invasão e resistência à apoptose^{24,25}. De forma semelhante, Hoffmann *et al.* encontraram pior prognóstico em pacientes com expressão de EGFR, com média de sobrevida de apenas 8,5 meses, enquanto pacientes com baixa expressão tiveram média de sobrevida maior do que três anos¹⁷. A associação significativa do EGFR com a sobrevida pode ajudar a selecionar estratégias de tratamento mais eficientes para pacientes com CCA.

A obtenção do escore para leitura da marcação do EGFR, em nosso estudo, teve como referência o trabalho de Yoshikawa *et al.*²², que consideraram marcação completa ou incompleta da membrana citoplasmática. Segundo Harder *et al.*, os tumores foram considerados negativos quando menos que 10% de

células cancerosas foram marcadas, independente da intensidade na membrana¹⁰. No trabalho desses autores, a expressão de EGFR esteve ausente em 39,3% (22/56) dos pacientes, enquanto que a expressão fraca (1+) foi observada em 21,5% (12/56), a expressão moderada (2+) em 23,2% (13/56) e intensa (3+) em 16% (9/56). O fato de termos utilizado uma forma diferente para a obtenção do escore pode ser a razão de termos obtido resultados inferiores (28,6%) aos desses autores. Além disso, Harder *et al.*¹¹ realizaram a pesquisa em biópsias de casos avançados e irrisecáveis de carcinoma do trato biliar, sem fazer distinção entre carcinoma da vesícula biliar e colangiocarcinoma dos ductos biliares, enquanto que em nosso trabalho, foram estudados apenas pacientes com carcinoma dos ductos biliares e em diferentes estádios.

Yoshikawa *et al.* mostraram uma superexpressão em 26,4% dos colangiocarcinomas extra-hepáticos e em 17,7% dos intra-hepáticos. Esses autores consideraram apenas duas localizações anatômicas, incluindo os carcinomas peri-hilares no grupo dos CCA extra-hepáticos²². Em nosso estudo, o carcinoma peri-hilar foi considerado separadamente, e a expressão de EGFR foi de apenas 16,7% nesse grupo, menor que nos demais. Harder *et al.* encontraram taxa de expressão de 57,9% nos extra-hepáticos e de 25% nos intra-hepáticos¹¹. Em nosso estudo, a expressão nos CCA extra-hepáticos foi de 42,9%. Essas divergências podem ser explicadas pelas diferentes maneiras de classificação anatômica adotadas, que ainda são controversas na literatura, sobretudo em relação ao colangiocarcinoma extra-hepático.

Apesar de a *World Health Organization* (WHO) incluir os colangiocarcinomas peri-hilares e distais na modalidade extra-hepática^{20,21}, sabe-se que possuem diferentes comportamentos biológicos e respondem de

forma distinta à quimioterapia. Em revisão sistemática, Wiggers *et al.* mostraram diferenças significativas na expressão de biomarcadores entre colangiocarcinomas intra-hepáticos e extra-hepáticos, sendo mais relevantes nos marcadores que são potenciais alvos de terapias sistêmicas (EGFR, c-erB-2 e VEGF-A), sugerindo que devem ser tratados como tumores distintos²⁶. Já Ercolani *et al.* classificaram os CCA em três subgrupos (intra-hepáticos, peri-hilares e extra-hepáticos) e concluíram que os colangiocarcinomas parecem ser o mesmo tipo de tumor, mas, dependendo da localização, apresentam diferentes propriedades de invasão de estruturas adjacentes, o que também pode influenciar no prognóstico²⁷. Nossos resultados corroboram com esta conclusão, uma vez que a localização anatômica implicou em diferentes desfechos quanto à sobrevida, apesar de a correlação com a expressão do EGFR não ter tido diferença significativa entre as três localizações.

Os desafios para o desenvolvimento de terapias direcionadas para os CCA incluem, não só a heterogeneidade desses tumores, mas também a raridade dos casos quando comparados a outros tumores sólidos, além do pouco interesse da indústria farmacêutica¹⁹. Algumas limitações podem ser notadas em nosso estudo. A realização da pesquisa em um único centro limitou o tamanho da amostra, já que se trata de uma doença, relativamente, rara. E esse fato pode ter sido responsável por não termos conseguido mostrar significância estatística em alguns achados do estudo.

Concluimos que a expressão do EGFR ocorreu em considerável número de colangiocarcinomas estudados e esteve associada à menor sobrevida dos pacientes. Estudos com maior número de casos serão necessários para comprovar a influência da expressão do EGFR no prognóstico dos pacientes com colangiocarcinoma e mostrar o potencial desse receptor como alvo terapêutico.

ABSTRACT

Objective: to evaluate the expression of the epithelial growth factor receptor (EGFR) by immunohistochemistry, and to verify its association with prognostic factors and survival of patients operated by cholangiocarcinoma. **Methods:** we verified the immunohistochemical expression of EGFR in 35 surgical specimens of cholangiocarcinoma (CCA). We obtained survival curves with the Kaplan-Meier method. **Results:** we found significant EGFR expression in ten (28.6%) of the 35 CCAs, eight with score 3 and two with score 2. Advanced stages (III and IV) presented higher EGFR expression ($p=0.07$). The clinical characteristics that were most associated with positive EGFR expression were female gender ($p=0.06$) and absence of comorbidities ($p=0.06$). Overall survival at 12, 24, 36 and 48 months was 100%, 82.5%, 59% and 44.2%, respectively. The survival of EGFR positive patients at 12, 24, 36 and 48 months was 100%, 75%, 50% and 0%, whereas for negative EGFR patients it was 100%, 87.5%, 65.6% and 65.6%, respectively. **Conclusion:** EGFR expression occurred in 28.6% of the cases studied and was associated with lower survival.

Keywords: Cholangiocarcinoma. Genes, *erbB-1*. Prognosis. Survival Analysis.

REFERÊNCIAS

1. Khan SA, Thomas HC, Davidson BR, Taylor-Robinson SD. Cholangiocarcinoma. *Lancet*. 2005;366(9493):1303-14. Erratum in: *Lancet*. 2006;367(9523):1656.
2. Resende V, Santos JP, Gomes RV, Vidigal PV, Pedrosa MS. Papillary neoplasias of the biliary tract. *Rev Col Bras Cir*. 2014;41(6):445-50.
3. Castellano-Megías VM, Ibarrola-de Andrés C, Colina-Ruizdelgado F. Pathological aspects of so called "hilar cholangiocarcinoma". *World J Gastrointest Oncol*. 2013;5(7):159-70.
4. Nakanuma Y, Kakuda Y. Pathologic classification of cholangiocarcinoma: new concepts. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2015;29(2):277-93.
5. Tyson GL, El-Serag HB. Risk factors for cholangiocarcinoma. *Hepatology*. 2011;54(1):173-84.
6. Singal AK, Vauthey JN, Grady JJ, Stroehlein JR. Intra-hepatic cholangiocarcinoma--frequency and demographic patterns: thirty-year data from the M.D. Anderson Cancer Center. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2011; 137(7):1071-78.
7. Huang Y, Li X, Zhao Y. Progression of targeted therapy in advanced cholangiocarcinoma. *Chin J Cancer Res*. 2015;27(2):122-7.
8. Thomas MB. Biological characteristics of cancers in the gallbladder and biliary tract and targeted therapy. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2007;61(1):44-51.
9. Ruys AT, Groot Koerkamp B, Wiggers JK, Klümpen HJ, ten Kate FJ, van Gulik TM. Prognostic biomarkers in patients with resected cholangiocarcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Ann Surg Oncol*. 2014;21(2):487-500.
10. Esnaola NF, Meyer JE, Karachristos A, Maranki JL, Camp ER, Denlinger CS. Evaluation and management of intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer*. 2016;122(9):1349-69.
11. Harder J, Waiz O, Otto F, Geissler M, Olschewski M, Weinhold B, et al. EGFR and HER2 expression in advanced biliary tract cancer. *World J Gastroenterol*. 2009;15(36):4511-7.
12. DeOliveira ML, Cunningham SC, Cameron JL, Kamangar F, Winter JM, Lillemoe KD, et al. Cholangiocarcinoma: thirty-one-year experience with 564 patients at a single institution. *Ann Surg*. 2007;245(5):755-62.
13. Tsukahara T, Shimoyama Y, Ebata T, Yokoyama Y, Igami T, Sugawara G, et al. Cholangiocarcinoma with intraductal tubular growth pattern versus intraductal papillary growth pattern. *Mod Pathol*. 2016;29(3):293-301.
14. Faria JAQA, Andrade C, Goes AM, Rodrigues MA, Gomes DA. Effects of different ligands on epidermal growth factor receptor (EGFR) nuclear translocation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;478(1):39-45.
15. Sohal DP, Shrotriya S, Abazeed M, Cruise M, Khorana A. Molecular characteristics of biliary tract cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016;107:111-8.
16. Leone F, Cavalloni G, Pignochino Y, Sarotto I, Ferraris R, Piacibello W, et al. Somatic mutations of epidermal growth factor receptor in bile duct and gallbladder carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2006;12(6):1680-5.
17. Hoffmann AC, Goekkurt E, Danenberg PV, Lehmann S, Ehninger G, Aust DE, et al. EGFR, FLT1 and

- heparanase as markers identifying patients at risk of short survival in cholangiocarcinoma. *PLoS One*. 2013;8(5):e64186.
18. Yang X, Wang W, Wang C, Wang L, Yang M, Qi M, et al. Characterization of EGFR family gene aberrations in cholangiocarcinoma. *Oncol Rep*. 2014;32(2):700-8.
 19. Voss JS, Holtegaard LM, Kerr SE, Fritcher EG, Roberts LR, Gores GJ, et al. Molecular profiling of cholangiocarcinoma shows potential for targeted therapy treatment decisions. *Hum Pathol*. 2013;44(7):1216-22.
 20. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol*. 2010;17(6):1471-4.
 21. Blechacz B, Komuta M, Roskams T, Gores GJ. Clinical diagnosis and staging of cholangiocarcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011;8(9):512-22.
 22. Yoshikawa D, Ojima H, Iwasaki M, Hiraoka N, Kosuge T, Kasai S, et al. Clinicopathological and prognostic significance of EGFR, VEGF, and HER2 expression in cholangiocarcinoma. *Br J Cancer*. 2008;98(2):418-25.
 23. Chiorean EG, Ramasubbaiah R, Yu M, Picus J, Bufill JA, Tong Y, et al. Phase II trial of erlotinib and docetaxel in advanced and refractory hepatocellular and biliary cancers: Hoosier Oncology Group GI06-101. *Oncologist*. 2012;17(1):13.
 24. Clapéron A, Mergey M, Nguyen Ho-Bouldoires TH, Vignjevic D, Wendum D, Chretien Y, et al. EGF/EGFR axis contributes to the progression of cholangiocarcinoma through the induction of an epithelial-mesenchymal transition. *J Hepatol*. 2014;61(2):325-32.
 25. Brivio S, Cadamuro M, Fabris L, Strazzabosco. Epithelial-to-mesenchymal transition and cancer invasiveness: what can we learn from cholangiocarcinoma? *J Clin Med*. 2015;4(12):2028-41.
 26. Wiggers JK, Ruys AT, Groot Koerkamp B, Beuers U, ten Kate FJ, van Gulik TM. Differences in immunohistochemical biomarkers between intra- and extrahepatic cholangiocarcinoma: a systematic review and meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2014;29(8):1582-94.
 27. Ercolani G, Dazzi A, Giovinazzo F, Ruzzenente A, Bassi C, Guglielmi A, et al. Intrahepatic, peri-hilar and distal cholangiocarcinoma: three different locations of the same tumor or three different tumors? *Eur J Surg Oncol*. 2015;41(9):1162-9.
- Recebido em: 19/02/2018
Aceito para publicação em: 22/03/2018
Conflito de interesse: nenhum.
Fonte de financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ).
- Endereço para correspondência:**
Vivian Resende
E-mail: vivianresende.ufmg@gmail.com / vresende@medicina.ufmg.br

